



**THAÍS DUQUE CARDOSO**

**PROPRIEDADES ESPECTROSCÓPICAS E MECANISMOS  
DEOXIDAÇÃO DA LEVODOPA E CARBIDOPA**

**LAVRAS – MG  
2021**

**THAÍS DUQUE CARDOSO**

**PROPRIEDADES ESPECTROSCÓPICAS E MECANISMOS DE OXIDAÇÃO DA  
LEVODOPA E CARBIDOPA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração em Química Computacional, para a obtenção do título de Mestre.

Profa. Dra. Katia Júlia de Almeida  
Orientadora

Profa. Dra. Ângela Leão Andrade  
Coorientadora

**LAVRAS-MG  
2021**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Cardoso, Thais Duque.

Propriedades espectroscópicas e mecanismos de oxidação da  
levodopa e carbidopa / Thais Duque Cardoso. - 2021.

64 p. : il.

Orientador(a): Katia Júlia de Almeida.

Coorientador(a): Ângela Leão Andrade.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2021.

Bibliografia.

1. DFT. 2. Levodopa. 3. Carbidopa. I. de Almeida, Katia Júlia.  
II. Andrade, Ângela Leão. III. Título.

**THAÍS DUQUE CARDOSO**

**PROPRIEDADES ESPECTROSCÓPICAS E MECANISMOS DA OXIDAÇÃO DA  
LEVODOPA E CARBIDOPA**

**SPECTROSCOPIC PROPERTIES AND OXIDATION MECHANISMS OF  
LEVODOPA AND CARBIDOPA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração em Química Computacional, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 01 de Julho 2021.

Profa. Dra. Barbara Sayuri Bellete	UFLA
Prof. Dr. Cleber Paulo Andrada Anconi	UFLA
Profa. Dra. Ângela Leão Andrade	UFOP

Profa. Dra. Katia Júlia de Almeida  
Orientadora

Profa. Dra. Ângela Leão Andrade  
Coorientadora

**LAVRAS-MG  
2021**

## AGRADECIMENTOS

A Deus por estar sempre presente em minha vida, iluminando meu caminho e dando-me forças para sempre continuar.

Aos meus pais, Cláudio e Mariza, que mesmo em meio a tantas dificuldades, sempre me apoiaram e acreditaram em todos os meus sonhos. Agradeço a Deus por ter vocês em minha vida.

A minha família pelo apoio e pelos momentos de felicidade proporcionados ao longo dessa caminhada.

Ao meu marido Adilson, minha gratidão por sua compreensão, companheirismo, amor, incentivo e por todos os momentos que passamos juntos.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) pela oportunidade oferecida. Ao Departamento de Química (professores, funcionários e colegas de curso).

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Às demais agências de fomento pelo financiamento concedido à realização deste projeto.

Ao Laboratório de Química Fundamental e Inorgânica (LQFI) pela oportunidade de realização do trabalho e aos amigos que me proporcionou.

À professora Dra. Katia Júlia de Almeida pela orientação para o desenvolvimento deste trabalho, pela paciência, incentivo e dedicação.

À professora Dra. Ângela Leão Andrade pelo auxílio e disponibilidade e por toda parte experimental realizada nesse trabalho.

Ao professor Dr. Sérgio Scherrer Thomas pelos ensinamentos e pelo auxílio.

As minhas amigas Carla, Graciane, Lucelia e Maísa, agradeço por todos os momentos que passamos juntas, me ajudando para que eu pudesse superar esse desafio.

A todos que me ajudaram nessa caminhada.

**MUITO OBRIGADA!**

## RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é uma doença caracterizada pela diminuição da dopamina no cérebro. Essa doença atinge principalmente pessoas acima de 60 anos e seu tratamento é realizado com o uso da levodopa (L-dopa), que atua como um neurotransmissor e é convertida em dopamina no cérebro. Nos primeiros tratamentos com essa droga, havia a ocorrência de vários efeitos colaterais, tais como náuseas, vômitos e hipotensão ortostática, que eram frequentes devido à conversão da L-dopa em dopamina nas regiões periféricas ao cérebro. Para resolver esses efeitos, a L-dopa passou a ser ministrada em conjunto com a carbidopa (C-dopa), que é um inibidor da enzima dopa descarboxilase, que faz essa conversão fora do sistema nervoso central. A dosagem simultânea desses dois princípios ativos em formulações farmacêuticas é de grande importância para que sua eficiência terapêutica seja otimizada e seus efeitos colaterais minimizados. Neste trabalho, técnicas experimentais e teóricas de absorção eletrônica na região do ultravioleta visível (UV-Vis) foram utilizadas para determinar um método simples, barato e eficiente para dosagem simultânea da L-dopa e C-dopa. Além disso, análises sistemáticas, baseadas nas teorias do funcional de densidade dependente e independente do tempo (TD-DFT e DFT), foram conduzidas para determinar os mecanismos de oxidação de cada um desses fármacos. Um método experimental otimizado nesse trabalho envolveu a dissolução da L-dopa e C-dopa em solução de HCl e posterior adição de NaOH, que levou a oxidação das espécies analisadas. Os espectros UV-Vis em cada condição experimental permitiram a dosagem simultânea dos princípios ativos, fornecendo a base para a investigação teórica dos mecanismos de reação envolvidos no processo de oxidação dessas espécies. Diferentes mecanismos de reação foram avaliados para a L-dopa e C-dopa, e os resultados DFT e TD-DFT indicam que a metodologia empregada foi capaz de reproduzir com eficiência os espectros UV-Vis experimentais da L-dopa e C-dopa não oxidadas (em HCl) e oxidadas (com adição de NaOH), mostrando pequenas diferenças nas intensidades das bandas e deslocamentos dos picos máximos de absorção, que podem ser atribuídos aos efeitos do solvente, que não foram considerados nos cálculos realizados. Além disso os valores da diferença de HOMO-LUMO das estruturas foram obtidos. Para L-dopa, os resultados TD-DFT mostram condições termodinâmicas favoráveis para o mecanismo de oxidação da L-dopa, que foi previamente proposto na literatura. A espécie final identificada em solução foi, entretanto, o intermediário zwitteriônico, o único com uma banda de absorção na região visível do espectro. Dentre os três mecanismos investigados para C-dopa, o mais favorável do ponto de vista termodinâmico foi aquele no qual a espécie final oxidada corresponde a um intermediário zwitteriônico, apresentando em sua estrutura um novo anel aromático de cinco membros. De modo geral, o estudo realizado nessa dissertação indica como uma colaboração teórica e experimental pode ser uma ferramenta útil na investigação de mecanismo de reações envolvendo sistemas moleculares de interesse farmacológico.

**Palavras-chave:** DFT. Carbidopa. Levodopa. UV-Vis. Doença de Parkinson.

## ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is characterized by a decreasing of dopamine in the brain. This disease affects mainly people over 60 years, and its treatment is carried out using levodopa (L-dopa), which acts as a neurotransmitter, being converted into dopamine in the brain. In the first treatments using this drug, there were several side effects, such as nausea, vomiting and orthostatic hypotension, which were frequent due to the conversion of L-dopa into dopamine in the peripheral regions of the brain. To overcome these effects, L-dopa began to be administered together with carbidopa (C-dopa), which is an inhibitor of the dopa decarboxylase enzyme, which makes this conversion outside the central nervous system. The simultaneous dosage of these two active drugs in pharmaceutical formulations is of great importance to optimize their therapeutic efficiencies and to minimize their side effects. In this work, the experimental and theoretical analyses were performed using the ultraviolet-visible (UV-Vis) electron absorption spectroscopy to optimize a simple, low-cost, and efficient experimental method for the simultaneous dosage of L-dopa and C-dopa. In addition, systematic analyses based on time-dependent and time-independent density functional theories (TD-DFT and DFT) were conducted to determine the oxidation mechanisms of each drug. The optimized method consists of dissolution of L-dopa and C-dopa in HCl, with subsequent addition of NaOH, which leads to oxidation of the analyzed species. The UV-Vis spectra in both cases allowed the simultaneous dosage of active principles, providing the basis for the theoretical investigation of the reaction mechanisms involved in the oxidation processes of these species. Different reaction mechanisms were evaluated for L-dopa and C-dopa, and the DFT and TD-DFT results indicated that the employed methodology was able to efficiently reproduce the experimental UV-Vis spectra of non-oxidized (in HCl) and oxidized (with NaOH), L-dopa and non-C-dopa, showing small differences in intensities and displacements of the maximum absorption peaks of bands, which can be ascribed by solvent effects, which were not taken into account in the spectrum calculations. With regard to L-dopa, the TD-DFT results showed favorable thermodynamical conditions for oxidation mechanism of L-dopa, which has been previously proposed in the literature by Mandrakian *et al.* However, the final species identified in solution was the zwitterionic intermediate, which has an absorption band in the visible region. Among three investigated mechanisms for C-dopa, the most favorable thermodynamical mechanism was that with the final oxidized species corresponding to the zwitterionic intermediate, where a new five-membered aromatic ring was formed. In general, the present study has indicated that the theoretical and experimental analyses as one useful tool in the investigation of reaction mechanisms involving molecular systems with pharmacological interest.

**Keywords:** DFT. Carbidopa. Levodopa. UV-Vis. Parkinson's disease.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura molecular da levodopa (L-dopa) .....	18
Figura 2 -	Estrutura molecular da carbidopa (C-dopa) .....	19
Figura 3 -	Transições eletrônicas UV-Vis em moléculas orgânicas .....	21
Figura 4 -	Espectro de absorção eletrônica UV-Vis experimentais: a) C-dopa e L-dopa, em HCl (0,1 mol L <sup>-1</sup> ); b) C-dopa e L-dopa, após adição de NaOH (4,5 mol L <sup>-1</sup> ). Ambos princípios ativos na concentração inicial de 10 µgmL <sup>-1</sup> .....	31
Figura 5 -	Espectros de absorção UV-Vis experimentais da levodopa (L-dopa) em diferentes valores de pH do meio e estudo da possibilidade de reversibilidade do processo em diferentes valores de pH do meio .....	32
Figura 6 -	Espectros de absorção UV-Vis experimentais da carbidopa (C-dopa) em diferentes valores de pH do meio e estudo da possibilidade de reversibilidade do processo em diferentes valores de pH do meio.....	33
Figura7 -	Adaptação do mecanismo de oxidação da L-dopa proposto por Madrakian et al. (2004) .....	34
Figura8 -	Oxidação das hidroxilas fenólicas da L-dopa .....	35
Figura9 -	Formação do ciclo azociclopentanoda L-dopa e recuperação de suas hidroxilas fenólicas em meio básico .....	35
Figura10 -	Oxidação das hidroxilas fenólicas da L-dopa, com a formação de uma estrutura zwitteriônica <b>I3</b> .....	36
Figura11 -	Redução do intermediário <b>I3</b> através do radical hidroperóxido presente no meio e finalização da oxidação da L-dopa com a formação do produto neutro <b>P1</b> .....	36
Figura12 -	Estrutura molecular otimizada B3LYP/CBSB7 da L-dopa em fase gasosa.....	37
Figura13 -	Os espectros de absorção UV-Vis experimentais e teóricos (M06L/def2-SVP) da L-dopa e de suas espécies de oxidação <b>I1</b> , <b>I2</b> , <b>I3</b> e <b>P1</b> (mostrados na Fig. 7) .....	39

Figura14 -	Orbitais HOMO e LUMO M06L/def2-SVP da L-dopa .....	40
Figura 15 -	Estrutura otimizada B3LYP/CBSB7 do intermediário <b>I3</b> da L-dopa .....	41
Figura16 -	Orbitais HOMO e LUMO do intermediário <b>I3</b> da L-dopa obtidos no nível de cálculo M06L/def2-SVP .....	42
Figura17 -	Mecanismos de reação para oxidação da C-dopa .....	43
Figura 18 -	Primeira etapa do mecanismo CR1 do processo de oxidação da C-dopa.....	44
Figura 19 -	Ataque nucleofílico do nitrogênio da cadeia lateral da C-dopa para formação do intermediário oxidado <b>I2</b> .....	44
Figura20 -	Oxidação das hidroxilas fenólicas da C-dopa para a formação do intermediário <b>I3</b> .....	44
Figura 21 -	Ataque nucleofílico do nitrogênio terminal do grupo hidrazina da C-dopa .....	45
Figura 22 -	Oxidação dos nitrogênios conjugados da C-dopa.....	45
Figura 23 -	Formação do intermediário <b>I6</b> e do produto <b>P1</b> envolvidos no caminho CR2 para a oxidação da C-dopa.....	46
Figura 24 -	Formação do intermediário <b>I4</b> e o processo de ressonância levando a formação do intermediário <b>I7</b> .....	46
Figura 25 -	Estrutura otimizada B3LYP/CBSB7 da C-dopa .....	47
Figura 26 -	Espectros de absorção UV-Vis experimental e M06L/def2-SVP da C-dopa e seus intermediários e produto final de oxidação .....	50
Figura 27 -	Orbitais HOMO e LUMO M06L/def2-SVP da C-dopa .....	50
Figura 28 -	Estrutura otimizada B3LYP/CBSB7 intermediário <b>I3</b> da C-dopa.....	53
Figura 29 -	Orbitais HOMO e LUMO do intermediário <b>I3</b> da C-dopa.....	53

#### LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Transições eletrônicas do tipo $n \rightarrow \pi^*$ de acordo com a classificação dos grupos cromóforos .....	22
------------	--	----

Tabela 2 -	Parâmetros geométricos experimentais e calculados no nível de cálculo B3LYP/CBSB7 da L-dopa em fase gasosa .....	38
Tabela 3 -	Atribuições das transições eletrônicas envolvidas nas bandas do espectro de absorção UV-Visda L-dopa obtidas no nível de cálculo M06L/def2-SVP .....	41
Tabela 4 -	Atribuições das transições eletrônicas envolvidas nas bandas do espectro de absorção UV-Vis do intermediário <b>I3</b> obtidas no nível de cálculo M06L/def2-SVP.....	42
Tabela 5 -	Parâmetros teóricos em nível B3LYP/CBSB7 da molécula de C-dopa .....	48
Tabela 6 -	Atribuições das transições eletrônicas envolvidas nas bandas do espectro de absorção UV-Visda C-dopa obtidas no nível de cálculo M06L/def2-SVP .....	51
Tabela 7 -	Atribuições das transições eletrônicas envolvidas nas bandas do espectro de absorção UV-Vis do intermediário <b>I3</b> da C-dopa obtidas no nível de cálculo M06L/def2-SVP.....	52
Tabela 8 -	Aplicação do método espectrofotométricoUV-Vis proposto para a determinação de L-dopa e C-dopa em uma preparação farmacêutica.....	54

## LISTA DE ABREVIATURAS

C-dopa	Carbidopa
CEE	Correlação eletrônica dinâmica
CED	Correlação eletrônica estática
DDC	Dopa descarboxilase
DP	Doença de Parkinson
DPR	Desvio padrão relativo
HF	Hartree Fock
HK	Hohenberg- Kohn
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
KS	Kohn-Sham
L-dopa	Levodopa
OMS	Organização Mundial da Saúde
RSD	Coefficiente de variação
SPE	Extração em fase sólida
UV-Vis	Ultravioleta visível

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>15</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivos Específicos .....</b>	<b>15</b>
<b>3</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>16</b>
<b>3.1</b>	<b>Doença de Parkinson .....</b>	<b>16</b>
<b>3.2</b>	<b>Levodopa.....</b>	<b>17</b>
<b>3.3</b>	<b>Carbidopa .....</b>	<b>18</b>
<b>3.4</b>	<b>Métodos de análises da L-dopa e C-dopa .....</b>	<b>19</b>
<b>3.5</b>	<b>Espectroscopia de absorção na região ultravioleta-visível (UV-Vis).....</b>	<b>20</b>
<b>3.6</b>	<b>Teoria do Funcional de Densidade .....</b>	<b>23</b>
<b>3.6.1</b>	<b>Teoremas Hohenberg-Kohn .....</b>	<b>25</b>
<b>3.6.2</b>	<b>Método Kohn-Sham .....</b>	<b>26</b>
<b>3.6.3</b>	<b>Funcionais de Densidade .....</b>	<b>28</b>
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>30</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>31</b>
<b>5.1</b>	<b>Análises preliminares .....</b>	<b>31</b>
<b>5.2</b>	<b>Processo de Oxidação da L-Dopa.....</b>	<b>34</b>
<b>5.3</b>	<b>Mecanismos de oxidação e resultados computacionais da C-dopa .....</b>	<b>43</b>
<b>5.4</b>	<b>Determinação simultânea experimental da L-dopa e C-dopa.....</b>	<b>54</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>56</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>57</b>
	<b>ANEXO .....</b>	<b>64</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A doença de Parkinson (DP) é um distúrbio neurodegenerativo do sistema nervoso central, que resulta na perda dos neurônios da substância negra do cérebro, ocasionando uma diminuição da dopamina. A levodopa, [L-3-(3,4-dihidroxifenil)-alanina], comumente denominada L-dopa, tem sido amplamente utilizada no tratamento dessa doença, atuando como um neurotransmissor, que se converte em dopamina no cérebro (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003; CAMARGO et al., 2014). Nos primeiros tratamentos da DP com essa droga, essa conversão também ocorria em níveis elevados nas regiões periféricas, ocasionando vários efeitos colaterais tais como náuseas, vômitos e hipotensão ortostática (CUTSON; LAUB; SCHENKMAN, 1995; FREITAS; RUIZ-LOPEZ; FOX, 2016). Para evitar isso, a L-dopa foi associada à carbidopa (C-dopa), L-ácido [3-(3,4-dihidroxifenil)-2-hidrazino-2-metil-propiónico], que é um inibidor enzimático da conversão da L-dopa em dopamina fora do sistema nervoso central (GONCALVES et al., 2012).

Uma mudança na concentração dessas drogas no corpo pode influenciar a sua biodisponibilidade, bioatividade e, conseqüentemente, a magnitude de sua ação. Portanto, com o objetivo de otimizar o tratamento da DP e diminuir as toxicidades dessas drogas é importante monitorar suas concentrações nas formulações farmacêuticas. Nesse sentido, vários estudos foram realizados na literatura usando diferentes métodos analíticos para a determinação simultânea das concentrações da L-dopa e C-dopa em diferentes matrizes. Dentre as técnicas analíticas empregadas, merecem destaque a espectrofluorimetria (FATIBELLO; VIEIRA, 1997; KIM; KARIM; LEE, 2008), a quimioluminescência (NOZAKI; IWAEDA; KATO, 1996; MU et al., 2017), a voltametria (KOZMINSKI et al., 1998; MAZLOUM et al., 2012; WANG et al., 2013), e, principalmente, as cromatografias em fase gasosa e líquida de alta eficiência (HPLC), acopladas a diferentes métodos de detecção (ELBARBRY et al., 2019; ADAMIAK-GIERA; GAWRONSKA-SZKLARZ, 2018). Essas técnicas, porém, possuem algumas desvantagens como instrumentação complexa, alto custo operacional e complexidade na interpretação dos resultados obtidos.

No caso particular desse estudo, a técnica espectroscópica de absorção eletrônica UV-Vis foi aliada às análises computacionais para desenvolvimento e otimização de um método simples e eficiente para dosagem simultânea da L-dopa e C-dopa. Além disso, os mecanismos de reação envolvidos no procedimento experimental realizado foram

sistematicamente explorados para ambos os fármacos. Vários estudos empregando a espectroscopia de absorção UV-Vis têm sido realizados na literatura para a dosagem de diferentes fármacos, isso devido à simplicidade, eficiência e baixo custo dessa técnica (MADRAKIAN et al. 2004). O uso de técnicas computacionais baseadas em metodologias quânticas, em particular aquelas envolvendo a teoria do funcional de densidade, pode ser bastante útil nas análises e interpretações dos espectros experimentais, fornecendo informações eletrônicas e geométricas das espécies presentes no procedimento experimental e seus mecanismos químicos operantes.

## 2 OBJETIVO GERAL

O principal objetivo desse trabalho foi realizar um estudo experimental e teórico para otimizar um método espectroscópico eficiente e de baixo custo para dosagem simultânea da L-dopa e C-dopa, que são os principais fármacos utilizados no tratamento da doença de Parkinson. Para isso, a espectroscopia de absorção eletrônica na região do ultravioleta e visível (UV-Vis) foi sistematicamente empregada. Cálculos baseados na teoria do funcional de densidade (*DensityFunctionalTheory* (DFT)) foram utilizados nas análises computacionais para determinar os mecanismos de reação da L-dopa e C-dopa, durante o procedimento experimental realizado.

### 2.1 Objetivos Específicos

- i) Investigar diferentes mecanismos de reação que possam explicar as mudanças visuais percebidas nos espectros UV-Vis da L-dopa e C-dopa durante o procedimento experimental de dosagem simultânea dessas drogas;
- ii) Otimizar as geometrias de todas as espécies moleculares envolvidas nos mecanismos de reação investigados (ANEXO A). Adicionalmente, realizar cálculos de frequência vibracionais para identificar as espécies otimizadas como sendo estruturas de mínimos ou de estado de transição. Discriminar as energias envolvidas em cada mecanismo de reação;
- iii) Realizar cálculos dos espectros de absorção UV-Vis de todas as espécies otimizadas e fazer comparações com os espectros experimentais obtidos, de modo a determinar o mecanismo que melhor se adapta com o perfil espectral da L-dopa e C-dopa.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Doença de Parkinson

A doença de Parkinson (DP) é um distúrbio neurológico crônico e progressivo, sendo o segundo transtorno degenerativo com maior incidência na população mundial, ficando atrás apenas do Alzheimer (ALEXANDER, 2004; STEGER et al., 2016). Segundo a OMS (Organização Mundial da Saúde), cerca de 1% da população mundial acima dos 65 anos é afetada por essa doença (GOULDING et al., 2020), mas a idade média do início do desenvolvimento da doença é aos 55 anos, aumentando o risco em 5 vezes a partir dos 70 anos (HALD; LOTHARIUS, 2005). Vários genes têm sido apontados na literatura como possíveis responsáveis do desenvolvimento da DP, mas o mais comumente citado é a mutação no gene LRRK2, que varia de acordo com a região e grupos étnicos (BEN ROMDHAN et al., 2018, WANG et al., 2019). Apesar de incomum, a DP pode acometer pessoas jovens independente do sexo, raça, cor ou classe social. Contudo, nesse caso, o desenvolvimento da doença é mais lento e é resultado de causas secundárias ou genéticas (SCHRAG; SCHOTT, 2006), sendo as últimas relacionadas à mutação no gene PRKN, em 77% dos casos da DP em pessoas com idade inferior a 21 anos (LUNATI; LESAGE; BRICE, 2018). Como a idade é o principal fator de risco para o desenvolvimento da doença, espera-se que sua prevalência venha a crescer com o aumento da expectativa de vida da população.

Descrita pela primeira vez em 1817 pelo médico inglês James Parkinson, a DP recebeu primeiramente o nome de “paralisia agitante” pelo fato de ela ser caracterizada inicialmente por sintomas como movimentos reduzidos (acinesia) e tremores involuntários (GOETZ, 2011, OBESO et al., 2017). Com o desenvolvimento da doença, entretanto, vários outros sintomas podem aparecer, tais como, tremores de repouso, rigidez muscular, alterações da marcha, instabilidade postural, diminuição do equilíbrio e da coordenação dos movimentos (TAMBASCO; ROMOLI; CALABRESI, 2018). Estes distúrbios motores podem ser acompanhados, eventualmente, por dores, confusão, ansiedade, depressão, alterações do sono, diminuição da memória e distúrbios do sistema nervoso autônomo (RAO et al., 2003; BUNJO et al., 2019). Durante muitos anos, o termo “Mal de Parkinson” foi utilizado para essa doença. No entanto, esse termo deixou de ser usado e foi definitivamente abandonado por médicos e pacientes, com o objetivo de reduzir o estigma social e o preconceito contra portadores da doença.

As principais descobertas médicas sobre a DP iniciaram em 1912 com Lewy, que observou contornos citoplasmáticos hialinos em neurônios dopaminérgicos, que

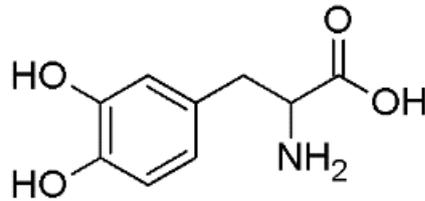
são, atualmente, conhecidos como corpos de Lewy (TAKAHASHI; WAKABAYASHI, 2005; SAFARI et al., 2019). Em 1930, Hassler foi capaz de descrever a diminuição dos neurônios nos núcleos basais de Meynert (MORI, 2005). Posteriormente, no ano de 1938, ele observou lesões na substância negra e no cerúleo de pacientes com DP (TAKAHASHI; WAKABAYASHI, 2005, GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, 2010). Atualmente, a DP está intrinsicamente relacionada com a degeneração dos neurônios responsáveis pela produção de dopamina, cujo os corpos celulares ficam localizados na parte compacta da substância negra do cérebro. À medida que a doença avança, esses neurônios dopaminérgicos se degeneram e formam os corpos citoplasmáticos inclusos, conhecidos como os corpos de Lewis (ORTIZ et al., 2016).

Os primeiros tratamentos da doença de Parkinson eram apenas paliativos, sendo realizados através do uso de medicamentos anticolinérgicos, com objetivo de melhorar a lentidão dos movimentos (bradicinesia). Além disso, cirurgias eram ocasionalmente realizadas para tentar diminuir os tremores recorrentes da doença (CUTSON; LAUB; SCHENKMAN, 1995, TORUN et al., 2020). Durante a década de 1960, entretanto, uma revolução no tratamento clínico da DP ocorreu quando a L-dopa começou a ser utilizada clinicamente.

### 3.2 Levodopa

A levodopa,  $C_9H_{11}O_4N$ , [L -3-(3,4-dihidroxifenil)-alanina] (Figura 1), comumente nomeada como L-dopa, é um aminoácido natural extraído de 135 sementes de plantas (FERNANDEZ-PASTOR et al., 2018) e foi isolada pela primeira vez em 1913 por Marcus Guggenheim, em leguminosas (mudas de *Vicia Faba*). No entanto, em 1911, Casimir Funk, já havia sintetizada em laboratório na forma racêmica D,L-dopa (HORNYKIEWICZ, 2002). Ela possui a fórmula molecular  $C_9H_{11}NO_4$ , massa molecular de  $197,17 \text{ g mol}^{-1}$  e tem o ponto de fusão de  $284\text{-}286 \text{ }^\circ\text{C}$ . Existe duas formas químicas da L-dopa, que são denominadas de neutra e zwitteriônica. A forma neutra se converte na forma zwitteriônica por meio da migração do hidrogênio do grupo carboxílico para o grupo amina, gerando, dessa forma, os grupos duplamente carregados com cargas opostas  $\text{COO}^-$  e  $\text{NH}_3^+$ . Além disso, a L-dopa apresenta um tipo de isomeria, sendo conhecida como isomeria óptica (formas D e L), que está presente na L-dopa devido à presença de um carbono quiral nessa molécula. Além disso, no ano de 1950, o cientista sueco Arvid Carlsson demonstrou que o uso da L-dopa em animais diminuía significativamente os sintomas da DP (CARLSSON, 1959). Contudo, somente em 1970, a L-dopa foi aprovada pela agência federal de departamento de saúde dos Estados Unidos “*Food and Drug Administration*” (FDA) para o uso no tratamento da DP.

Figura1-Estrutura molecular da levodopa (L-dopa).



Fonte: Da autora (2021).

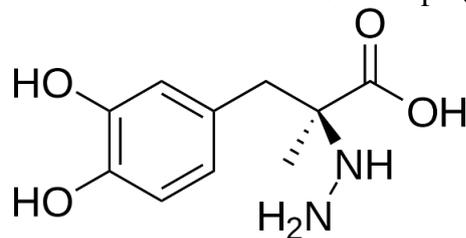
No tratamento da DP, após administração oral, a L-dopa é absorvida no intestino delgado (GUNDERTREMY et al., 1983, NYHOLM; LENNERNAS, 2008) e, por meio da corrente sanguínea, ela é capaz de alcançar e transpor a barreira hematoencefálica, sendo então convertida em dopamina pela ação da enzima dopa descarboxilase (DDC) (CAMARGO et al., 2014). Entretanto, a conversão de L-dopa em dopamina pela ação da enzima DDC pode ocorrer também nas regiões periféricas, causando fortes efeitos colaterais como náuseas, vômitos e hipotensão ortostática (FREITAS; RUIZ-LOPEZ; FOX, 2016). Essa conversão indevida levava à necessidade de altas dosagens da L-dopa para que uma ínfima parcela atingisse o sistema nervoso central e o efeito terapêutico esperado ocorresse (CUTSON; LAUB; SCHENKMAN, 1995; MONTIOLI; VOLTATTORNI; BERTOLDI, 2016; MULLER; MOHR, 2018). Esse problema foi então resolvido com o uso de substâncias inibidoras (antagonistas) da DDC, que por não serem capazes de transpor a barreira cerebral, conseguem inibir seletivamente a conversão da L-dopa em dopamina nas regiões periféricas ao cérebro. A carbidopa é o inibidor da DDC mais frequentemente utilizado em combinação com a L-dopa na formulação dos medicamentos atuais para o tratamento da DP (LEWITT, 2015; CAMARGO et al., 2014). A utilização desse inibidor reduz bastante a dose necessária de L-dopa, aliviando de maneira geral os seus efeitos colaterais.

### 3.3 Carbidopa

A carbidopa,  $C_{10}H_{14}O_4N_2$  L-[ácido 3-(3,4-dihidroxifenil)-2-hidrazina-2-metilpropanóico] (Figura 2), conhecida como C-dopa, é um potente inibidor da enzima DDC, que impede a conversão da L-dopa em dopamina nas regiões periféricas do organismo (DUARTE et al., 2019, CUTSON; LAUB; SCHENKMAN, 1995). Além disso, um estudo recente realizado por Ogura et al. (2017) demonstrou uma eficiente atividade anticancerígena da C-dopa *in vitro* e em camundongos contra câncer pancreático, bem como em alguns outros tipos de câncer onde a C-dopa atua como modulador seletivo do receptor do aril hidrocarboneto (SAFE, 2017). A C-

dopa, é uma substância que possui em sua estrutura molecular um grupo hidrazina (NH-NH<sub>2</sub>) e um outro ácido. Desta maneira ela possui duas formas químicas, uma neutra e outra zwitteriônica, que ocorre a partir da forma neutra (Figura 2) da C-dopa, onde acontece a migração do hidrogênio do ácido carboxílico para a amina terminal do grupo hidrazina, gerando, dessa forma, os grupos COO<sup>-</sup> e NH<sub>3</sub><sup>+</sup>. A presença de um carbono quiral na L-dopa e C-dopa possibilita também a isomeria óptica, onde as formas D- e L- formam os enantiômeros.

Figura 2 -Estrutura molecular da Carbidopa (C-dopa).



Fonte: Da autora (2021).

### 3.4 Métodos de análises da L-dopa e C-dopa

O controle da concentração da L-dopa e C-dopa em formulações farmacêuticas é muito importante para que suas atividades farmacológicas sejam otimizadas e os efeitos colaterais minimizados. Vários métodos analíticos têm sido descritos na literatura para determinação simultânea desses medicamentos em preparações farmacêuticas. A técnica analítica mais empregada tem sido a cromatografia em fase gasosa (SHARMA et al., 1996) e em fase líquida de alta eficiência (*high performance liquid chromatography* (HPLC)), acopladas às diferentes técnicas de detecção, tais como, espectrofotometria UV-Vis, espectrometria de massa, dentre outros ((FATIBELLO; VIEIRA, 1997, KIM; KARIM; LEE, 2008, ADAMIAK-GIERA; GAWRONSKA-SZKLARZ, 2018; ELBARBRY et al., 2019; BELAL et al., 2018; BHATNAGAR et al., 2017; CHI et al., 2017; MU et al., 2017; OZDOKUR et al., 2017).

Em um estudo realizado por Elbarbry et al. (2019), a técnica de cromatografia líquida, acoplada a um método de detecção UV-Vis, foi utilizada para dosagem da L-dopa em plasma humano. Os principais resultados mostraram que o método desenvolvido e os dados farmacocinéticos podem oferecer uma ferramenta valiosa para avaliar o efeito da dieta cetogênica sobre os efeitos farmacológicos da L-dopa em humanos. Um outro trabalho interessante realizado por BELAL et al. (2018) utilizou a mesma metodologia para quantificar

L-dopa, C-dopa e entacapona em plasma humano. O método proposto foi aplicado com sucesso para a quantificação dos medicamentos estudados em diferentes dosagens, se mostrando um procedimento confiável, prático, fácil de manusear e de baixo custo.

Outras técnicas também foram utilizadas para dosagem simultânea da L-dopa e C-dopa, dentre elas estão as determinações voltamétricas (KOZMINSKI et al.,1998; MAZLOUM et al., 2012; WANG et al.,2013, SANATI; FARIDBOD; GANJALI, 2017, MOHAMMADI et al.,2018, MIRAKI et al., 2019), a fluorescência (CHEN et al., 2020) e os métodos eletroquímicos, com diferentes tipos de eletrodos, para a detecção dos princípios ativos de interesse (TAKEDA et al., 2016, AZAB; FEKRY; MOHAMED, 2017, HATEFI-MEHRJARDI et al., 2017, SHOGHI-KALKHORAN et al., 2017, PALAKOLLU et al., 2017, BEITOLLAHI; SAFAEI; TAJIK, 2020). No entanto, essas técnicas possuem diferentes problemas técnicos como baixa seletividade, baixa velocidade, alto custo operacional, além do uso de solventes orgânicos e preparações complexas com ação destrutiva da amostra, o que não permite a reavaliação das medidas.

Neste trabalho, a espectroscopia de absorção eletrônica na região do ultravioleta-visível (UV-vis) do espectro eletromagnético foi empregada na dosagem simultânea da L-dopa e C-dopa em preparações farmacêuticas. Esse método foi escolhido devido à sua simplicidade, eficiência, e baixo custo operacional (ABDEL-GHANY et al., 2017, ERTOKUS, 2019).

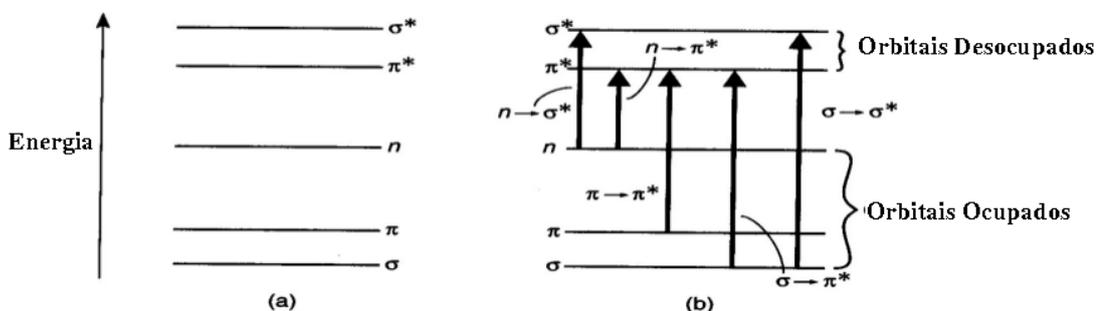
### **3.5 Espectroscopia de absorção na região ultravioleta-visível (UV-Vis)**

Os métodos espectroscópicos em diferentes regiões do espectro eletromagnético são ferramentas valiosas para análises e investigações de sistemas atômicos e moleculares. A espectroscopia de absorção UV-Vis fornece informações úteis para caracterização estrutural bem como informações sobre processos e efeitos químicos presentes nos sistemas investigados, tais como transferência de cargas, distorções moleculares e efeito Jahn-Teller. A espectroscopia de absorção eletrônica UV-Vis compreende a faixa entre 200-400 nm, caracterizada como a região do ultravioleta, e a faixa entre 400-800 nm, que é relativa à região do visível do espectro eletromagnético. A absorção de luz, nesses comprimentos de ondas específicos, ocorre de forma quantizada, correspondendo a uma diferença de energia entre dois níveis de energia eletrônicos. Em moléculas, essas transições eletrônicas acontecem a partir de orbitais moleculares ocupados para orbitais moleculares virtuais (PAVIA et al., 2010).

A transição eletrônica de menor energia envolve frequentemente a excitação de um elétron a partir do orbital molecular ocupado com maior energia, “*Highest Occupied Molecular Orbital* (HOMO)” para o orbital molecular desocupado de menor energia “*Lowest Unoccupied Molecular Orbital*”. Enquanto em grande parte dos sistemas orgânicos essa transição cai na região UV do espectro eletromagnético, em compostos orgânicos, com sistema  $\pi$  conjugado extenso, e em complexos metálicos, a transição HOMO-LUMO cai frequentemente na região do visível (HUHEEY; KEITER; KEITER, 1993).

Na Figura 3, estão mostrados os principais orbitais moleculares envolvidos em algumas das transições eletrônicas presentes em sistemas orgânicos. Como pode ser visto, os orbitais ocupados com menores energias (mais estáveis termodinamicamente) são atribuídos como sendo do tipo  $\sigma$ , envolvendo a formação de ligações simples. Os orbitais moleculares do tipo  $\pi$  apresentam energias maiores, sendo seguidos dos orbitais não ligantes ( $n$ ), que ficam em níveis de energia relativamente mais altos, na região dos orbitais de fronteiras. Em contrapartida os orbitais desocupados apresentam as respectivas atribuições dos orbitais ocupados só que agora com características antiligantes ( $\pi^*$  e  $\sigma^*$ ). As transições eletrônicas podem ser atribuídas como sendo  $\sigma \rightarrow \sigma^*$  e  $\pi \rightarrow \pi^*$ . Essas transições são permitidas por regra de seleção do dipolo elétrico apresentando dessa forma altas intensidades. As transições do tipo  $n \rightarrow \pi^*$  são proibidas por essas regras de seleção apresentando, portanto, baixas intensidades e frequentemente localizadas na região do visível (PAVIA et al., 2010). Esse tipo de transição eletrônica envolve frequentemente transições localizadas em orbitais envolvendo a presença de heteroátomos como mostrando na Tabela 1.

Figura3- Transições eletrônicas UV-Vis em moléculas orgânicas.



Fonte: Adaptado de Pavia et al., (2010).

Tabela 1- Transições eletrônicas do tipo  $n \rightarrow \pi^*$  de acordo com a classificação dos grupos cromóforos.

Classe	Transição	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Log $\epsilon$	Classe	Transição	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Log $\epsilon$
R-OH		180	2,5	R-NO <sub>2</sub>	$n \rightarrow \sigma^*$	271	<1,0
R-O-R	$n \rightarrow \sigma^*$	180	3,5	R-CHO	$n \rightarrow \sigma^*$	190	2,0
R-NH <sub>2</sub>	$n \rightarrow \sigma^*$	190	3,5		$n \rightarrow \sigma^*$	290	1,0
R-SH	$n \rightarrow \sigma^*$	210	3,0	R <sub>2</sub> CO	$\pi \rightarrow \pi^*$	180	3,0
R <sub>2</sub> C=CR <sub>2</sub>	$\pi \rightarrow \pi^*$	175	3,0		$n \rightarrow \sigma^*$	280	1,5
R-C=C-R	$\pi \rightarrow \pi^*$	170	3,0	RCOOH	$n \rightarrow \sigma^*$	205	1,5
R-C≡N	$n \rightarrow \pi^*$	160	<1,0	RCOOR'	$n \rightarrow \sigma^*$	205	1,5
R-N=R-C	$n \rightarrow \pi^*$	340	<1,0	RCONH <sub>3</sub>	$n \rightarrow \sigma^*$	210	1,5

Fonte: Paviaet al., (2010)

Durante as transições eletrônicas, modos vibracionais e rotacionais são também excitados. Isso ocorre devido ao fato que os valores de energias envolvidas nas transições eletrônicas são muito maiores do que aqueles envolvidos nas transições entre os níveis vibracionais e rotacionais.

Informações dessas transições vibracionais e rotacionais podem ser observadas no espectro UV-Vis experimental quando ele se encontra bem resolvido (SKOOG, 2002).

Apesar da radiação ultravioleta resultar na excitação de elétrons do estado fundamental, a interação dos núcleos com os elétrons tem papel muito importante na determinação de quais comprimentos de onda da radiação são absorvidos. Os núcleos determinam com que força os elétrons estão ligados e, assim, influenciam no espaçamento de energia entre os estados fundamental e excitado. A energia característica ligada a essa transição e o comprimento de onda da radiação absorvida passam a ser propriedades de um grupamento molecular e não apenas dos elétrons individualmente. Grupamento de átomos capazes de produzir tal absorção são denominados grupos cromóforos (PAVIA et al., 2010). A seletividade da absorção do ultravioleta permite que grupos característicos das moléculas com graus de complexidade variáveis possam ser reconhecidos (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRIL, 1994). As bandas de absorção são constituídas por linhas muito próximas entre si. Em uma molécula real a banda de absorção típica contém um grande número de linhas. Quando as moléculas estão presentes em solução, a molécula é cercada pelo solvente e a natureza da banda de absorção molecular é influenciada pela presença do solvente, efeito esse conhecido como solvatocromismo, que corresponde ao deslocamento do pico máximo de absorção para diferentes comprimentos de onda (SKOOG, 2002).

Para dosagem de substâncias por meio da espectroscopia de absorção UV-Vis é usada a expressão empírica, conhecida como Lei de Lambert-Beer (Equação 1)

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon c L \quad (1)$$

onde,  $A$  é a absorvância da amostra,  $I_0$  e  $I$  são as intensidades da luz incidente e transmitida na amostra, respectivamente.  $L$  é o caminho óptico, que corresponde ao comprimento da cubeta de quartzo, pelo qual a luz percorre dentro da amostra,  $c$  é a concentração molar da amostra e  $\epsilon$  é a absorvância molar (anteriormente conhecida como coeficiente de extinção). Essa equação mostra que quanto maior o número de moléculas presentes em uma amostra (maior concentração) maior será a extensão dessa absorção.

A lei de Lambert-Beer pode não ser obedecida quando diferentes formas da molécula absorvente estão em equilíbrio, ou quando existe equilíbrio térmico entre os estados fundamental e excitado da molécula absorvente de baixa energia (SKOOG,2002). Na espectroscopia UV-Vis, alguns termos são bastantes explorados na interpretação e atribuições das transições eletrônicas. Termos como deslocamento batocrômico (deslocamento para o vermelho) ou deslocamento hipsocrômico (deslocamento para o azul), correspondem ao deslocamento do pico máximo de absorção de uma banda para regiões com maiores e menores comprimentos de onda, respectivamente. Esses termos geralmente se referem ao deslocamento do pico máximo de absorção de uma banda devido à natureza do solvente (efeito solvatocrômico), ou ao efeito de conjugação eletrônica, ou devido à presença de grupos doadores ou retiradores de densidade eletrônica, geralmente ligados a grupo cromóforos, que tem seus valores de comprimentos de onda tabelados na literatura (PAVIA et al.,2010).

### 3.6 Teoria do Funcional de Densidade

A mecânica quântica obteve uma grande contribuição em 1926, com o desenvolvimento da equação de Schrödinger (Equação 3).

$$H\psi = E\psi \quad (3)$$

Onde  $\Psi$  é a função de onda do sistema investigado, que não apresenta um significado físico claro, mas contém todas as informações químicas para determinar completamente o estado fundamental do sistema, seja ele um átomo, uma molécula ou um sólido. Por outro lado,  $E$  é a energia e  $H$  é o Hamiltoniano contém todos os operadores matemáticos capazes de descrever as características físicas desse sistema e suas interações. Apesar da aparente simplicidade dessa equação, sua resolução analítica somente é possível para sistemas monoelétrônicos, tais como o átomo de hidrogênio. No caso de sistemas multieletrônicos, o primeiro método quântico baseado nos primeiros princípios (*ab initio*) foi desenvolvido dentro da aproximação

Hartree-Fock (HF) (CRAMER, 2004). Essa aproximação falha, entretanto, na descrição completa das interações entre os elétrons do sistema, conhecida como da correlação eletrônica, característica essa de fundamental importância para descrição das propriedades químicas do sistema.

Métodos pós-HF foram desenvolvidos para tentar resolver o problema da correlação eletrônica, que no método HF é descrita de forma média aproximada. Basicamente, a correlação eletrônica pode ser dividida em duas partes, sendo a primeira conhecida como correlação eletrônica estática (CEE) e a segunda como correlação eletrônica dinâmica (CED). Os métodos *ab initio* pós-HF, que tentam descrever a CEE, são os métodos multiconfiguracionais (CAS, RAS, ...), que utilizam mais de um determinante de Slater para descrever a configuração eletrônica do estado fundamental do sistema (função de onda), que no método Hartree-Fock é descrita por apenas um determinante de Slater (JENSEN, 2017). Esses cálculos são importantes somente para descrever sistemas envolvendo átomos pesados onde efeitos relativísticos ocasionam processos decruzamentos dos níveis de energias, levando à necessidade de mais de uma configuração eletrônica para descrever corretamente o seu estado fundamental do sistema. Um bom exemplo desse caso seria sistemas moleculares envolvendo Cu(II), onde os estados eletrônicos  $3d^9 4s^2$  e  $3d^{10} 4s^1$  precisam ser considerados pois eles apresentam uma diferença de energia muito pequena.

A maioria dos métodos pós-HF (CI, MP2, CCSD(T)...) descreve apenas a correlação eletrônica dinâmica, que corresponde a 90% da correlação eletrônica total do sistema. Alguns métodos como CASPT2 descrevem ambos os tipos de correlação CEE e CED. Contudo, todos esses cálculos pós-HF apresentam um grande problema, que é a alta demanda computacional (JENSEN, 2017). Enquanto no método HF, o custo computacional aumenta de acordo com  $N^4$ , onde  $N$  é o número de elétrons, os métodos pós-HF escalonam no mínimo com  $N^5$ ,  $N^6$ , (...). Nesse sentido, esse problema foi amenizado com o desenvolvimento da teoria do funcional de densidade “*DensityFunctionalTheory*” (DFT) (MORGON; COUTINHO, 2007; CRAMER, 2004; JENSEN, 2017). Esse método tem o custo computacional similar ao método HF e é capaz de descrever adequadamente os efeitos de correlação eletrônica.

O método DFT é baseado na aproximação de se usar a densidade eletrônica, no lugar da função de onda do sistema. Essa ideia foi proposta por Thomas e Fermi em 1927, que ficou conhecida como modelo de Thomas-Fermi. Os dois pesquisadores, trabalhando de forma independente, empregaram um modelo estatístico para aproximar a distribuição dos elétrons nos átomos, como a densidade do sistema, que corresponde ao quadrado da função de onda

(Equação 4) e apresenta um significado físico claro, que é a densidade de probabilidade, ou seja, a região onde se tem maior probabilidade de encontrar os elétrons no átomo ou molécula.

$$\rho(\mathbf{r}) = \langle \psi | \psi \rangle \quad (4)$$

A vantagem de se usar a densidade eletrônica está no fato de que a função de onda de  $N$  elétrons depende de  $4N$  (três coordenadas espaciais  $(x, y, z)$  e a coordenada de spin de cada elétron), enquanto, a densidade eletrônica  $\rho$ , independentemente do número de elétrons envolvidos, depende apenas das três coordenadas espaciais,  $x, y, z$ . O único problema é que mesmo sabendo que cada densidade eletrônica produz uma energia para o estado fundamental, o funcional que conecta a densidade eletrônica à energia real do estado fundamental não é conhecido. O desafio do método DFT foi então encontrar esse funcional, que somente foi possível em 1964 com as ideias de Hohenberg e Kohn (Teoremas Hohenberg-Kohn).

### 3.6.1 Teoremas Hohenberg-Kohn

Os dois teoremas de Hohenberg- Kohn (HK) são as ideias básicas da teoria do funcional da densidade (DFT). Eles mostram, de modo geral, que:

**Teorema 1-** Um potencial externo ( $V_{ext}(\mathbf{r})$ ) para os elétrons do sistema, ou seja, aquele que descreve a interação nuclear com os elétrons, é determinado unicamente pela densidade do estado fundamental, de modo que para descrever a dependência da energia do estado fundamental com relação a essa densidade, basta mostrar que essa densidade determina o operador Hamiltoniano ( $H$ ) do sistema e que a sua integração fornece o número de elétrons do sistema (Equação 5).

$$\int \rho(\mathbf{r}) = N \quad (5)$$

Em outras palavras,  $V_{ext}(\mathbf{r})$  é um único funcional da  $\rho(\mathbf{r})$ , desde que  $V_{ext}(\mathbf{r})$  estabelece o operador hamiltoniano,  $H$ . Esse teorema estabelece então que toda observável física, principalmente a energia, pode ser descrita como um funcional da densidade eletrônica do estado fundamental. Para ter certeza de que uma determinada densidade é a densidade no estado fundamental o Teorema 2 estabelece que:

**Teorema 2 -** A densidade eletrônica do estado fundamental poder ser calculada, a princípio, usando o método variacional, onde a energia total calculada desta densidade ( $E[\rho(\mathbf{r})]$ ) não pode ser menor do que a energia real do estado fundamental ( $E_0$ ), como mostrado na equação

6. O nome “funcional vem do fato de que a energia depende de uma função, que na DFT é a densidade, que por sua vez depende das variáveis espaciais, i.e.,  $E[\rho(\mathbf{r})]$ .

$$E[\rho(\mathbf{r})] \geq E_0 \quad (6)$$

### 3.6.2 Método Kohn-Sham

Antes de descrever brevemente sobre o método Kohn-Sham, é importante mencionarmos a definição do hamiltoniano  $H$  independentemente do tempo e não relativístico. Como mostrado na equação 7 o hamiltoniano contém os termos de energia cinética dos núcleos e dos elétrons, bem como os termos de interação eletrostática entre eles.

$$\mathcal{H} = T_N + T_e + V_{Ne} + V_{NN} + V_{ee} \quad (7)$$

Em que, os índices  $N$  e  $e$  são relativos ao núcleo e elétrons, respectivamente. Cada termo dessa equação representa uma parcela das interações físicas existentes no sistema. A expressão para cada um desses termos, em unidades atômicas, pode ser vista a seguir.

- Energia cinética nuclear

$$T_N = - \sum_A \frac{1}{2M_A} \Delta^2_A \quad (8)$$

- Energia potencial entre os núcleos

$$V_{NN} = \sum_A \sum_{B>A} \frac{Z_A Z_B}{|R_A - R_B|} \quad (9)$$

- Energia cinética eletrônica

$$T_e = - \sum_i \frac{1}{2} \nabla^2_i \quad (10)$$

- Energia potencial entre os elétrons

$$V_{ee} = \sum_i \sum_{j>i} \frac{1}{|r_i - r_j|} \quad (11)$$

- Energia potencial elétron-núcleo

$$V_{Ne} = - \sum_i \sum_A \frac{Z_A}{|R_A - r_i|} \quad (12)$$

No método DFT, assim como no HF, a aproximação Born-Oppenheimer é utilizada. Essa aproximação consiste na separação do movimento nuclear do movimento eletrônico. A

razão lógica para efetuar essa aproximação é que os elétrons possuem uma massa muito menor que os núcleos e se combinam quase que imediatamente a qualquer disposição nuclear. Desta maneira, o termo de energia cinética nuclear no hamiltoniano é considerado como sendo igual a zero, enquanto o termo de energia potencial elétron-núcleo se torna uma constante.

De acordo com os teoremas HK, a energia do estado eletrônico fundamental é então expressa como sendo

$$E_0 \leq E[\rho(r)] = T_e[\rho_0] + E_{ee}[\rho_0] + E_{Ne}[\rho_0] \quad (13)$$

Os teoremas de HK não fornecem, entretanto, qualquer orientação sobre como construir os funcionais de densidade apresentados acima. Somente o funcional de densidade  $E_{Ne}[\rho_0]$  é exatamente conhecido. Esse problema foi resolvido em 1965, quando os trabalhos de Kohn em conjunto com Lu Sham possibilitaram o desenvolvimento do método Kohn-Sham (KS), tornando os teoremas de HK viáveis para aplicações diretas em sistemas atômicos e moleculares (ALVES,2016).

No esquema KS, a densidade de um sistema fictício com elétrons não interagentes é considerada como sendo capaz de representar a densidade do estado fundamental de um sistema real. A função de onda de tal sistema não interagente pode ser representada por um determinante de Slater (JENSEN,2017). Dessa maneira, a parte cinética de tal sistema não interagente é similar a parte cinética do método Hartree-Fock. Usando este funcional da energia cinética para o sistema real, um termo de correção é, portanto, adicionado de modo que onde  $T_s[\rho]$  é a energia cinética de um sistema não interagente e  $T_c[\rho]$  é a correção cinética devido a interação elétron-elétron. Comparado a  $T_s[\rho]$ ,  $T_c[\rho]$  é considerado ser uma pequena contribuição.

$$T[\rho] = T_s[\rho] + T_c[\rho] \quad (14)$$

O funcional de densidade exato para parte clássica de coulomb da interação de dois elétrons é

$$J[\rho] = \iint \frac{\rho_{x_1} + \rho_{x_2}}{r_{12}} dx_1 dx_2 \quad (15)$$

enquanto faltam ainda conhecer as interações elétron-elétron não-clássicas, conhecidas como interações de troca e correlação. No método KS, esse termo e a parte de correção da energia cinética são colocados dentro do funcional aproximado, que é chamado de funcional de troca e correlação,

$$E_{xc}[\rho] = E_x[\rho] + E_c[\rho] + T_c[\rho] \quad (16)$$

Dessa maneira, a energia eletrônica total é expressa como sendo

$$E_{\text{elect}}[\rho] = T_s[\rho] + \int V_{\text{ext}}\rho(x) + J[\rho] + E_{xc}[\rho] \quad (17)$$

Como a forma exata funcional de correlação de troca  $E_{xc}[\rho]$  empregada no método kohn-sham é desconhecida, é preciso usar aproximações fisicamente justificadas o mais precisas possíveis. Apesar do sucesso do desenvolvimento da correlação de troca funcional orientada para a descrição precisa da estrutura energética e molecular dentro da estrutura do método kohn-sham, o trabalho intensivo nessa área continua. Os funcionais de correlação e de troca desenvolvidos até o momento podem ser classificados em três grupos principais os funcionais baseados na Aproximação da Densidade Local (LDA), Aproximação do Gradiente Generalizado (GGA) e aproximação meta-GGA (RINKEVICIUS, 2004).

### 3.6.3 Funcionais de Densidade

Desde que o funcional de troca e correlação,  $E_{xc}[\rho]$ , não é conhecido, o desenvolvimento desse funcional tem sido um importante tópico através da história do DFT (JENSEN, 2017). O primeiro passo desse processo é o conhecimento claro das características químicas do sistema a ser investigado. Isso porque existem vários funcionais disponíveis para os cálculos DFT, conhecer as características químicas que eles descrevem nos guia na melhor escolha do funcional a ser empregado para o nosso sistema. Contudo ainda existem problemas, que ainda não foram contornados pelos diferentes funcionais disponíveis. Conhecê-los claramente é um importante passo para realizarmos investigações eficientes.

O primeiro problema observado nos funcionais disponíveis é conhecido como comportamento assintótico. Em sistemas moleculares, se um elétron é localizado longe do núcleo da molécula, ele estará blindado pela presença dos demais elétrons. Portanto, a carga formal desse elétron é dada como sendo  $(Z-(N-1))$ , onde  $Z$  é o número total de carga nuclear e  $N$  é número de elétrons do sistema. Dessa maneira, esse elétron é considerado se movendo num campo eletrônico dado por,

$$V(r) = \frac{Z-(N-1)}{r} \quad (18)$$

Analisando a interação de coulomb entre elétrons e aquela entre elétrons e núcleos, nós descobrimos que no limite assintótico  $r \rightarrow \infty$ , o potencial de troca do um elétron é  $-1/r$ . O funcional de troca HF mostra corretamente esse decaimento  $(-1/r)$  para grandes distâncias  $(r)$  enquanto a maioria dos funcionais disponíveis da DFT falha nessa descrição. De fato, esses funcionais mostram um decaimento exponencial ao invés de  $-1/r$ . Essa falha gera problemas nas energias dos orbitais obtidos na DFT. Dessa maneira, propriedades químicas

envolvendo as diferenças de energias orbitais, como energia de ionização, eletroafinidade, etc, não são adequadamente descritas quando comparadas os valores experimentais.

Outro problema dos funcionais da DFT é conhecido como descontinuidade derivada. O potencial de troca e correlação na verdade salta a menos de uma constante quando o número de elétrons passa através de uma quantidade inteira. Esse fenômeno reflete o potencial químico para transferência de carga entre dois sistemas. Novamente, a parte de troca HF modela bem esse comportamento enquanto nenhum dos funcionais da DFT disponíveis, que são caracterizados por potencias contínuos em relação à variações no número de elétrons, é capaz de descrever.

O último problema é chamado de auto-interação do elétron, que ocorre quando não há o cancelamento total da parte de auto-interação do funcional de troca e correlação com a parte correspondente das interações de Coulomb. Cancelamento esse que ocorre corretamente no esquema HF. Devido essa interação residual de um elétron com ele mesmo, a DFT fornece resultados errados quando aplicados a sistemas de camada aberta, paramagnéticos. A solução para esses problemas mencionados acima tem sido os funcionais híbridos (B3LYP, B3PW91), que incorporam em alguma extensão a parte de troca HF.

#### 4 METODOLOGIA

Cálculos baseados na Teoria do Funcional da Densidade foram utilizados para investigar as propriedades eletrônicas, geométricas e espectroscópicas da L-dopa e da C-dopa, bem como seus mecanismos de oxidação, que podem ocorrer durante uma variação de pH do meio. Nos cálculos DFT, o funcional de densidade híbrido de troca de Becke, e de correlação de Lee-Yang-Parr (B3LYP) (LEE; YANG; PARR, 1988) foi usado juntamente com o conjunto de base atômico CBSB7 para todos os átomos (MONTGOMERY, 2000). A abordagem restrita (RHS) e não-restrita (UHS) foram usadas nos cálculos de otimização e de frequências vibracionais dos sistemas moleculares com número par e ímpar de elétrons, respectivamente. As geometrias foram totalmente otimizadas sem restrições de simetria. Todas as geometrias otimizadas foram confirmadas no mesmo nível de teoria como sendo mínimos locais, por meio dos cálculos de frequências vibracionais obtidos dentro da abordagem harmônica.

Os espectros de absorção eletrônica UV-Vis de todas as espécies moleculares envolvidas nos mecanismos de oxidação de L-dopa e C-dopa foram calculados dentro da abordagem da Teoria do Funcional de Densidade Dependente do Tempo (*Time Dependent Density Functional Theory* (TD-DFT)) usando o funcional M06L e o conjunto de base atômico def2-SVP para todos os átomos (SCHÄFER; HORN; AHLRICHS, 1992). 25 estados eletrônicos de menor energia foram obtidos a partir das equações de autovalores e considerando a aproximação de excitação vertical (Princípio Franck-Condon). Os cálculos de força do oscilador para cada transição eletrônica foram realizados usando os elementos da matriz de transição dipolar com os mesmos estados de spin dos estados eletrônicos fundamentais (ZHAO; TRUHLAR, 2008), usando para isso a equação 19.

$$f = \frac{4,315 \times 10^{-9}}{n} \int \varepsilon d\bar{\nu} \quad (19)$$

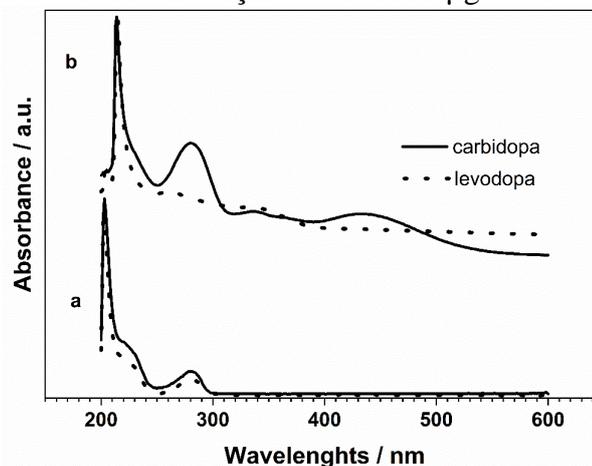
Onde  $n$  é o índice de refração do solvente,  $\varepsilon$  é o coeficiente de extinção molar. Os cálculos de otimização e frequência foram realizados no Gaussian 09 e os cálculos espectroscópicos foram realizados no programa Orca 4.2.0 (NEESE, 2006).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Análises preliminares

Os espectros de absorção UV-Vis da L-dopa e C-dopa em HCl com o valor de pH 3,0 são mostrados na Figura 4a obtidos pela professora Dra. Ângela Leão Andrade na Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) e as condições experimentais estão apresentadas no artigo publicado na revista *Chemical Papers* (ANDRADE et al. 2021). Como pode ser observado, os espectros de absorção na região do ultravioleta (UV) desses dois fármacos se sobrepõem completamente, com a presença de duas bandas localizadas em torno de 210 nm e 280 nm e um ombro localizado em 225 nm. Esse resultado mostra que cada espécie interfere na determinação espectrofotométrica da outra. Isso ocorre de maneira que a espectroscopia UV seria incapaz de ser utilizada para dosar e distinguir os dois analitos analisados. Uma maneira de resolver esse problema foi obtida através da adição de 1 mL de solução de NaOH ( $4,5 \text{ mol L}^{-1}$ ) às soluções ácidas de L-dopa e C-dopa. Os espectros medidos após esse procedimento estão mostrados na Figura 4b e indicam que a interação de L-dopa e C-dopa com NaOH produz uma solução amarela, com absorção estendendo até a faixa visível (Vis) do espectro eletromagnético, mostrando que os perfis de absorção desses dois analíticos podem ser agora diferenciados e a sua dosagem simultânea pode ser realizada. As bandas do espectro da C-dopa apresentam maior intensidade do que aquelas observadas para L-dopa. A principal diferença com relação aos espectros da Figura 4a é o aparecimento de uma nova banda com baixa intensidade localizada em 440 nm no espectro da C-dopa.

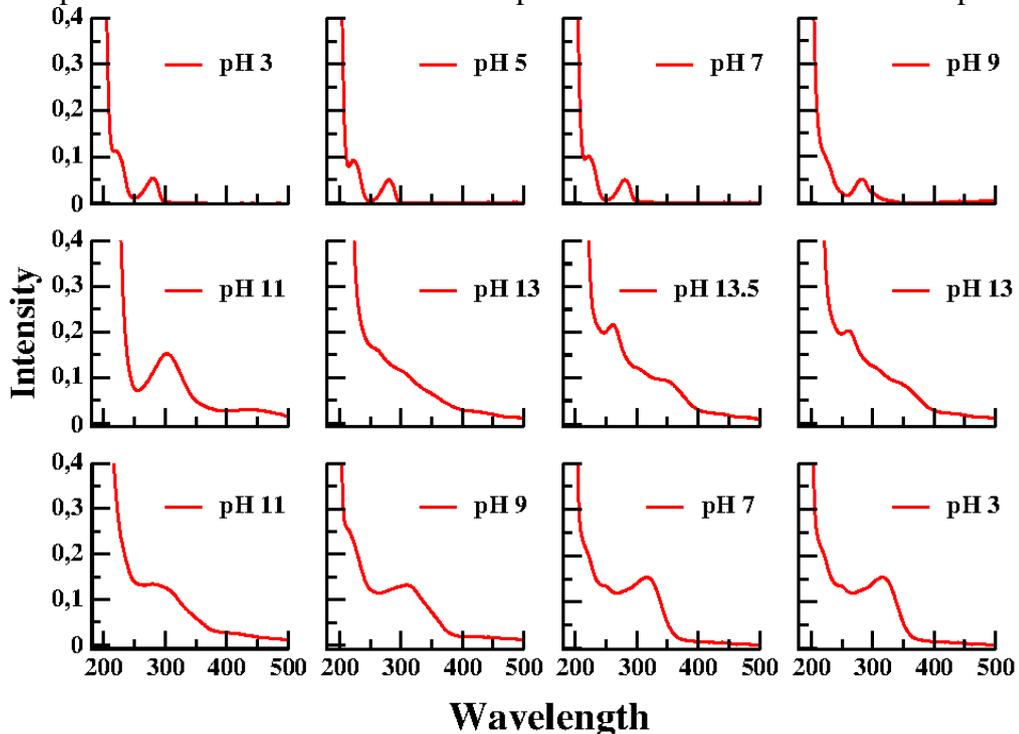
Figura 4- Espectro de absorção eletrônica UV-Vis experimentais: a) C-dopa e L-dopa, em HCl ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ); b) C-dopa e L-dopa, após adição de NaOH ( $4,5 \text{ mol L}^{-1}$ ). Ambos os princípios ativos na concentração inicial de  $10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ .



Fonte: Da autora (2021).

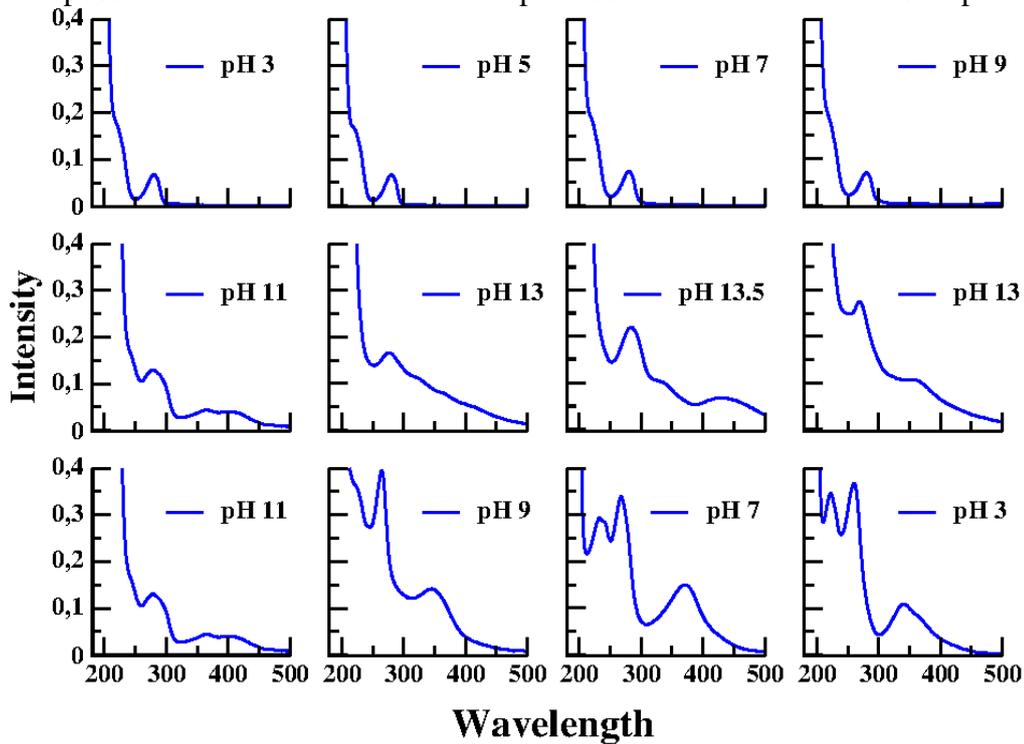
De modo geral, os espectros em NaOH indicam que apesar das semelhanças estruturais iniciais entre os analitos isolados, diferentes produtos desses fármacos devem estar presentes após adição dessa solução básica. Com o objetivo de obter mais informações sobre o mecanismo químico envolvido no procedimento experimental realizado no presente estudo, os espectros de absorção UV-Vis da L-dopa e C-dopa dissolvidos em solução de HCl(0,1 mol L<sup>-1</sup>) foram medidos e depois monitorados após a adição de quantidades específicas de solução de NaOH(4,5 mol L<sup>-1</sup>) de modo a fixar diferentes valores de pH do meio. Os espectros de absorção UV-Vis de ambos os fármacos, medidos nos diferentes valores de pH do meio, estão mostrados nas Figuras 5 e 6. Um resultado importante de ser notado nesses espectros é que o aumento do pH até o valor 9,0 não foi capaz de modificar o perfil espectral de absorção de ambas as drogas, mostrando espectros praticamente idênticos nesses valores de pH do meio. Este resultado indica, portanto, a presença das mesmas espécies iniciais da L-dopa e C-dopa em solução ácida, mesmo após adição da quantidade de NaOH necessária para atingir esses valores de pH do meio.

Figura 5- Espectros de absorção UV-Vis experimentais da levodopa (L-dopa) e estudo da possibilidade de reversibilidade do processo em diferentes valores de pH do meio.



Fonte: Da autora (2021).

Figura 6- Espectros de absorção UV-Vis experimentais da carbidopa (C-dopa) e estudo da possibilidade de reversibilidade do processo em diferentes valores de pH do meio.



Fonte: Da autora (2021).

EmpH=11,0,entretanto, uma mudança acentuada é observada nos perfis de absorção dessas espécies.No espectro L-dopa, uma banda de baixa intensidade aparece em torno de 440 nm, enquanto a banda de média intensidade sofre um deslocamento de 280 nm para 300 nm. No caso da C-dopa, uma banda de absorção de baixa intensidade começa a aparecer em 400 nm, sendo completamente deslocada para 434 nm,quando o pH alcança o valor de 13,5. Neste espectro, a banda de média intensidade sofre um aumento de intensidade significativo, mas permanece com o pico máximo de absorção praticamente inalterado em 282 nm.

A possibilidade de reversibilidade do processo para ambos os fármacos foi avaliada nos espectros UV-Vis considerando valores de pH gradualmente decrescentes a partir do pH= 13,5. Como pode ser observado nesses espectros, um gradual deslocamento dos picos máximos de absorção ocorre para valores de comprimentos de onda mais baixos, de modo a retornar aos valores iniciais nos espectros em HCl,antes do início da adição deNaOH (4,5 mol L<sup>-1</sup>). Nos espectros da L-dopa, com valores de pH mais baixos, abanda de média intensidade se encontra localizada em torno de 300 nm, enquanto nos espectros análogos da C-dopa, três bandas podem ser visualizadas, com valoresmáximos de absorção localizados em 245, 263 e 345 nm, quando o pH do meio alcança ovalor de 3,0. Vale ressaltar que somente no caso da C-dopa, uma solução incolor é observada nesse valor de pH. Mesmo após 24 horas, a solução de

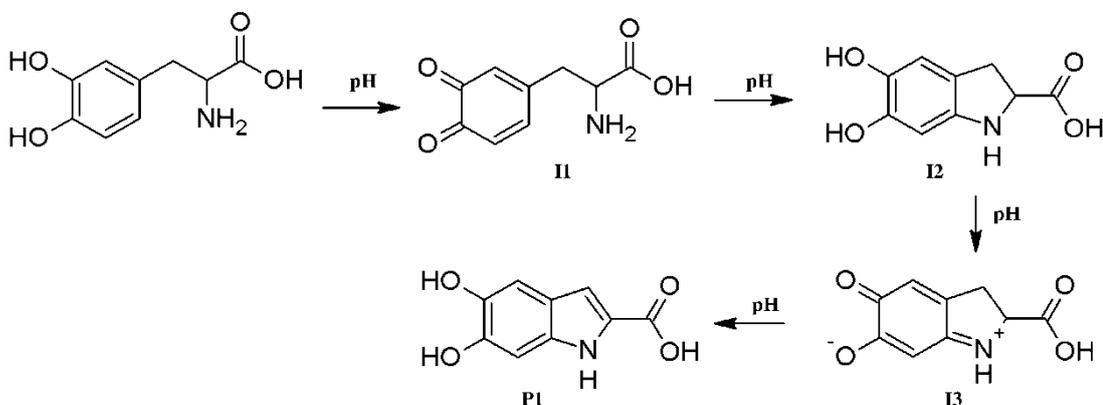
L-dopa em pH=3 permaneceu com uma cor levemente amarelada, indicando ainda a presença do produto de reação da L-dopa na presença de NaOH. De qualquer forma, esses resultados obtidos não foram capazes de definitivamente indicar a reversibilidade do processo para a L-dopa e C-dopa.

Com base nos resultados discutidos acima, a condição de pH=13,5 foi considerada ideal para a determinação simultânea e quantitativa da L-dopa e C-dopa em preparações farmacêuticas. Com o objetivo de entender melhor o mecanismo químico envolvido com esses fármacos após a adição de NaOH, cálculos DFT foram realizados para investigar os possíveis mecanismos de reação que possam explicar o procedimento experimental realizado. Inicialmente, foi investigado o mecanismo de reação envolvendo a L-dopa. Para isso, informações reportadas em um estudo prévio, realizado por Madrakian et al. (2014), foram utilizadas. Nessas informações, o mecanismo de oxidação da L-dopa, adaptado na Figura 7, foi utilizado para explicar as mudanças no espectro de absorção UV-Vis desse fármaco, quando ocorre uma ampla variação de pH do meio após adição de uma solução de base forte.

## 5.2 Processo de Oxidação da L-Dopa

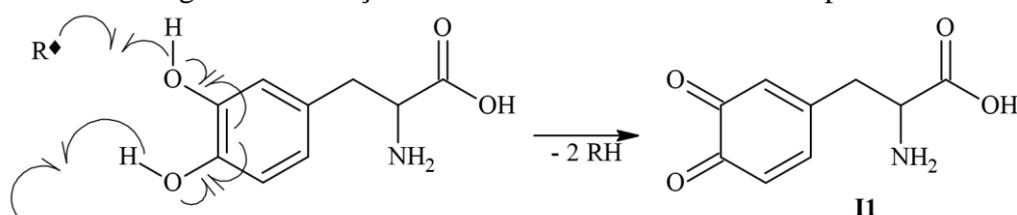
Como mostrado nas Figura 7 e 8, a primeira etapa do mecanismo de oxidação da L-dopa ocorre quando alguma espécie radicalar presente no meio reage com as hidroxilas fenólicas dessa droga, desprotonando esses grupos de forma homolítica. Então, por meio de um processo de ressonância, as duas carbonilas são então estabilizadas nessas posições formando o intermediário **II**.

Figura 7- Adaptação do mecanismo de oxidação da L-dopa proposto por Madrakian et al. (2004).



Fonte: Madrakian et al. (2004).

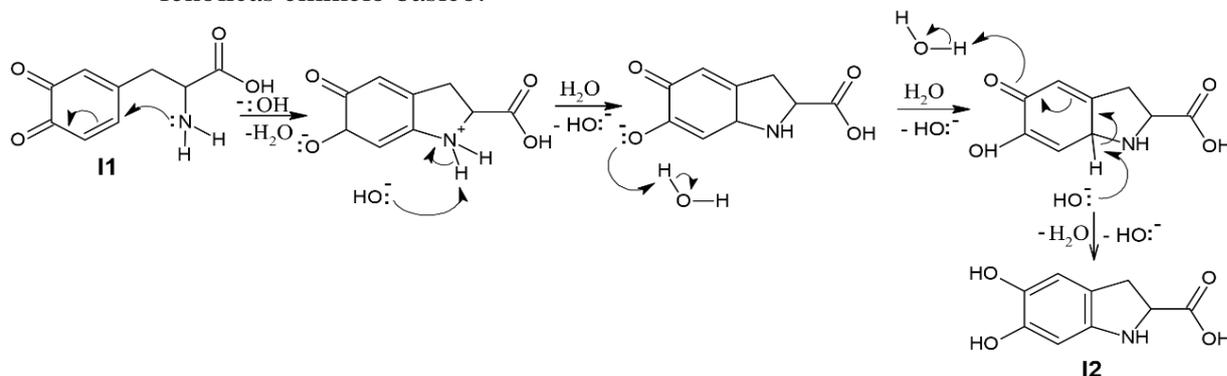
Figura 8- Oxidação das hidroxilas fenólicas da L-dopa.



Fonte: Da autora (2021).

A segunda etapa do mecanismo está mostrada na Figura9 e indica um ataque nucleofílico do par de elétrons do grupo amina do intermediário **I1** ao seu carbono  $\beta$ , que ocorre simultaneamente ao processo de ressonância sobre o grupo acceptor de Michael da L-dopa, *i.e.*, grupo formado por uma dupla do anel conjugada com as carbonilas  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturadas. Essa ressonância leva à formação de uma espécie iônica com um centro eletrofílico no carbono  $\beta$ , tornando-o suscetível ao ataque nucleofílico do grupo amina da L-dopa. Uma ciclização da cadeia alifática ocorre levando a formação do anel azociclopentano, quando o átomo de hidrogênio do carbono  $\gamma$  é retirado por uma hidroxila presente no meio, enquanto as hidroxilas fenólicas são restauradas, formando o intermediário **I2**.

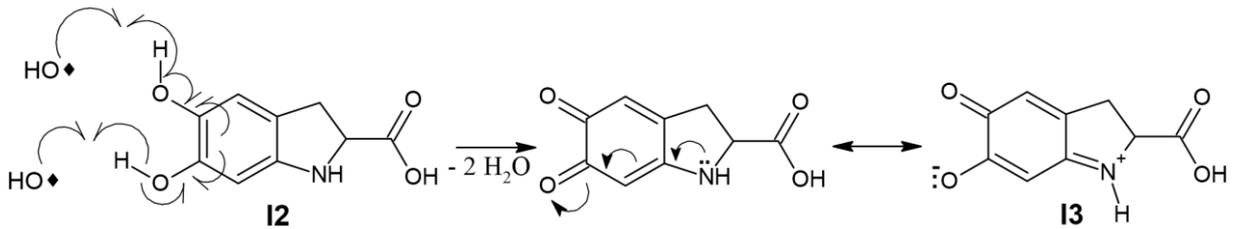
Figura9 – Formação do ciclo azociclopentano da L-dopa e recuperação de suas hidroxilas fenólicas em meio básico.



Fonte: Da autora (2021).

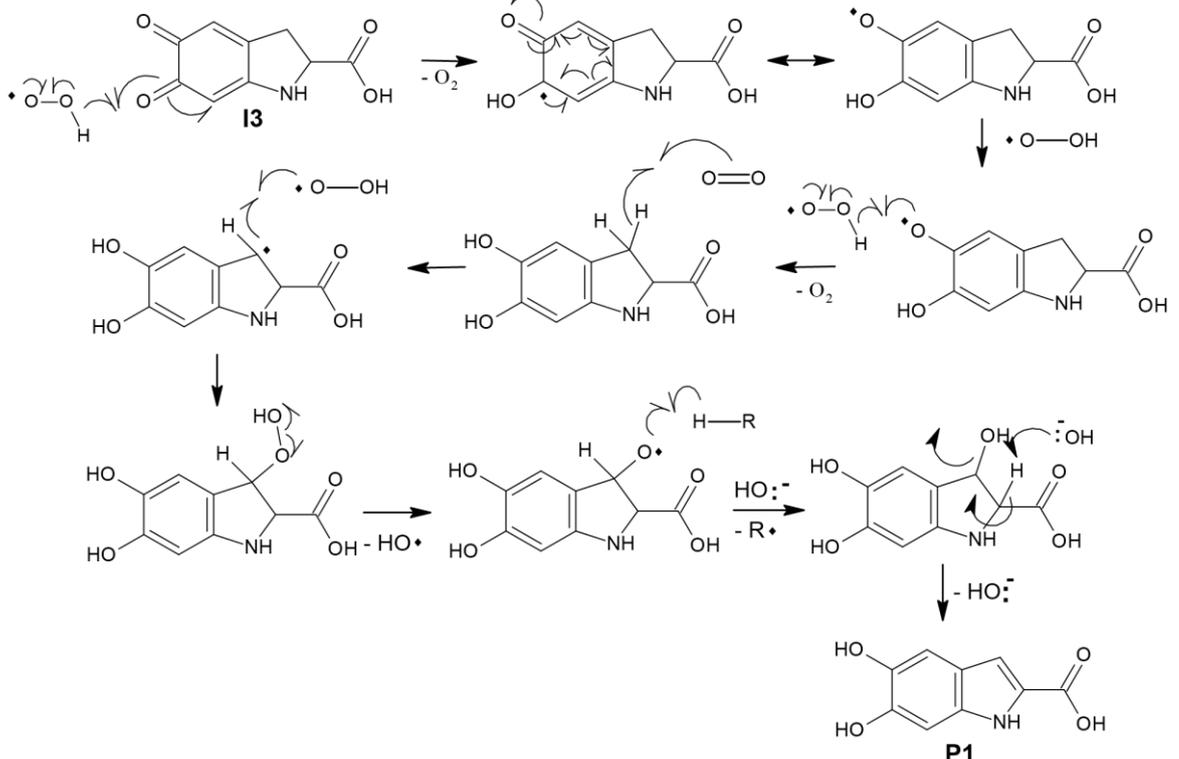
Na Figura10, o terceiro passo de reação ocorre por meio de uma nova oxidação das hidroxilas fenólicas, que permite a ressonância do par de elétrons emparelhados do átomo de nitrogênio mediante o grupo acceptor de Michael, levando à formação de uma espécie zwitteriônica, correspondendo ao intermediário **I3**.

Figura10 – Oxidação das hidroxilas fenólicas da L-dopa, com a formação de uma estrutura zwitteriônica **I3**.



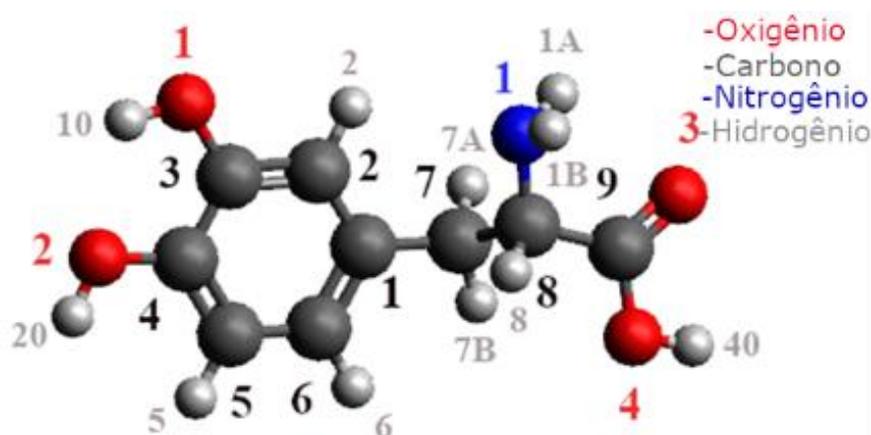
Na quarta etapa desse mecanismo, que está mostrada na Figura11, ocorre a oxidação do intermediário **I3**, quando o oxigênio dissolvido na água oxida, formando um radical hidropéroxido. Esse radical é responsável pela redução e restauração do composto com duas hidroxilas fenólicas e o oxigênio molecular. Por fim, esse composto radicalar sofre uma última redução devido à presença de uma espécie oxigenada no meio e, posteriormente, uma reação de eliminação do tipo **E2** onde é liberado uma hidroxila para o meio e restaurando a ressonância formando o produto **P1**.

Figura11 - Redução do intermediário **I3** através do radical hidropéroxido presente no meio e finalização da oxidação da L-dopa com a formação do produto neutro **P1**.



Todas as estruturas moleculares mostradas na Figura 11 foram otimizadas e identificadas como geometrias termodinamicamente estáveis, por meio dos cálculos DFT de otimização e de frequências vibracionais harmônicas. A Figura 12 exemplifica a estrutura otimizada B3LYP/CBSB7 da L-dopa, enquanto na Tabela 2 estão mostrados seus comprimentos e ângulos de ligações calculados e experimentais de Raio-X. Os valores de comprimentos de ligação calculados envolvendo as ligações C-C variam de 1,386 a 1,555 Å, mostrando uma diferença média de 0,01 Å quando comparados aos valores experimentais. Os maiores desvios são observados para as ligações C3-C4, C7-C8 e C8-C9, que foram calculadas como sendo 1,404, 1,555 e 1,530 Å, enquanto os valores experimentais são de 1,394, 1,596 e 1,540 Å, respectivamente. Considerando os comprimentos de ligação C=O e C-O do grupo carboxílico, diferenças de 0,042 e 0,099 Å foram encontradas entre os valores calculados e experimentais, respectivamente. Os comprimentos de ligações C-O e O-H calculados das hidroxilas fenólicas foram obtidos como sendo 1,363 e 1,378 Å, em excelente acordo com os valores experimentais de 1,366 e 1,373 Å, respectivamente. Finalmente, o comprimento de ligação C8-N1 calculado foi de 1,456 Å, sendo o seu valor experimental de 1,497 Å. As diferenças observadas entre os valores teóricos e experimentais foram menores de 5% e podem ser devido ao fato que os efeitos do meio não foram considerados nos nossos cálculos. Considerando os ângulos de ligação calculados e experimentais, uma diferença média de 1,4 graus foi obtida, sendo os maiores desvios observados para os ângulos C8-C9-O3, C2-C3-O1 e C8-C9-O4, que foram de 6,6; 3,4 e 3,4 graus, respectivamente. Baseados nos resultados geométricos obtidos para L-dopa pode-se concluir que a metodologia B3LYP/CBSB7 mostrou ser adequada na previsão das estruturas moleculares da L-dopa e suas espécies de oxidação (MOSTAD, OTTERSEN, ROMMING, 1971).

Figura 12- Estrutura molecular otimizada B3LYP/CBSB7 da L-dopa em fase gasosa.



Fonte: Da autora (2021).

Tabela 2 - Parâmetros geométricos experimentais e calculados no nível de cálculo B3LYP/CBSB7 da L-dopa em fase gasosa.

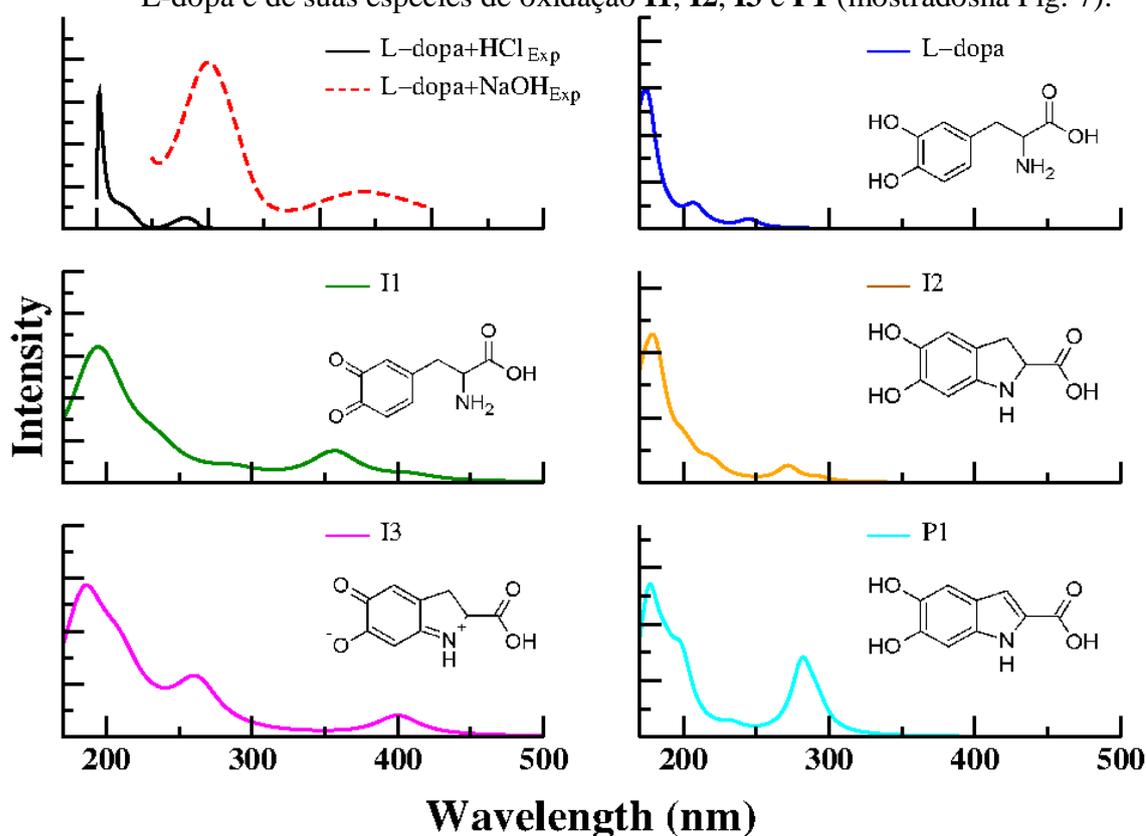
Ligação	Comprimentos de ligação (Å)				
	Calculado	Experimental*	Ligação	Calculado	Experimental*
C1-C2	1,401	1,397	C9-O4	1,354	1,255
C2-C3	1,388	1,396	C2-H2	1,082	0,950
C3-C4	1,404	1,394	C5-H5	1,086	0,980
C4-C5	1,386	1,386	C6-H6	1,084	0,960
C5-C6	1,396	1,396	C7-H7A	1,096	1,020
C6-C1	1,396	1,393	C7-H7B	1,092	0,960
C1-C7	1,512	1,512	C8-H8	1,093	0,960
C7-C8	1,555	1,529	O1-H10	0,965	0,840
C8-C9	1,530	1,540	O2-H20	0,961	0,740
C8-N1	1,456	1,497	O4-H40	0,969	-
C3-O1	1,363	1,366	N-H1A	1,014	0,950
C4-O2	1,378	1,373	N-H1B	1,017	0,930
C9-O3	1,205	1,247	N-H1C	-	1,030
Ângulos de ligação (em graus)					
C1-C2-C3	120,7	120,7	O1-C3-C4	120,2	117,1
C2-C3-C4	119,7	119,4	C3-C4-O2	115,1	116,6
C3-C4-C5	120,1	120,2	O2-C4-C5	124,7	123,2
C4-C5-C6	119,8	120,3	C8-C9-O3	125,0	118,4
C5-C6-C1	120,7	120,1	C8-C9-O4	112,3	115,7
C6-C1-C2	118,8	119,3	O3-C9-O4	122,6	125,9
C2-C1-C7	121,1	120,8	C7-C8-N1	110,9	110,6
C6-C1-C7	120,0	119,9	N1-C8-C9	112,4	110,1
C1-C7-C8	114,0	114,0	-	-	-
C7-C8-C9	108,9	109,7	-	-	-
C2-C3-O1	120,0	123,4	-	-	-

\*Resultados de raio-X da L-dopa obtidos na Ref. [MOSTAD, OTTERSEN, ROMMING, 1971].  
Fonte: Da autora (2021).

Os espectros UV-Vis da L-dopa e de suas estruturas de oxidação estão mostrados na Figura 13, juntamente com os dois espectros experimentais da L-dopa em HCl ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) em pH=3 e após a adição de NaOH ( $4,5 \text{ mol L}^{-1}$ ) em pH 13,5. Como pode ser visto, cada espectro

M06L/def2-SVP mostra um modelo particular e distinto de absorção, indicando características claras para distinguir todas as espécies de oxidação de L-dopa. Nos dois primeiros espectros desta Figura, uma boa concordância pode ser observada entre os espectros teórico e experimental (em HCl) da L-dopa. Três bandas foram calculadas com picos máximos de absorção em 195,5; 204,5 e 249,6 nm, enquanto os respectivos valores no espectro experimental estão em torno de 203, 215 e 280 nm, respectivamente. Uma diferença de 30,4 nm é observada para banda de menor intensidade calculada e experimental, que pode ser explicada pela aproximação teórica utilizada, que não levou em consideração os efeitos do solvente no qual os espectros foram medidos experimentalmente. Como pode ser visto na Tabela 3, essa banda de em 249,6 nm é atribuída como sendo uma transição eletrônica do tipo  $\pi \rightarrow \pi^*$  sobre o anel aromático da L-dopa, envolvendo os orbitais HOMO  $\rightarrow$  LUMO, que estão mostrados na Figura 14.

Figura 13 - Os espectros de absorção UV-Vis experimentais e teóricos (M06L/def2-SVP) da L-dopa e de suas espécies de oxidação **I1**, **I2**, **I3** e **P1** (mostrados na Fig. 7).



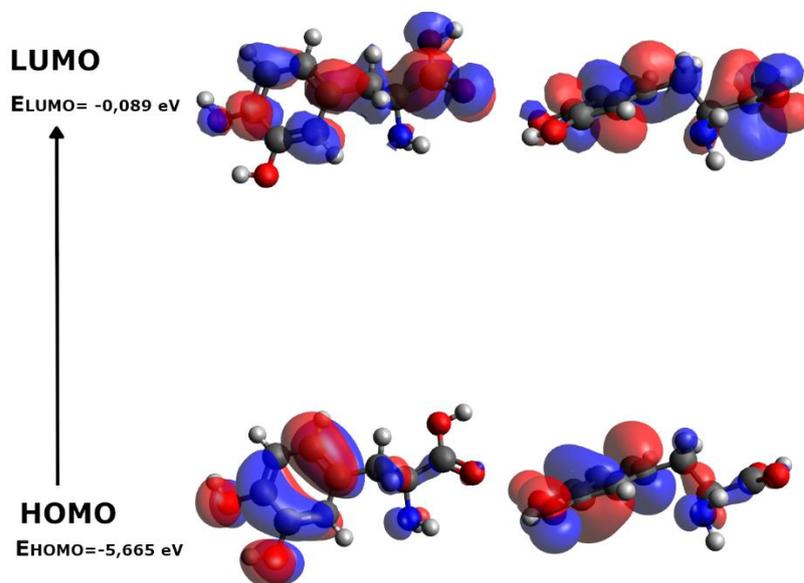
**Wavelength (nm)**

Fonte: Da autora (2021).

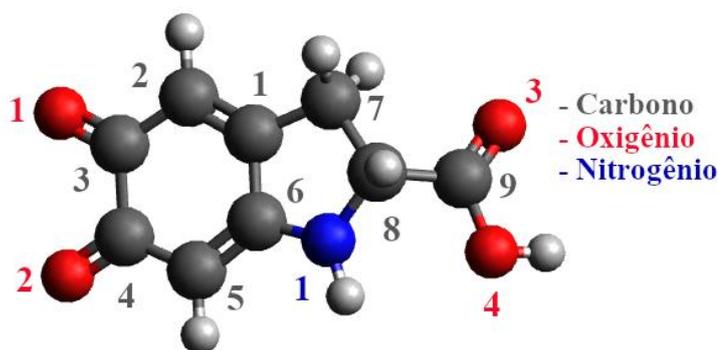
Como pode ser visto na Figura 14, o orbital LUMO apresenta seu caráter  $\pi^*$  estendido sobre o anel aromático, com participação dos orbitais *p* localizados sobre o grupo carboxílico da L-dopa. A diferença de energia HOMO-LUMO foi calculada no nível de

cálculo M06L/def2-SVP como sendo 5,576 eV. Finalmente, as demais bandas calculadas em 195,5 e 204,5 nm correspondem também às transições eletrônicas do tipo  $\pi \rightarrow \pi^*$  sobre o anel aromático da L-dopa, envolvendo os orbitais HOMO  $\rightarrow$  LUMO+2 e HOMO-1  $\rightarrow$  LUMO, respectivamente. Retornando aos espectros UV-Vis mostrados na Figura 13, pode ser notado que os espectros M06L/def2-SVP das espécies intermediárias **I1** e **I2**, bem como do produto **P1**, apresentam dois picos máximos de absorção, que estão localizados em 208,0 e 359,5 nm para **I1**, em 189,7 e 286,0 nm para **I2** e em 177,10 e 282,3 nm para **P1**, sendo que no espectro do produto **P1**, existe ainda a presença de um ombro localizado em 199,4 nm. Uma comparação direta entre os espectros teóricos e experimental da L-dopa após a adição de NaOH mostra que apenas no espectro do intermediário zwitteriônico **I3** aparece uma banda de baixa intensidade localizada na região visível em 400,2 nm, sendo o valor no espectro experimental localizada em 426,3 nm. Duas outras bandas de alta e média intensidade foram calculadas em 205 e 270 nm, com os valores experimentais em NaOH localizados em torno de 202 e 300 nm. Essas três bandas são atribuídas como transições eletrônicas do tipo de  $\pi \rightarrow \pi^*$  sobre os dois anéis do intermediário **I3**, com sua banda na região do visível envolvendo os orbitais HOMO-LUMO, que estão mostrados na Figura 16.

Figura 14- Orbitais HOMO e LUMO M06L/def2-SVP da L-dopa.



Fonte: Da autora (2021).

Figura15 –Estrutura otimizada B3LYP/CBSB7 do intermediário **I3** da L-dopa.

Fonte: do autor (2021).

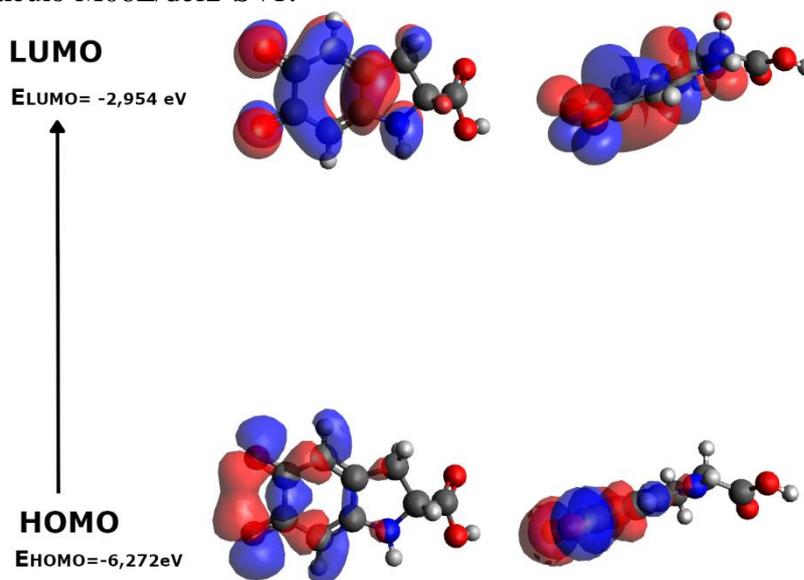
A diferença de energia M06L/def2-SVP entre esses dois orbitais moleculares é de 3,3 eV, um valor muito menor do que aquele calculado para a L-dopa (5,6 eV), indicando, dessa maneira, uma maior reatividade química para esse intermediário zwitteriônico **I3**. Comparado com espectro experimental da L-dopa em HCl, no qual essa transição eletrônica HOMO-LUMO está localizada em 280 nm, um forte deslocamento para o azul dessa banda ocorreu no espectro do intermediário **I3**, cuja localização é em 426 nm. Esse resultado pode ser explicado pelo aumento na extensão de ressonância eletrônica sobre os dois anéis aromáticos, presentes no intermediário zwitteriônico **I3**.

Tabela 3 - Atribuições das transições eletrônicas envolvidas nas bandas do espectro de absorção UV-Visda L-dopa obtidas no nível de cálculo M06L/def2-SVP.

Comprimento de onda (nm)	Força do Oscilador	Orbitais	Atribuição	DELTA E(eV)
195,5	0,553771963	HOMO-1 → LUMO+2	$\pi \rightarrow \pi^*$ envolvendo os orbitais pz carbonos e oxigênios do anel aromático → orbital pzC(1,2,3,4,8); O(1,2,3)	6,902
204,5	0,041894453	HOMO-1 → LUMO	$\pi \rightarrow \pi^*$ envolvendo os orbitais pz dos carbonos e oxigênios do anel aromático → orbitais pz C(1,2,4,5,9); O(3,4)	6,343
249,6	0,063613670	HOMO → LUMO	$\pi \rightarrow \pi^*$ envolvendo os orbitais pz dos carbonos C(1,2,3,4,6); O(1,2) → Orbital pz C(1,2,4,5,9); O(1,2)	5,576

Fonte: Da autora (2021).

Figura 16 – Orbitais HOMO e LUMO do intermediário **I3** da L-dopa obtidos no nível de cálculo M06L/def2-SVP.



Fonte: Da autora (2021).

Tabela 4– Atribuições das transições eletrônicas envolvidas nas bandas do espectro de absorção UV-Vis do intermediário **I3** obtidas no nível de cálculo M06L/def2-SVP.

Comprimento de onda (nm)	Força do Oscilador	Orbitais	Atribuição	DELTA E (eV)
205	0,299353422	HOMO-1 → LUMO+3	$\pi \rightarrow \pi^*$ envolvendo os orbitais pz C (1,2,5,6); N (1) e O (3) → orbitais pz C (1,3,4,5,6); N (1) e O (1,2).	6,833
270	0,174683075	HOMO-3 → LUMO	$\pi \rightarrow \pi^*$ envolvendo os orbitais pz C (1,2,7,8); N (1) e O (2) → orbitais pz dos carbonos e oxigênios do anel aromático além do nitrogênio.	4,912
400,2	0,073375903	HOMO → LUMO	$\pi \rightarrow \pi^*$ envolvendo os orbitais pz C (2,3,4,5); O (1,2) → orbitais pz dos carbonos e oxigênios do anel aromático além do nitrogênio.	3,318

Fonte: Da autora (2021).

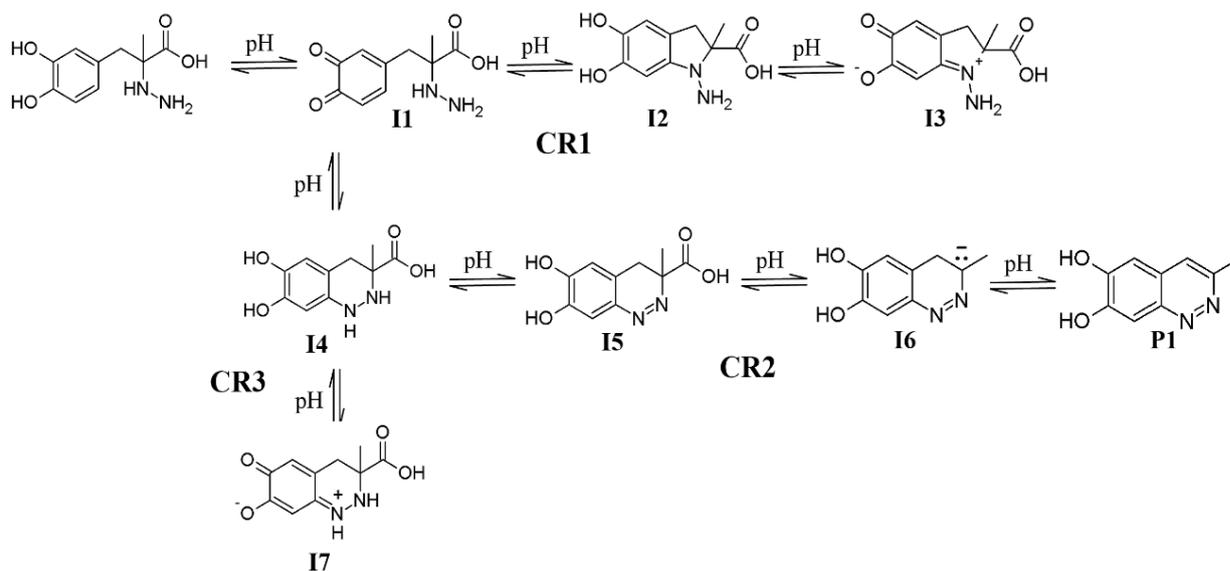
Os resultados B3LYP/CBSB7 das energias livres de Gibbs de todas as estruturas otimizadas da L-dopa e de suas espécies de oxidação (Figura 7) indicam condições termodinâmicas favoráveis para o mecanismo proposto por Madrakian et al. (2004). Considerando como referência a energia da L-dopa, a estrutura zwitteriônica **I3** é, de fato, mais

estável ( $-21,6 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) do que aquela otimizada para o produto **P1** ( $-18,3 \text{ kcal mol}^{-1}$ ). Esse resultado está em acordo com estudos anteriores que apontam condições termodinamicamente mais favoráveis para os isômeros zwitteriônicos de aminoácidos, quando essas espécies estão presentes em solventes próticos. De maneira geral, os resultados DFT obtidos nesse trabalho foram capazes de fornecer evidências importantes para indicar que o processo de oxidação, proposto por Madrakian et al. (2004), bem como por Bullock e Harley-Mason (1951) e Heacock (1959), deve de fato, ocorrer com a L-dopa, quando essa está inicialmente em HCl e posteriormente com a adição de NaOH.

### 5.3 Mecanismos de oxidação e resultados computacionais da C-dopa

Para investigar a possibilidade da oxidação da C-dopa, três vias de reação foram propostas no presente estudo e estão mostrados na Figura 17. Inicialmente, os três caminhos de reação ocorrem com a desprotonação das hidroxilas fenólicas da C-dopa via um processo radicalar, que leva a formação do intermediário **I1** com duas carbonilas  $\alpha,\beta$ -insaturadas nessas posições.

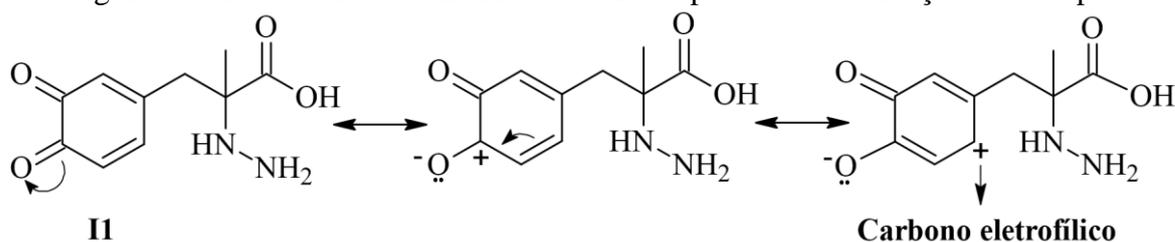
Figura 17- Mecanismos de reação para oxidação da C-dopa.



Fonte: Da autora (2021).

O primeiro caminho de reação, denominado CR1, se inicia na Figura 18 com o intermediário **I1** sofrendo uma ressonância eletrônica, que envolve o grupamento acceptor de Michael (carbonilas  $\alpha,\beta$ -insaturadas), levando a formação de uma espécie oxidada com um centro eletrofílico localizado no carbono  $\beta$ .

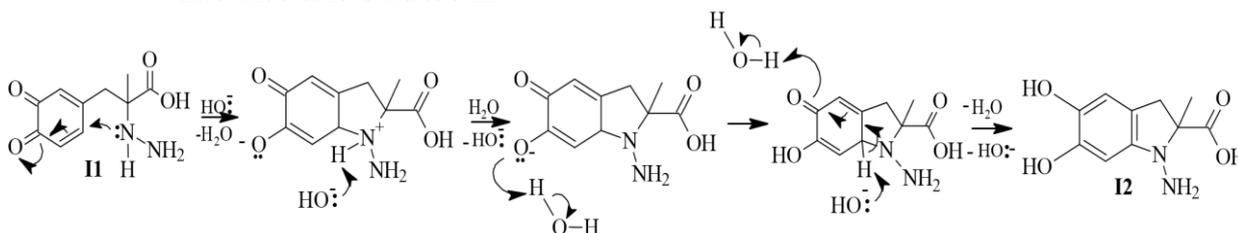
Figura 18 – Ressonância do intermediário I1 do processo de oxidação da C-dopa.



Fonte: Da autora (2021).

Em seguida na Figura 19, o par de elétrons do nitrogênio diretamente conectado à cadeia lateral ataca o carbono  $\beta$  levando à formação de um cicloazopentano e mudando a hibridização desse mesmo carbono de  $sp^2$  para  $sp^3$ . A restituição das hidroxilas fenólicas ocorre envolvendo uma molécula de solvente que estabiliza o intermediário **I2**.

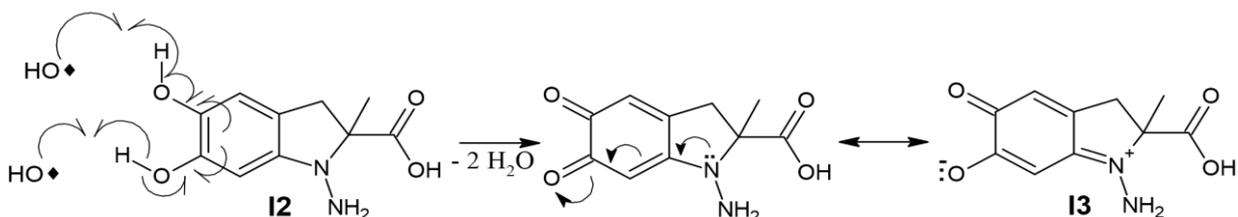
Figura 19 - Ataque nucleofílico do nitrogênio da cadeia lateral da C-dopa para formação do intermediário oxidado **I2**.



Fonte: Da autora (2021).

Posteriormente, na Figura20, o intermediário **I3** zwitteriônico é formado quando novamente a oxidação das hidroxilas fenólicas do intermediário **I2** acontece, enquanto o processo de ressonância acontece envolvendo o par de elétrons do nitrogênio do anel e o grupo aceptor de Michael.

Figura20- Oxidação das hidroxilas fenólicas da C-dopa para a formação do intermediário **I3**.

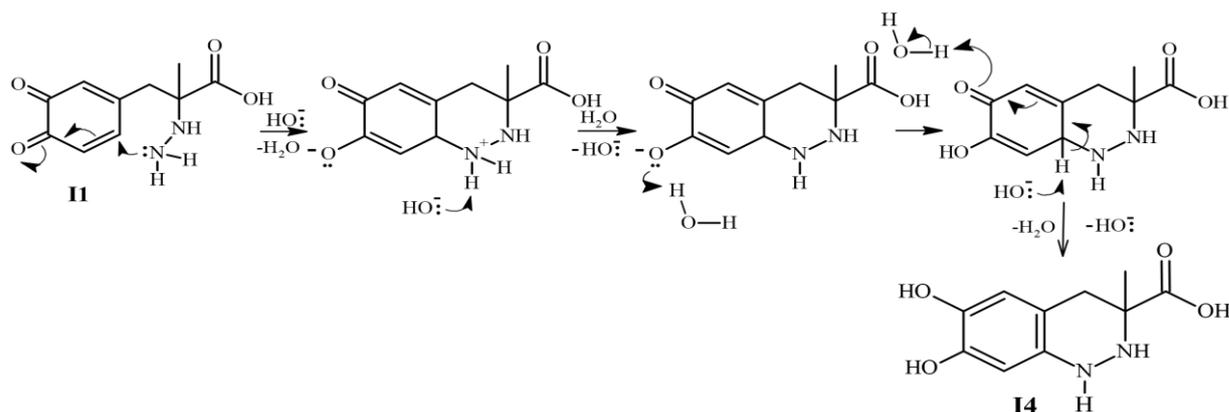


Fonte: Da autora (2021).

Na Figura21, está demonstrado o outro caminho de reação denominado CR2 que se inicia por meio de uma ciclização alternativa no intermediário **I1**, onde ocorre um ataque nucleofílico do nitrogênio terminal do grupo hidrazina ao carbono  $\beta$  do anel, levando

a formação do ciclo piridazina. As hidroxilas presentes no meio capturam então o hidrogênio do carbono  $\beta$ , no qual o nitrogênio se conectou covalentemente, levando à formação de uma dupla ligação no heterocíclico, enquanto a restituição das hidroxilas fenólicas acontece com a participação de moléculas de água do solvente, levando a formação do intermediário **14**.

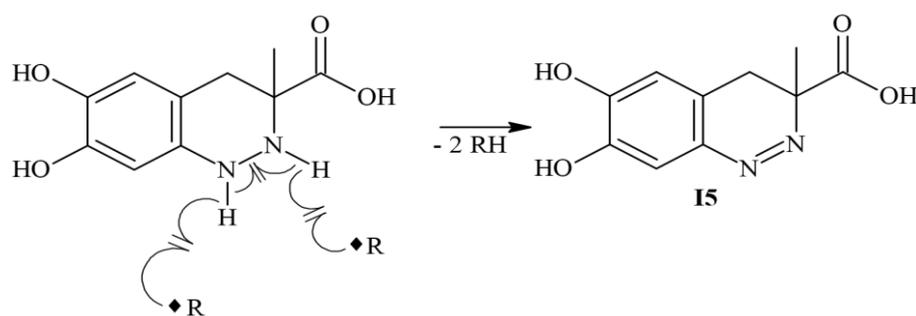
Figura21 – Ataque nucleofílico do nitrogênio terminal do grupo hidrazina da C-dopa.



Fonte: Da autora (2021).

O próximo passo do mecanismo (CR2) pode ser visto na Figura22 e, como pode ser observado, se inicia por meio de uma reação radicalar, onde os hidrogênios ligados aos átomos de nitrogênios do intermediário **14** são capturados, levando à oxidação do grupamento hidrazina, com formação de uma ligação dupla  $\text{N}=\text{N}$  no anel do intermediário **15**.

Figura22– Oxidação dos nitrogênios conjugados da C-dopa.

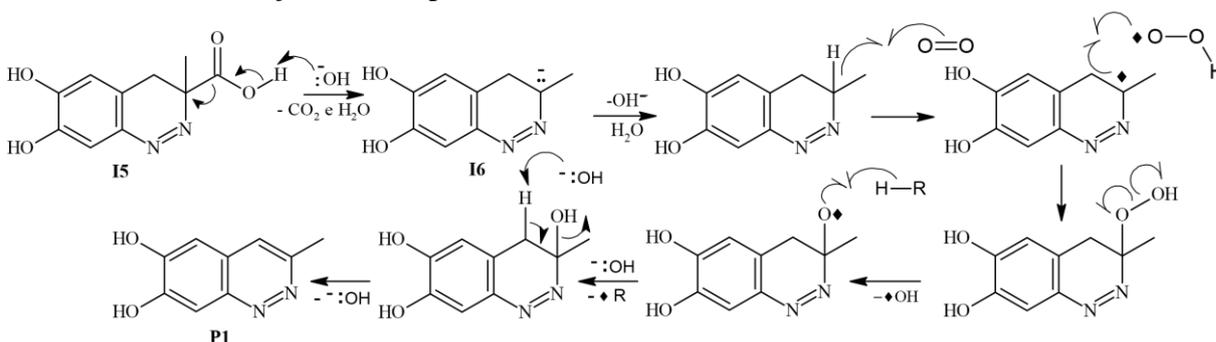


Fonte: Da autora (2021).

As próximas etapas do caminho CR2 estão mostrados na Figura23, que primeiramente envolve a descarboxilação do intermediário **15**, no qual as hidroxilas presentes no meio agem desprotonando o grupo ácido da C-dopa, favorecendo o processo de ressonância de modo que uma espécie aniônica (intermediário **16**) é estabilizada, enquanto uma molécula de  $\text{CO}_2$  é liberada, posteriormente ocorre a protonação do centro nucleófilo no intermediário **16**,

viabilizada pela presença da água como solvente prótico e, por fim, uma hidroxila entra no carbono que sofreu a descarboxilação mediante a reações de oxidação, sendo eliminada por meio do mecanismo de uma reação do tipo **E2**, dando origem ao **P1**. Essa via de reação CR2 tem sido previamente relatada na literatura por Gasowska (2009), indicando que esse mecanismo poderia explicar a oxidação da C-dopa na presença do fostato de sódio (GASOWSKA-BAJGER et al, 2009).

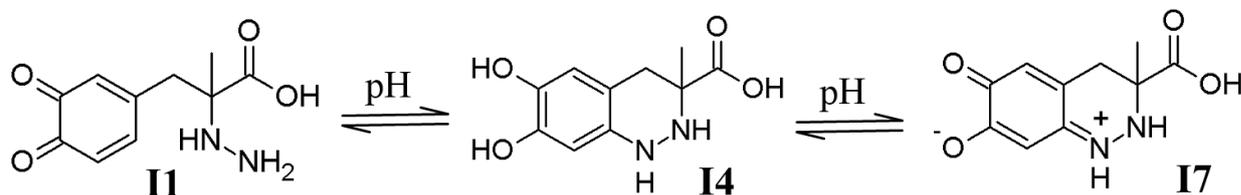
Figura 23– Formação do intermediário **I6** e do produto **P1** envolvidos no caminho CR2 para a oxidação da C-dopa.



Fonte: Da autora (2021).

A última via de reação, denominada de CR3, está demonstrada na Figura 24 que indica, assim como no caminho CR2 (Figura 21), a participação dos intermediários **I1** e **I4**. No entanto, para a formação do intermediário **I7** o processo de descarboxilação pode deixar de ocorrer, e um mecanismo semelhante a formação do intermediário I3 acontece e um processo de ressonância leva ao último intermediário desse caminho de reação.

Figura 24- Formação do intermediário **I4** e o processo de ressonância levando a formação do intermediário **I7**.



Fonte: Da autora (2021).

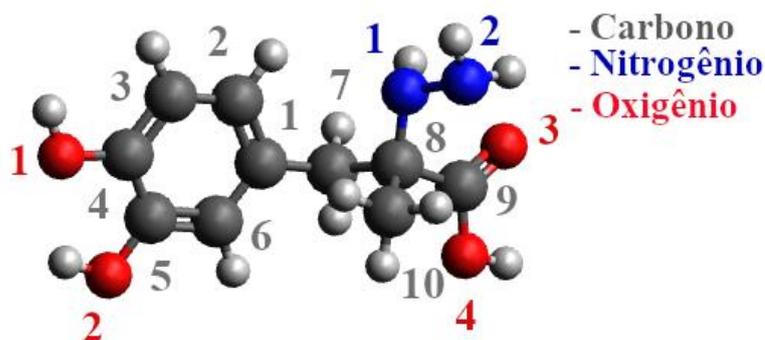
Vale a pena notar que, embora a formação de um sistema cíclico de seis membros (CR2) e um de cinco membros (CR1) envolvam uma variação de entalpia semelhante, o mesmo não é válido quando se analisa a variação de entropia desses dois processos. A formação de um sistema cíclico de cinco membros envolve uma menor redução de entropia

do que o anel de seis membros, o que torna a formação do sistema cíclico de seis membros termodinamicamente menos favorável.

Cálculos B3LYP/CBSB7 de otimização e frequências vibracionais foram realizados para C-dopa e todas as suas espécies de oxidação, que estão mostradas na Figura 17. Por meio dos cálculos de frequências vibracionais, todas as estruturas moleculares otimizadas foram identificadas como estruturas de mínimos termodinamicamente estáveis. A estrutura otimizada da C-dopa está exemplificada na Figura 25 e seus comprimentos e ângulos de ligação estão listados na Tabela 5. Como pode ser visto os valores de comprimentos de ligação calculados envolvendo as ligações C-C variam de 1,388 a 1,563 Å, mostrando uma diferença média de 0,007 Å dos valores GGA/BLYP obtidos por Frazão et al. (2013). As maiores diferenças são observadas para as ligações C7-C8 e C8-C9, com os valores B3LYP/CBSB7 obtidos como sendo de 1,542 e 1,563 Å, enquanto os valores GGA/BLYP foram de 1,564 e 1,551 Å, respectivamente. Diferenças de 0,010 e 0,006 Å foram observadas entre os valores calculados dos comprimentos de ligação C=O e C-O, respectivamente.

Os comprimentos de ligações C-O e O-H B3LYP/CBSB7 das hidroxilas fenólicas foram obtidos como sendo 1,363 e 1,378 Å, com valores muito próximos daqueles obtidos no nível de cálculo GGA/BLYP, *i.e.*, 1,371 e 1,383 Å, respectivamente. Maiores discrepâncias foram observadas entre os resultados B3LYP/CBSB7 e GGA/BLYP para os comprimentos de ligação C8-N1 e N1-N2, cujos valores calculados para o primeiro caso foram de 1,467 e 1,486 Å, enquanto para segundo caso os valores foram obtidos como 1,431 e 1,473 Å, respectivamente. Finalmente, considerando os ângulos de ligação mostrados na Tabela 5, uma diferença média de 1,64 graus foi obtida entre os valores B3LYP/CBSB7 e GGA/BLYP, sendo as maiores diferenças observadas para os ângulos C8-C9-C10, C8-C9-N1 e HA-N2-HB, que foram de 4,05, 7,21 e 4,12 graus, respectivamente.

Figura 25 - Estrutura otimizada B3LYP/CBSB7 da C-dopa.



Fonte: Da autora (2021).

Tabela5 - Parâmetros teóricos em nível B3LYP/CBSB7 da molécula de C-dopa.

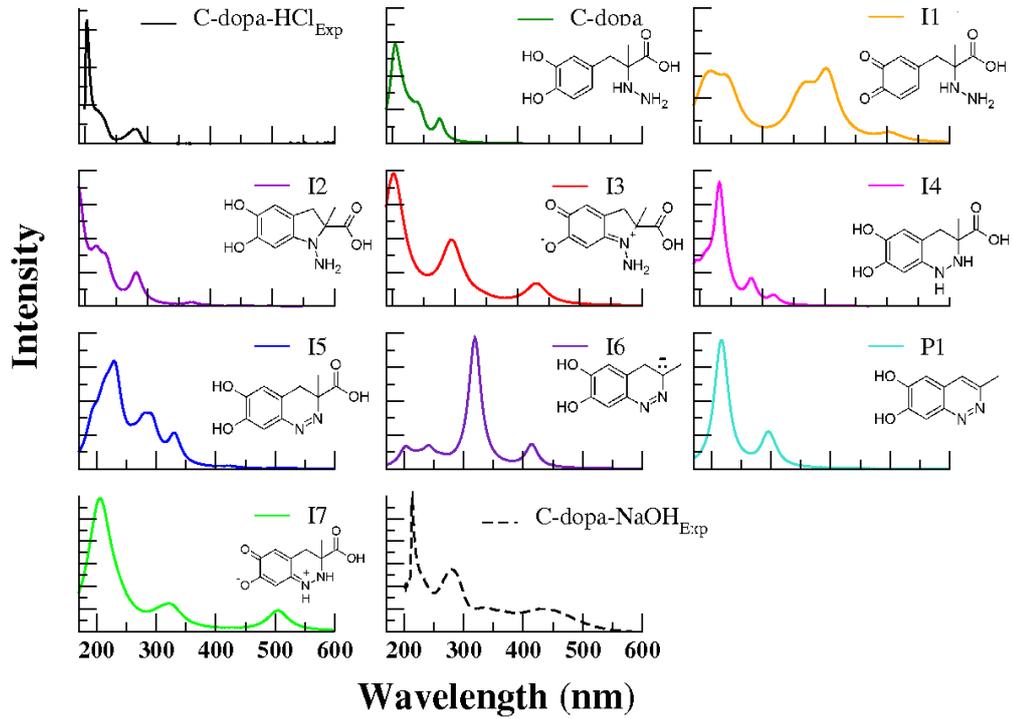
Ligação	Comprimentos de ligação (Å)				
	DFT	GGA/BLYP*	Ligação	DFT	GGA/BLYP*
C1-C2	1,399	1,406	<b>C2-H</b>	1,084	1,091
C2-C3	1,389	1,395	<b>C5-H</b>	1,086	1,093
C3-C4	1,401	1,405	<b>C6-H</b>	1,081	1,089
C4-C5	1,388	1,392	<b>C7-HA</b>	1,092	1,099
C5-C6	1,394	1,399	<b>C7-HB</b>	1,097	1,098
C6-C1	1,398	1,403	<b>C10-HA</b>	1,090	1,100
C1-C7	1,514	1,514	<b>C10-HB</b>	1,090	1,099
C7-C8	1,563	1,551	<b>C10-HC</b>	1,089	1,097
C8-C9	1,542	1,564	<b>O1-H</b>	0,966	0,976
C8-C10	1,533	1,537	<b>O2-H</b>	0,961	0,971
C8-N1	1,467	1,486	<b>O4-H</b>	0,969	1,018
C3-O1	1,363	1,371	<b>N1-H</b>	1,019	1,025
C4-O2	1,378	1,383	<b>N1-N2</b>	1,431	1,473
C9-O3	1,209	1,219	<b>N2-HA</b>	1,018	1,024
C9-O4	1,351	1,345	<b>N2-HB</b>	1,013	1,025
Ângulos de ligação (em graus)					
C1-C2-C3	121,26	-	<b>O2-C4-C5</b>	124,81	124,73
C2-C3-C4	119,38	119,53	<b>C8-C9-O3</b>	124,46	122,19
C3-C4-C5	119,98	-	<b>C7-C8-N1</b>	107,82	-
C4-C5-C6	120,25	-	<b>C8-C9-N1</b>	109,32	116,53
C5-C6-C1	120,51	120,56	<b>C8-C10-N1</b>	110,53	108,74
C6-C1-C2	118,61	-	<b>C8-N1-N2</b>	110,04	112,20
C2-C1-C7	119,45	119,86	<b>C1-C2-H</b>	120,92	-
C6-C1-C7	121,92	-	<b>C2-C3-H</b>	117,81	-
C1-C7-C8	116,22	115,47	<b>C4-C5-H</b>	119,63	-
C7-C8-C9	106,13	-	<b>C6-C5-H</b>	120,12	-
C8-C9-C10	110,79	106,74	<b>C1-C6-H</b>	119,71	-
C7-C8-C10	112,09	109,31	<b>C5-C6-H</b>	119,75	-
C2-C3-O1	120,04	119,81	<b>C1-C7-HA</b>	109,82	-
O1-C3-C4	120,57	-	<b>C1-C7-HB</b>	108,75	-
C3-C4-O2	115,20	-	<b>C8-C7-HA</b>	107,54	-
C8-N1-H	107,46	107,01	<b>C8-C7-HB</b>	107,68	-
H-N1-N2	110,04	-	<b>C8-C10-HA</b>	110,77	-
N1-N2-HÁ	110,65	-	<b>C8-C10-HB</b>	109,08	-
N1-N2-HB	107,35	-	<b>C8-C10-HC</b>	109,95	-
O3-C9-O4	121,96	-	<b>HA-C7-HB</b>	106,82	107,99
C9-O4-H	106,59	107,398	<b>HA-N2-H2B</b>	109,35	105,23
C3-O1-H	107,58	107,30	<b>HA-C10-HB</b>	109,08	-
C4-O2-H	109,86	109,06	<b>HC-C10-HB</b>	109,41	-
C8-C9-O4	113,55	-	<b>HC-C10-HA</b>	108,51	-

\*Resultados teóricos da C-dopa obtidos na Ref. [FRAZÃO et al, 2013].

Fonte: Da autora (2021).

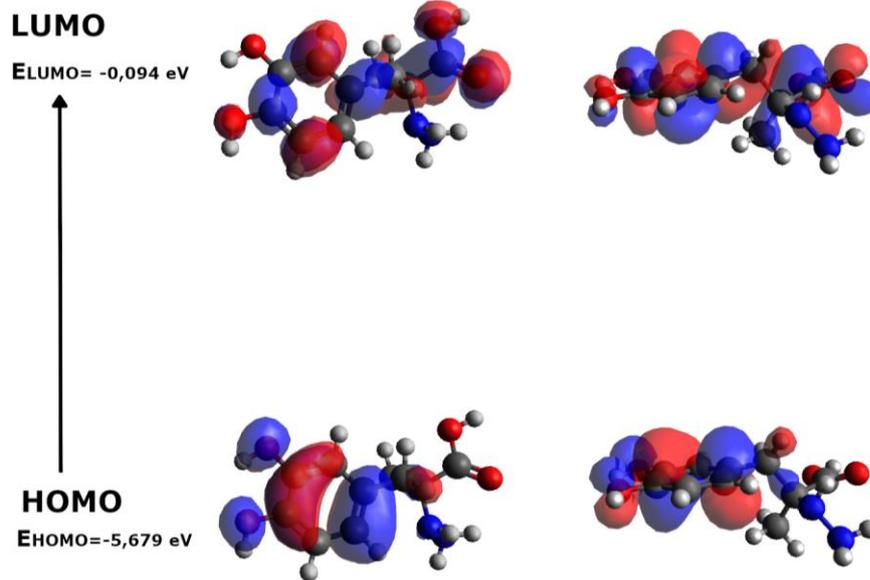
Os espectros teóricos M06L/def2-SPV de todas as estruturas otimizadas de C-dopa e de suas espécies de oxidação são mostrados na Figura 26, juntamente com os espectros experimentais de C-dopa em HCl ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) e após adição de NaOH ( $4,5 \text{ mol L}^{-1}$ ) em pH 13,5. As atribuições das principais transições eletrônicas estão dispostas na Tabela 6. Uma comparação entre o espectro experimental da C-dopa (em HCl) e aquele calculado M06L/ def2-SPV (segundo espectro UV-Vis) mostra uma boa concordância entre si, com pequenas diferenças observadas nas posições dos picos máximos de absorção e suas intensidades. No espectro calculado da C-dopa, uma banda de alta intensidade foi localizada em 204,5 nm, com um ombro em 216,6 nm. Uma segunda banda de baixa intensidade foi determinada em 275,9 nm. Os valores de máximos de absorção no espectro experimental em HCl são 203, 212 e 278 nm, respectivamente. Todas as atribuições dessas bandas correspondem a transições eletrônicas do tipo  $\pi \rightarrow \pi^*$ , envolvendo o anel aromático da C-dopa. A banda com maior intensidade em 204,5 nm envolve a participação dos orbitais moleculares HOMO-1 e LUMO+2, enquanto a transição de menor energia em 275,9 nm ocorre do orbital HOMO para orbital LUMO. Finalmente, o ombro em 216,6 nm corresponde a uma transição eletrônica entre os orbitais HOMO-3 e LUMO. Os orbitais HOMO e LUMO da C-dopa são mostrados na Figura 27 e como pode ser visto o orbital HOMO permanece localizado sobre o anel aromático da C-dopa, enquanto o orbital LUMO mostra também a participação dos orbitais  $p_z$  antiligantes do grupo carboxílico da C-dopa. A diferença de energia entre esses orbitais foi calculada como sendo 5,59 eV.

Figura26-Espectros de absorção UV-Vis experimental e M06L/def2-SVP da C-dopa e seus intermediários e produto final de oxidação.



Fonte: Da autora (2021).

Figura 27- Orbitais HOMO e LUMO M06L/def2-SVP da C-dopa.



Fonte: Da autora (2021).

Tabela 6 - Atribuições das transições eletrônicas envolvidas nas bandas do espectro de absorção UV-Vis da C-dopa obtidas no nível de cálculo M06L/def2-SVP.

Comprimento de onda (nm)	Força do Oscilador	Transição	Atribuição	GAP (eV)
204,5	0,055212912	HOMO → LUMO+3	Orbital pz C (1,2,3,4,6); O(1,2) → orbital pz C (1,2,4,5,9);O(2,3,4).	6,670
216,6	0,004164655	HOMO-3 → LUMO	Orbital pz C (1,2,4,5,6); O (1,2) e N (1,2) → Orbital pz C (1,3,4,6,13), O (8,14,15).	6,665
275,9	0,030842884	HOMO → LUMO	Orbital pz C (1,2,3,5,6), O (7,8) → Orbital pz C (1,3,4,6,13),O (8,14,15).	5,585

Fonte: Da autora (2021).

Após a adição da solução de NaOH ( $4,5 \text{ mol L}^{-1}$ ), o espectro experimental (último espectro da Figura 26) mostra uma banda de baixa intensidade em 440 nm, e duas bandas de alta e média intensidade em torno 205 e 285 nm. Uma comparação entre os espectros teóricos, mostrados na Figura 26, indica que cada intermediário e o produto da oxidação da C-dopa apresenta um perfil espectral bastante distinto entre si, mostrando que a técnica UV-Vis pode ser adequada para distinguir as espécies presentes em solução após a oxidação da C-dopa. Dentre as espécies propostas, apenas o intermediário **I3** (CR1), o intermediário **I6**(CR2) e o intermediário **I7**(CR3) mostram uma banda com baixa intensidade na região do visível. O pico de máxima absorção dessa banda para esses intermediários foi calculada em 430,6; 402,7 e 504,7 nm, respectivamente. Essa banda envolve, assim como na L-dopa, uma transição HOMO-LUMO, que é atribuída como sendo do tipo  $\pi \rightarrow \pi^*$  sobre os anéis aromáticos desses intermediários. A melhor concordância com o espectro experimental é encontrada para o espectro calculado do intermediário zwitteriônico **I3**, considerando não apenas a banda na região do visível em 430,6 nm, mas também as bandas de média e alta intensidade em 202,7 e 295,2 nm, que correspondem ao HOMO-1 → LUMO+4 e HOMO-4 → LUMO, respectivamente. As atribuições dessas bandas estão mostradas na tabela 7. Esses resultados concordam com os resultados obtidos para L-dopa, indicando a presença de uma espécie zwitteriônica em solução, quando a oxidação da C-dopa ocorre.

Tabela 7 – Atribuições das transições eletrônicas envolvidas nas bandas do espectro de absorção UV-Vis do intermediário **I3** da C-dopa obtidas no nível de cálculo M06L/def2-SVP.

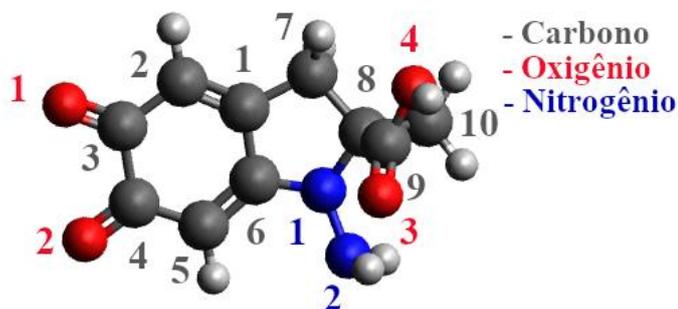
Comprimento de onda (nm)	Força do Oscilador	Transição	Atribuição	GAP (eV)
202,7	0,064833503	HOMO-1 → LUMO+4	Orbital pz N (1); C (1,2,5,6); O (2) → Orbital pz O (3) e s C (9,10).	5,784
295,2	0,086139721	HOMO-4 → LUMO	Orbital pz N (1); C (3,6); O (1) → Orbital pz O (3) e s C (9,10).	3,728
430,6	0,072363871	HOMO → LUMO	Orbital pz C(1); py C (4,5); O(1,2) → Orbital pz C(1,2,3,4,5,6); O(1,2); N (1).	1,791

Fonte: Da autora (2021).

Os resultados do presente estudo indicam, portanto, que entre os mecanismos de reação investigados, a via CR1 reproduz melhor os dados dos espectros experimentais UV-Vis da C-dopa. A estrutura otimizada do intermediário **I3** está mostrada na Figura 28, enquanto seus orbitais HOMO-LUMO estão mostrados na Figura 29 e a diferença de energia entre esse orbitais foi calculada como sendo 1,791 eV.

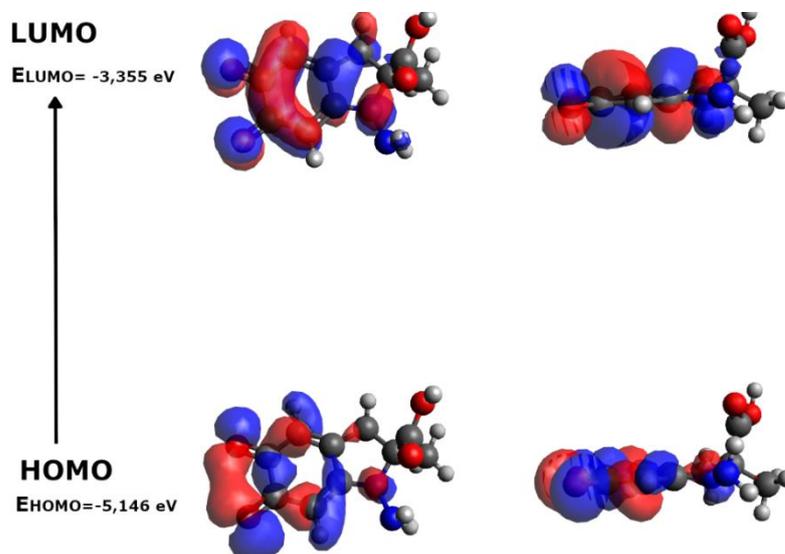
Os resultados de energia B3LYP/CBSB7 dos mecanismos investigados mostram um processo exotérmico de  $-18,4 \text{ kcal mol}^{-1}$  para a via de CR1, enquanto condições menos favoráveis são obtidas para as vias de reação CR2 ( $-3,89 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) e CR3 ( $-2,23 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) essas condições termodinamicamente aliadas aos espectros experimentais e teóricos contrariam o estudo experimental prévio realizado por Gasowska (2009), onde o mecanismo de CR2 foi sugerido para explicar o processo de oxidação. Contudo, nesse estudo, condições experimentais bem diferentes do presente trabalho foram utilizadas, *i. e.*, a C-dopa foi colocada na presença de tirosinase de cogumelo e monitorada espectrofotometricamente em tampão de fosfato de sódio, com pH igual a 6,8 (GASOWSKA et al, 2009).

Figura 28 - Estrutura otimizada B3LYP/CBSB7 intermediário **I3** da C-dopa.



Fonte: Da autora (2021).

Figura 29 - Orbitais HOMO e LUMO do intermediário **I3** da C-dopa.



Fonte: Da autora (2021).

Os resultados obtidos no presente estudo estão de acordo com os conhecimentos de química orgânica, os quais indicam que o caminho da reação de CR1 deve ocorrer, preferencialmente, em relação aos mecanismos CR2 e CR3. Isso se deve ao fato de que, embora todos os mecanismos de reação investigados envolvam a formação de sistemas cíclicos, o mecanismo CR1 forma um anel de 5 membros, enquanto CR2 e CR3 formam um anel de seis membros em suas estruturas estáveis oxidadas. Em todos os casos, a mudança de entalpia deve ser igualmente favorecida. Porém, a variação da entropia é mais favorável na formação dos anéis de cinco membros (CLAYDEN et al., 2000).

Nenhum dos espectros teóricos, entretanto, mostra a banda experimental observada com baixa intensidade em torno 330 nm. Uma inspeção nos 25 estados excitados do espectro calculado do intermediário **I3** mostra uma banda 341,3 nm com baixo valor de 0,002684608 para sua força do oscilador. A baixa intensidade dessa banda na região do ultravioleta indica a

possibilidade de uma transição eletrônica proibida pelas regras de seleção do dipolo elétrico, que poderia envolver estados de spin tripleto, diferente do estado fundamental, que tem multiplicidade singleto (sistema eletrônica de camada fechada com todos os elétrons emparelhados nos orbitais moleculares ligantes) da C-dopa. Cálculos com estados excitados envolvendo multiplicidade spin diferente (tripleto) daquele do estado fundamental não foram, entretanto, considerados no presente trabalho. Análises nesse sentido poderão ser ainda avaliadas posteriormente.

#### 5.4 Determinação simultânea experimental da L-dopa e C-dopa

O método espectrofotométrico UV-Vis proposto foi aplicado com sucesso na dosagem simultânea dos fármacos estudados em uma preparação farmacêutica. A Tabela 8 mostra os resultados obtidos na análise da amostra do comprimido de Parkidopa®, contendo 250 mg de L-dopa e 25 mg de C-dopa. Observe que, para as amostras analisadas, as concentrações de ambos os fármacos obtidas pelo método espectrofotométrico estiveram de acordo com a dose nominal, com alta% de recuperação (96,36-99,86) e bom% DPR(desvio padrão relativo)<2,99. É importante ressaltar que a presença de excipientes na formulação farmacêutica, como celulose microcristalina, estearato de magnésio, dióxido de silício, croscarmelose sódica e povidona, não interferiu na região espectral utilizada para a determinação de L-dopa e C-dopa, corroborando a seletividade do método proposto.

Tabela 8 - Aplicação do método espectrofotométrico UV-Vis proposto para a determinação de L-dopa e C-dopa em uma preparação farmacêutica.

Medicamento	Ingerido	Método	Recuperação <sup>b</sup>	Método	Recuperação <sup>b</sup>	t <sub>calculated</sub>
	<sup>a</sup>	espectrofotométrico <sup>a</sup>		HPLC <sup>a</sup>		
L-dopa	250	249,65 (1.52)	99,86	229,54 (16.7)	91,82	2,08
C-dopa	25	24,09 (0.72)	96,36	24,13 (0.53)	96,54	0,08

<sup>a</sup>Os valores são expressos em mg por comprimido.

<sup>b</sup>As recuperações são apresentadas em porcentagens.

As amostras foram analisadas em triplicatas. Os desvios padrão estão entre parêntese.

t<sub>crítico</sub> = 2,78, limite de confiança tabelado de 95%.

Fonte: Da autora (2021).

A determinação simultânea de L-dopa e C-dopa também foi realizada por HPLC para comparação [método utilizado adaptado da referência de Konduru e Madhuri 2014]. A

extração em fase sólida (SPE) foi utilizada para isolar os analitos e preservar a fase estacionária da coluna cromatográfica. As concentrações de C-dopa determinadas pelo método comparativo (HPLC) foram estatisticamente iguais ao valor nominal, utilizando o teste de Student. Em contraste, a massa média determinada para L-dopa foi estatisticamente inferior ao valor de referência, no limite de confiança de 95%, indicando que uma pequena quantidade da massa de levodopa foi retida no material adsorvente do cartucho de SPE. Embora este método não tenha sido submetido a validação parcial, os resultados obtidos pela análise de Parkidopa® foram satisfatórios em termos de precisão ( $\% \text{ RSD} \leq 7$ ) e exatidão ( $\%$  de recuperação entre 91,82 - 96,54), de acordo com as diretrizes de validação empregadas neste estudo (ICH 2005; ANVISA 2003). O teste de Student também foi aplicado para comparação entre os métodos proposto e HPLC. Os resultados obtidos indicam que não há diferença estatística significativa entre os valores obtidos por ambos os métodos, considerando  $\alpha = 0,05$  como nível de significância geral.

## 6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo mostram que a espectroscopia de absorção UV-Vis, aliada à sua reprodução utilizando cálculos quânticos DFT, é uma ferramenta eficaz para desenvolver métodos de dosagem de fármacos e investigar mecanismos de reação envolvendo sistemas orgânicos de interesse farmacêutico e industrial. As análises experimentais realizadas neste estudo foram capazes de fornecer as condições ideais para o desenvolvimento de um método simples, eficiente e de baixo custo para dosar simultaneamente a L-dopa e C-dopa em preparações farmacêuticas.

Os resultados teóricos mostraram uma boa concordância com os espectros de UV-Vis experimentais de ambos os fármacos, favorecendo as propostas de mecanismo investigadas para a oxidação de L-dopa e C-dopa. Em particular no caso da L-dopa, os resultados teóricos forneceram evidências para comprovar que o mecanismo de oxidação da L-dopa deve ser, de fato, aquele proposto previamente na literatura por Madrakian et al. (2004). Contudo, foi determinada a presença de um intermediário zwitteriônico na solução investigada. Resultado esse em contraste com o produto neutro indicado pelos autores desse estudo.

Dos três caminhos de reação investigados no presente estudo para C-dopa, os resultados teóricos indicam que o caminho de reação denominado CR1 é a via termodinamicamente mais favorável para a oxidação da C-dopa. Um bom acordo foi observado entre o espectro UV-Vis teórico do intermediário **I3** zwitteriônico com o espectro experimental da C-dopa após a adição de NaOH. A presença da banda na região do visível mostrou-se importante para indicar o mecanismo de reação operante para C-dopa, mas o acordo adequado das bandas na região do ultravioleta favoreceu a presença da espécie zwitteriônica oxidada da C-dopa em solução. Além disso, os resultados experimentais e teóricos indicam também a possibilidade de um equilíbrio químico entre as espécies envolvidas no caminho CR1.

O presente trabalho demonstra o potencial da espectrofotometria de absorção UV-Vis como um método analítico simples, rápido e preciso para quantificação simultânea de L-dopa e C-dopa em preparações farmacêuticas. Além disso, a espectroscopia UV-Vis pode ser usada para monitoramento de mecanismos de reação envolvendo os fármacos investigados. O método proposto foi parcialmente validado, apresentando resultados satisfatórios para todos os parâmetros de mérito. Pode-se concluir que o presente método representa um método alternativo interessante, rápido, ecológico e barato para a análise quantitativa de rotina de L-dopa e C-dopa em preparações farmacêuticas.

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-GHANY, M. F. et al. Investigation of different spectrophotometric and chemometric methods for determination of entacapone, levodopa and carbidopa in ternary mixture. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 171, 2017.
- ADAMIÁK-GIERA, U.; GAWROŃSKA-SZKLARZ, B. Simultaneous determination of levodopa and 3-O-methyldopa in patients with parkinson's disease by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 41, n. 19-20, p. 1047-1051, Dec 2018.
- ALEXANDER, G. E. Biology of Parkinson's disease: pathogenesis and pathophysiology of a multisystem neurodegenerative disorder. **Dialogues in clinical neuroscience**, v. 6, n. 3, p. 259-280, 2004.
- ALVES, A. C. **Estudo de estrutura e propriedades eletrônicas de filmes finos de  $\beta$ -PbO<sub>2</sub>**. 63f. Dissertação de mestrado em Ciência dos Materiais, Ilha Solteira, São Paulo, 2016.
- ANDRADE, Â. L. et al. A simple and efficient method for simultaneous quantification of levodopa and carbidopa based on controlled oxidation process. **Chemical Papers**, v. 75, n. 7, 2021.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE 899, de 29 de maio de 2003. Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União, Brasília, 02 de junho de 2003.
- AZAB, S. M.; FEKRY, A. M.; MOHAMED, M. A. Glycine and gold nanoparticles for the electrochemical determination of an anti-parkinson's drug in a tertiary mixture. **International Journal of Pharmaceutical sciences and research**, v. 17, n. 1, p. 1–19, 2009.
- BEITOLLAHI, H.; SAFAEI, M.; TAJIK, S. Electrochemical deduction of levodopa by utilizing modified electrodes: A review. **Microchemical Journal**, v. 152, 2020.
- BELAL, F. et al. Micellar HPLC-UV method for the simultaneous determination of levodopa, carbidopa and entacapone in pharmaceuticals and human plasma. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1091, 2018.
- BEN ROMDHAN, S. et al. LRRK2 G2019S Parkinson's disease with more benign phenotype than idiopathic. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 138, n. 5, 2018.
- BHATNAGAR, P. Hplc Method for Estimation of Drug Release of Entacapone in. **International Journal of Pharmaceutical sciences and research**, v. 8, n. 4, p. 1734–1743, 2017.
- BU'LOCK, J. D.; HARLEY-MASON, J. 153. The chemistry of adrenochrome. Part II. Some analogues and derivatives. **Journal of the Chemical Society (Resumed)**, 1951.
- BUNJO, Zachary et al. Orthostatic hypotension following deep brain stimulation in parkinson's disease: a systematic review. **British journal of neurosurgery**, p. 1-4, 2019.

CAMARGO, S. M. R.; VUILLE-DIT-BILLE, R. N.; MARIOTTA, L.; RAMADAN, T. et al. The Molecular Mechanism of Intestinal Levodopa Absorption and Its Possible Implications for the Treatment of Parkinson's Disease. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 351, n. 1, p. 114-123, Oct 2014.

CARLSSON, A. The occurrence, distribution and physiological role of catecholamines in the nervous system. **Pharmacological Reviews**, 11, n. 2, p. 490-493, 1959.

CHEN, C. et al. Blue and green emission-transformed fluorescent copolymer: Specific detection of levodopa of anti-Parkinson drug in human serum. **Talanta**, v. 214, 2020.

CHI, J. et al. Quantitation of levodopa and carbidopa in rat plasma by LC-MS/MS: The key role of ion-pairing reversed-phase chromatography. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1054, 2017.

CRAMER, C. J. **Essentials of Computational Chemistry theories and models**. 2 ed, Wiley, 2004.

CLAYDEN, Jonathan et al. **Organic Chemistry**. 1ed. IE - Oxford, 2000.

CUTSON, T. M.; LAUB, K. C.; SCHENKMAN, M. Pharmacological and Nonpharmacological Interventions in the Treatment of Parkinson's Disease. **Physical Therapy**, v. 75, n. 5, p. 363-373, 1995.

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's disease: Mechanisms and models, **Neuron**, v. 39, n. 6, p. 889-909, 2003.

DUARTE, D.; AMARO, F.; SILVA, I.; SILVA, D. et al. Carbidopa Alters Tryptophan Metabolism in Breast Cancer and Melanoma Cells Leading to the Formation of Indole-3-Acetonitrile, a Pro-Proliferative Metabolite. **Biomolecules**, v. 9, n. 9, p. 11, Sep 2019.

ELBARBRY, F.; NGUYEN, V.; MIRKA, A.; ZWICKEY, H. et al. A new validated HPLC method for the determination of levodopa: Application to study the impact of ketogenic diet on the pharmacokinetics of levodopa in Parkinson's participants. **Biomedical Chromatography**, 33, n. 1, p. 7, Jan 2019.

ERTOKUS, G. P. The Determination of Parkinson's Drugs in Human Urine by Applying Chemometric Methods. **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 2019, 2019.

FATIBELLO, O.; VIEIRA, I. C.; Flow Injection Spectrophotometric Determination of L-Dopa and Carbidopa in Pharmaceutical Formulations Using a Crude Extract of Sweet Potato Root [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] as Enzymatic Source. **Analyst**, v. 122, n. 4, p. 345-350, 1997.

FERNANDEZ-PASTOR, I.; LUQUE-MUNOZ, A.; RIVAS, F.; MEDINA-O'DONNELL, M. et al. Quantitative NMR analysis of L-Dopa in seeds from two varieties of *Mucuna pruriens*. **Phytochemical Analysis**, v. 30, n. 1, p. 89-94, Jan-Feb 2019.

FRAZÃO, N. F. et al. Optoelectronics and vibrational properties of carbidopa from quantum chemistry computations. **Indian Ocean Rev. Sci. Tech.**, 2013.

FREITAS, M. E.; RUIZ-LOPEZ, M.; FOX, S. H. Novel Levodopa Formulations for Parkinson's Disease. **Cns Drugs**, 30, n. 11, p. 1079-1095, Nov 2016.

GASOWSKA-BAJGER, B. et al. Oxidation of carbidopa by tyrosinase and its effect on murine melanoma. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 13, 2009.

Gaussian 09, Revision D.01, Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., Scalmani, G., Barone, V., Mennucci, B., Petersson, G. A., Nakatsuji, H., Caricato, M., Li, X., Hratchian, H. P., Izmaylov, A. F., Bloino, J., Zheng, G., Sonnenberg, J. L., Hada, M., Ehara, M., Toyota, K., Fukuda, R., Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, J. A., Jr.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E., Kudin, K. N., Staroverov, V. N., Kobayashi, R.; Normand, J., Raghavachari, K., Rendell, A., Burant, J. C., Iyengar, S. S., Tomasi, J., Cossi, M., Rega, N., Millam, J. M., Klene, M., Knox, J. E., Cross, J. B., Bakken, V., Adamo, C., Jaramillo, J., Gomperts, R., Stratmann, R. E., Yazyev, O., Austin, A. J., Cammi, R., Pomelli, C., Ochterski, J. W., Martin, R. L., Morokuma, K., Zakrzewski, V. G., Voth, G. A., Salvador, P., Dannenberg, J. J., Dapprich, S., Daniels, A. D., Farkas, O., Foresman, J. B., Ortiz, J. V., Cioslowski, J., Fox, D. J. Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009

GOETZ, C. G. The history of Parkinson's disease: early clinical descriptions and neurological therapies. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 1, n. 1, p. a008862, 2011.

GONÇALVES, D.; ALVES, G.; SOARES-DA-SILVA, P.; FALCAO, A. Bioanalytical chromatographic methods for the determination of catechol-O-methyltransferase inhibitors in rodents and human samples: A review. **Analytica Chimica Acta**, 710, p. 17 - 32, 2012.

GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, T. et al. Vulnerability of mesostriatal dopaminergic neurons in Parkinson's disease. **Frontiers in Neuroanatomy**, n. OCT, 2010.

GOULDING, S. R. et al. The potential of bone morphogenetic protein 2 as a neurotrophic factor for Parkinson's disease. **Neural Regeneration Research**, v. 15, n. 8, p. 1432–1436, 2020.

GUNDERTREMY, U. et al. Intestinal-absorption of levodopa in man. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 25, n. 1, p. 69-72, 1983.

HALD, A.; LOTHARIUS, J. Oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease: is there a causal link? **Experimental neurology**, v. 193, n. 2, p. 279-90, jun. 2005.

HARRIMAN, J. E. Theoretical Foundations of Electron Spin Resonance. *In*: LOEBL, E. M. (Ed.). **Theoretical Foundations of Electron Spin Resonance**: Academic Press, v. 37, p. ix-xi, 1978.

HATEFI-MEHRJARDI, A. et al. Poly-(dianix blue) modified glassy carbon electrode as an electrochemical sensor for simultaneous determination of levodopa, ascorbic and uric acids. **Analytical and Bioanalytical Electrochemistry**, v. 9, n. 3, 2017.

HEACOCK, R. A. The Chemistry Of Adrenochrome And Related Compounds. **Chemical Reviews**, v. 59, n. 2, 1959.

HORNYKIEWICZ, O. L-DOPA: From a biologically inactive amino acid to a successful therapeutic agent. **Amino Acids**, v. 23, n. 1-3, p. 65-70, 2002.

HUHEEY J. E.; KEITER, E. A.; KEITER R. L. **Inorganic Chemistry: Principles of structure and reactivit.** 4ed, 1993.

ICH. ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology. **International Conference on Harmonization**, v. 1994, n. November 1996, 2005.

JENSEN, F. **Introduction to computational chemistry.** John wiley&amp; sons, 2017.

KIM, W. H.; KARIM, M. M.; LEE, S. H. Simultaneous determination of levodopa and carbidopa by synchronous fluorescence spectrometry using double scans. **Analytica Chimica Acta**, v. 619, n. 1, p. 2-7, 2008.

KOZMINSKI, K. D.; GUTMAN, D. A.; DAVILLA, V.; SULZER, D.; EWING, A. G.; Voltammetric and pharmacological characterization of dopamine release from single exocytotic events at rat pheochromocytoma (PC12) cells. **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 15, p. 2123-3130, 1998.

LEE, C.; YANG, W.; PARR, R. G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density, **Physical Review B**, v. 37, n. 2, p. 785–789, 1988.

LEWITT, P. A. Levodopa Therapy for Parkinson's Disease: Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. **Movement Disorders**, v. 30, n. 1, p. 64-72, Jan 2015.

LUNATI, A.; LESAGE, S.; BRICE, A. The genetic landscape of Parkinson's disease. **Revue Neurologique**, v. 174, n. 9, 2018.

MADRAKIAN, T.; AFKHAMI, A.; BORAZJANI, M.; BAHRAM, M. Simultaneous Derivative Spectrophotometric Determination of Levodopa and Carbidopa in Pharmaceutical Preparations Bull. **Korean Chemical Society**, v. 25, n. 12, 2004.

MAZLOUM-ARDAKANI, M. et al. Electrocatalytic oxidation and voltammetric determination of levodopa in the presence of carbidopa at the surface of a nanostructure based electrochemical sensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 35, n. 1, p. 75-81, 2012.

MIRAKI, M. et al. Voltammetric amplified platform based on ionic liquid/NiO nanocomposite for determination of benserazide and levodopa. **Journal of Molecular Liquids**, v. 278, 2019.

MOHAMMADI, G. et al. Exploiting second-order advantage from mathematically modeled voltammetric data for simultaneous determination of multiple antiparkinson agents in the presence of uncalibrated interference. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 88, 2018.

MONTIOLI, R.; VOLTATTORNI, C. B.; BERTOLDI, M. Parkinson's Disease: Recent Updates in the Identification of Human Dopa Decarboxylase Inhibitors. **Current Drug Metabolism**, v. 17, n. 5, p. 513-518, 2016.

MONTGOMERY, J. A.; FRISCH, M. J.; OCHTERSKI, J. W.; PETERSSON, G. A. A complete basis set model chemistry. VII. Use of the minimum population localization method, **Journal of Chemical Physics**, v. 112, n. 15, p. 6532–6542, 2000.

MORGON, N. H.; COUTINHO, K. **Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular**, 1 Ed., São Paulo, Editora Livraria da Física: São Paulo, 2007.

MORI, H. Pathological substrate of dementia in Parkinson's disease – its relation to DLB and DLBD. **Parkinsonism Related Disorders**, v. 11, p. 41-5, 2005.

MOSTAD, A.; OTTERSEN, T.; ROMMING, C. On the structure of L-DOPA (2S-3-(3,4-dihydroxyphenyl)alanine). **Acta chemica Scandinavica**, v. 25, n. 10, 1971.

MU, C. L. et al. Simultaneous and Sensitive Determination of Levodopa and Carbidopa in Pharmaceutical Formulation and Human Serum by High Performance Liquid Chromatography with On-Line Gold Nanoparticles-Catalyzed Luminol Chemiluminescence Detection. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 45, n. 6, p. E1726-E1733, Jun 2017.

MULLER, T.; MOHR, J. D. Long-term management of Parkinson's disease using levodopa combinations. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 19, n. 9, p. 1003-1011, 2018.

NEESE, F. A critical evaluation of DFT, including time-dependent DFT, applied to bioinorganic chemistry, **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 11, n. 6, p. 702–711, 2006.

NOZAKI, O.; IWAEDA, T.; KATO, Y.; Amines for detection of dopamine by generation of hydrogen peroxide and peroxyoxalatechemiluminescence. **Journal of Bioluminescence Chemiluminescence**, v. 11, n.6, p. 309-313, 1996.

NYHOLM, D.; LENNERNAS, H. Irregular gastrointestinal drug absorption in Parkinson's disease. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 4, n. 2, p. 193-203, Feb 2008.

OBESO, J. A. et al. Past, present, and future of Parkinson's disease: A special essay on the 200th Anniversary of the Shaking Palsy. **Movement Disorders**, v. 32, n. 9, 2017.

OGURA, J.; MIYAUCHI, S.; SHIMONO, K.; YANG, S.; GONCHIGAR, S.; GANAPATHY, V. D.; BHUTIA, Y. Carbidopa is an activator of aryl hydrocarbon receptor with potential for cancer therapy. **Biochemical Journal**, v. 474, p. 3391–3402, 2017.

ORTIZ, G. G. et al., "Oxidative stress and Parkinson's disease: effects on environmental toxicology," in **Free Radicals and Diseases**, ed R. Ahmad (Rijeka: InTech), p. 183–209. 2016.

ÖZDOKUR, K. V. et al. Determination of Carbidopa, Levodopa, and Droxidopa by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytical Letters**, v. 51, n. 1–2, 2018.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN G. M.; KRIZ G. S.; VYVYAN J. R. **Introdução a espectroscopia**. 4 ed., norteamericanaCengage learning, 2010.

PALAKOLLU, V. N. et al. Electrochemically reduced graphene oxide/Poly-Glycine composite modified electrode for sensitive determination of L-dopa. **Materials Science and Engineering C**, v. 77, p. 394–404, 2017.

RAO, G.; FISCH, L.; SRINIVASAN, S.; D'AMICO, F.; OKADA, T.; EATON, C.; ROBBINS C. Does this patient have Parkinson disease? **Jama**, v. 289, p. 347-353, 2003.

RINKEVICIUS, Z. **Density Functional Theory for EPR and NMR Spin Hamiltonian Parameters**. v. 51. 2004. f. Doctoral thesis, comprehensive summary -, KTH, Stockholm. Disponível em: <http://urn.kb.se/resolve?urn=urn:nbn:se:kth:diva-3760>. Acesso em: 07/11/2020.

SAFARI, F. et al. CRISPR System: A High-throughput Toolbox for Research and Treatment of Parkinson's Disease. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 40, n. 4, 2020.

SCHÄFER, A.; HORN, H.; AHLRICHS, R. Fully optimized contracted Gaussian-basis sets for atoms li to Kr, **Journal of Chemical Physics**, v. 97, n. 4, p. 2571–2577, 1992.

SAFE, S. Carbidopa: A selective Ah receptor modulator (SAhRM). **Biochemical Journal**, v. 474, n. 22, 2017.

SANATI, A. L.; FARIDBOD, F.; GANJALI, M. R. Synergic effect of graphene quantum dots and room temperature ionic liquid for the fabrication of highly sensitive voltammetric sensor for levodopa determination in the presence of serotonin. **Journal of Molecular Liquids**, v. 241, 2017.

SCHRAG, A.; SCHOTT, J. M. Epidemiological, clinical, and genetic characteristics of early-onset parkinsonism. **Lancet Neurology**, v. 5, n. 4, 2006.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C.; **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**, 5ª ed., LTC: Rio de Janeiro, 1994.

SHARMA, C.; MOHANTY, S.; KUMAR, S.; RAO, N. J.; Gas chromatographic analysis of chlorophenolic, resin and fatty acids in chlorination and caustic extraction stage effluent from Kahi-grass, **Analyst** v. 121, n. 12, p. 1963-1967, 1996.

SHOGHI-KALKHORAN, M. et al. Praseodymium molybdate nanoplates/reduced graphene oxide nanocomposite based electrode for simultaneous electrochemical determination of entacapone, levodopa and carbidopa. **Journal of Materials Science: Materials in Electronics**, v. 29, n. 1, 2018.

STEGER, M. et al. Phosphoproteomics reveals that Parkinson's disease kinase LRRK2 regulates a subset of Rab GTPases. **eLife**, v. 5, p. 1–28, 2016.

SKOOG, D. A. et al. **Princípios de análise instrumental**. 5ª. ed. Bookman: Porto Alegre, 2002.

TAKAHASHI, H.; WAKABAYASHI, K. Controversy: Is Parkinson's disease entity? Yes. **Parkinsonism Related Disorders**, v. 11, p. 31-7, 2005.

TAKEDA, H. H. et al. Electrochemical sensing of levodopa or carbidopa using a glassy carbon electrode modified with carbon nanotubes within a poly(allylamine hydrochloride) film. **Analytical Methods**, v. 8, n. 6, 2016.

TAMBASCO, N.; ROMOLI, M.; CALABRESI, P. Levodopa in Parkinson's Disease: Current Status and Future Developments. **Current Neuropharmacology**, v. 16, n. 8, p. 1239-1252, 2018.

TORUN, N. A. et al. Sleep parameters associated with long-term outcome following subthalamic deep brain stimulation in Parkinson's disease. **Revue Neurologique**, v. 176, n. 4, 2020.

WANG, Q.; DAS, M. R.; LI, M. S.; BOUKHERROUB, R. et al. Voltammetric detection of L-dopa and carbidopa on graphene modified glassy carbon interfaces. **Bioelectrochemistry**, v. 93, p. 15-22, Oct 2013.

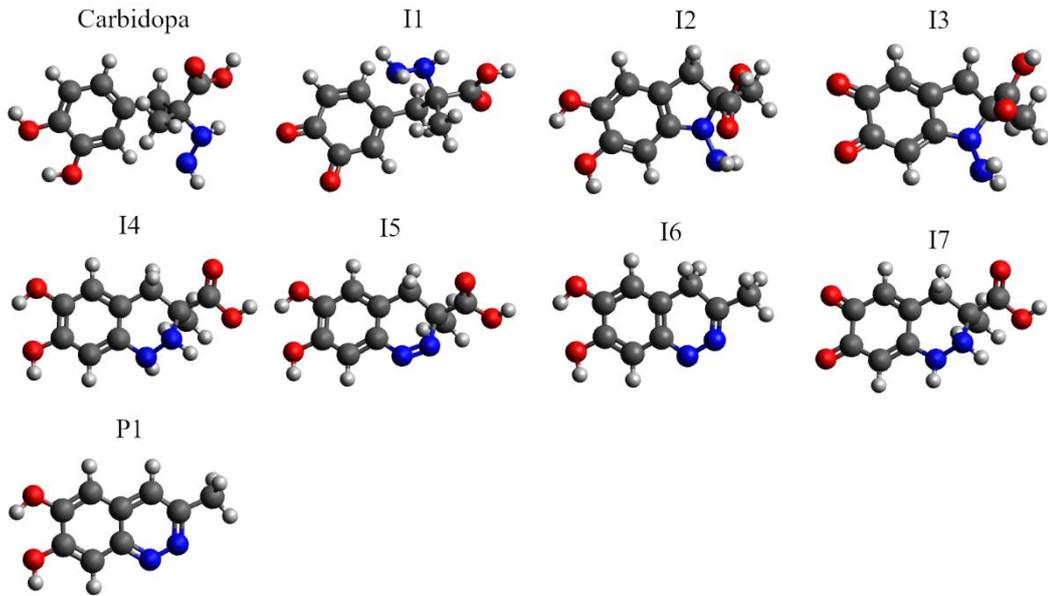
WANG, Q. et al. The landscape of multiscale transcriptomic networks and key regulators in Parkinson's disease. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, 2019.

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, 2008.

## ANEXO

## ANEXO A

➤ Estruturas otimizadas da Carbidopa e seus intermediários.



➤ Estruturas otimizadas da Levodopa e seus intermediários.

