



Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Físicas e Matemáticas
Departamento de Química



Grupo de Estudos de Processos Eletroquímicos e Eletroanalíticos

Eletroquímica da Rutina na Presença do Ácido p-Toluenosulfínico

Aluna: Cristine Durante de Souza
Orientador: Prof. Dr. Almir Spinelli
Florianópolis – SC
2005

Cristine Durante de Souza

***Eletroquímica da Rutina na Presença
do Ácido p-Toluenosulfínico***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à disciplina QMC 5510 –
Estágio Supervisionado, do Curso de
Graduação em Química, da
Universidade Federal de Santa
Catarina, desenvolvido no semestre de
2005.1.

Orientador: Prof. Dr. Almir Spinelli

**Florianópolis – SC
2005**

*Ao meu pai Celso, minha mãe
Analíria, minhas irmãs Clárisse e
Heloísa e ao meu sobrinho André
pelo apoio e eterno amor.*

Agradecimentos

Este trabalho foi desenvolvido no Grupo de Estudos de Processos Eletroquímicos e Eletroanalíticos (GEEPEA), situado no Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina, Laboratório 310, dirigido pelo Prof. Dr. Almir Spinelli.

É impossível proceder ao infinito na série dos seres que se geram sucessivamente. Deve-se admitir, por isso, que existe um ser necessário que tenha em si toda a razão de sua existência, e do qual procedam todos os outros seres. A este chamamos Deus. (S. Tomás de Aquino).

Ao Professor Dr. Almir Spinelli, por sua orientação, ensinamentos repassados e pelo incentivo ao ingresso ao caráter investigatório da ciência.

Ao Professor Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti, pelos seus ensinamentos e pela oportunidade de utilizar o Laboratório de Química de Produtos Naturais.

À amiga Ana Karina Timbola, por sua dedicação, amizade, conselhos, ensinamentos e pelas inúmeras discussões sobre os resultados, na elaboração deste trabalho.

Ao amigo Cristian Soldi, por sua grandiosa amizade, ensinamentos compartilhados e pela parceria no trabalho, que ao meu ver contribuíram para o seu fechamento.

Ao meu namorado Jair, pela dedicação, apoio e principalmente pelo carinho.

À Tia Adriana, por ter me recebido de braços abertos em sua moradia e pelo seu imenso carinho.

Aos amigos do GEPEEA: Ana Karina, Ivanise e Rodolfo.

Aos amigos: Bruna, Roberta, Bethânia, Lidiane, Eduardo, Luciano, Marco Antonio, Fernando, Lourenço, Daniel, Cristiano e Marcella, pela amizade e companheirismo.

A todos os Professores do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina, que colaboraram nos conhecimentos adquiridos durante esta etapa.

Ao Programa de Iniciação Científica da Universidade Federal de Santa Catarina, PIBIC/CNPq – UFSC, pela bolsa de Iniciação Científica concedida.

Ao Departamento de Química e à Universidade Federal de Santa Catarina.

Índice Geral

Resumo	6
Introdução	7
Objetivos	12
Parte Experimental	13
3.1 Reagentes	13
3.2 Métodos Eletroquímicos	13
3.3 Voltametria Cíclica	13
3.4 Eletrólise com Potencial Controlado	14
3.5 Purificação	15
Resultados e Discussão	17
4.1. Voltametria Cíclica	17
4.1.1. Perfil Voltamétrico	17
4.2. Influência da Velocidade de Variação de Potencial (v)	18
4.2.1. Efeito da Velocidade de Variação de Potencial v sobre as Densidades de Corrente de Pico (i_p)	20
4.3. Influência da modificação do potencial de inversão anódico ($E_{\lambda,a}$)	23
4.4. Eletrossíntese do derivado sulfinico da rutina	24
4.4.1. Eletrólise com potencial controlado	24
4.4.2. Caracterização	27
Conclusões	29
Referências Bibliográficas	30

Resumo

Estudou-se o comportamento eletroquímico da rutina 1,0 mmol L⁻¹ em soluções de acetonitrila-tampão fosfato (4:1 v/v) com pH 2 na presença de ácido *p*-toluenosulfínico 1,2 mmol L⁻¹ utilizando-se técnicas eletroquímicas (voltametria cíclica e eletrólise com potencial controlado) e espectroscópicas (IV, RMN ¹H e RMN¹³C).

Os dados obtidos a partir da voltametria cíclica permitiram identificar três processos de oxidação irreversíveis ($E_p^I = 0,56$ V , $E_p^{II} = 0,81$ V e $E_p^{III} = 1,32$ V / ECS). Devido à complexidade do sistema, foram caracterizados apenas os processos de eletrodo que ocorrem no pico I. Os estudos voltamétricos em função da velocidade de variação do potencial permitiram caracterizar o processo eletródico que ocorre no pico I como sendo controlado pela difusão, isto é, a etapa mais lenta é a transferência de massa da espécie eletroativa (rutina) até a superfície metálica. Adicionalmente, os estudos ciclovoltamétricos permitiram identificar a ocorrência de uma reação química homogênea posterior à transferência de carga heterogênea.

As eletrólises com potencial controlado permitiram determinar que o número de elétrons transferidos na primeira etapa de oxidação é 2 e eletrossintetizar um derivado sulfínico da rutina: o 3,3',4',5,7-pentahidróxi-6'(4-metilfenilsulfonil) flavona. O produto foi separado empregando-se técnicas cromatográficas e identificado e caracterizado com o auxílio das técnicas espectroscópicas.

Com base nos dados eletroquímicos e espectroscópicos propôs-se um esquema reacional no qual a oxidação da rutina ocorre de acordo com o mecanismo EC (Electrochemical-Chemical). Nessa proposta a rutina é inicialmente oxidada na superfície do eletrodo (pico I) formando a *o*-quinona correspondente (etapa eletroquímica), a qual reage imediatamente com o ácido *p*-toluenosulfínico (que atua como nucleófilo) formando o derivado sulfínico (etapa química).

Palavras chave: Rutina, Ácido *p*-toluenosulfínico, Eletroquímica e Eletrossíntese.

Introdução

A rutina (3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavona-3-rutinosídeo - Figura 1) é um flavonóide presente no tomate, no tabaco, na arruda e em inúmeros vegetais, frutas e grãos. Seu nome deriva do latim *ruta* = arruda e *ina* = produto ou extrato proveniente de. Da arruda, a rutina é extraída sob a forma de material cristalino, acicular e higroscópico. Comercialmente este flavonóide é vendido sob a forma de um sólido amorfo amarelo, solúvel em etanol, acetona, acetato de etila e em soluções alcalinas, e pouco solúvel em água.¹ Apresenta em sua estrutura química o grupo resorcinol no anel A (com as *m*-hidroxilas nas posições C5 e C7), o grupo catecol no anel B (com as *o*-hidroxilas nas posições C3' e C4'), o substituinte O-rutinosídeo (composto por dois açúcares: raminose e glicose) na posição C3 do anel C, a carbonila na posição C4 no anel C e a insaturação entre os carbonos C2 e C3 no anel C. A figura 1 mostra a estrutura química da rutina, a numeração dos átomos de carbono e a denominação de cada anel.

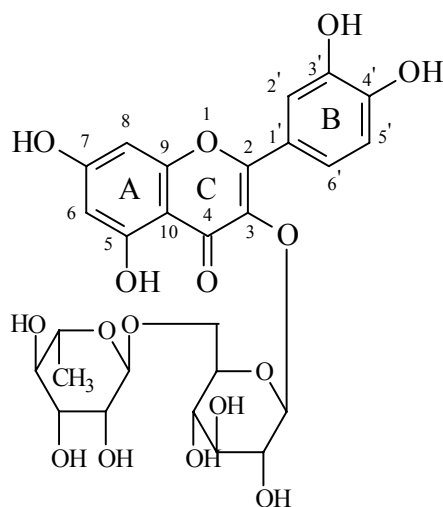


Figura 1. Estrutura química da rutina.¹

O espectro ultravioleta² da rutina mostra duas bandas de absorção: uma mais intensa entre 350 e 390 nm devido à presença de insaturações no anel B, e outra de menor intensidade situada entre 240 e 290 nm referente aos grupos cromóforos no anel A.

O espectro de infravermelho¹ apresenta bandas de absorção relacionadas ao sistema aromático (1609, 1562, 1522 cm⁻¹), à função carbonila α,β -insaturada (1666 cm⁻¹) e aos grupos hidroxila (3408 cm⁻¹).

Os espectros de RMN¹H, RMN¹³C³ apresentam os deslocamentos químicos (δ – ppm) mostrados na tabela 1. Os espectros de RMN¹H foram obtidos pelos autores a partir da rutina comercial (Sigma).

Tabela 1. Sinais dos espectros de RMN¹H (δ_H) e RMN¹³C (δ_C) para a rutina.

<i>Rutina</i>		
Número do Carbono	RMN ¹ H (δ_H)	** RMN ¹³ C (δ_C)
	Acetona-d ₆	DMSO-d ₆
2	-----	156,4
3	*O-Rutinose	133,6
4	-----	177,4
5	OH	161,2
6	6,28 (d)	98,8
7	OH	164,0
8	6,53 (d)	93,6
9	-----	156,6
10	-----	105,2
1°	-----	121,6
2°	2,09 (d)	115,3
3°	OH	144,6
4°	OH	148,3
5°	6,97 (d)	116,3
6°	7,74 (dd)	121,6

* O espectro não apresentou boa resolução na região dos açúcares e não foi possível atribuir os sinais (dados obtidos pelos autores).

** O espectro RMN¹³C apresentou deslocamentos químicos para a rutinose: 101,5 (C-1Glc), 74,2 (C-2Glc), 76,5 (C-3Glc), 70,1 (C-4Glc), 75,8 (C-5Glc), 66,9 (C-6Glc), 100,6 (C-1Rha), 70,3 (C-2Rha), 70,7 (C-3Rha), 72,0 (C-4Rha), 68,1 (C-5Rha), 17,4 (C-6Rha).

A rutina apresenta 3 hidrogênios ionizáveis, sendo as constantes de dissociação em solução aquosa as seguintes: pK_{a1} 7,1, pK_{a2} 9,15 e pK_{a3} 11,65.⁴ Entretanto, a literatura pertinente, não traz informações acerca das estruturas químicas das espécies desprotonadas.

A rutina exerce diversas atividades biológicas comprovadas, como antialérgica, antiinflamatória, antitumor, antibacteriana, antiviral, antiprotozoário e vasodilatadora. Devido a essas atividades, a rutina é bastante empregada no tratamento de inúmeras doenças.⁵ Além das propriedades citadas anteriormente, a rutina apresenta atividade antioxidante, resultado da sua capacidade de seqüestrar radicais livres.^{6,7}

A maior parte do O_2 consumido no metabolismo celular é reduzido completamente à água (H_2O) através da cadeia respiratória, gerando energia para a produção de adenosina 5'-trifosfato (ATP). Esse processo envolve reações em cadeia, onde há transferência bivalente de elétrons para o O_2 sem a formação de intermediários.⁸ Entretanto, uma pequena fração de O_2 (2 – 5%), sofre sucessivas reduções monoeletrônicas, formando espécies parcialmente reduzidas denominadas espécies reativas de oxigênio (ERO) ou radicais livres, que são átomos ou moléculas com um ou mais elétrons não emparelhados em seu orbital mais externo, o que os tornam extremamente reativos.⁹ A produção de radicais livres pelos organismos ocorre durante um processo fisiológico, a respiração. Porém, em determinadas condições, pode ocorrer elevação na produção de ERO, levando ao estresse oxidativo, durante o qual algumas destas espécies reativas de oxigênio, tais como radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidroxila (OH^{\bullet}) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), podem ser responsáveis por uma série de efeitos fisiológicos e patológicos.⁹

Antioxidantes são substâncias capazes de prevenir a formação de radicais livres, através da capacidade de estabilização e/ou doação de elétrons e formação de quelatos com metais de transição (inibição das Reações de Fenton e de Haber-Weiss).⁸ Os flavonóides, em geral, apresentam intensa atividade antioxidante. Todavia, quando metais de transição como o ferro estão presentes em concentrações elevadas, podem atuar como pró-antioxidantes.¹⁰

Atuando como antioxidantes naturais, os flavonóides sofrem reações que envolvem mecanismo de transferência de elétrons, possibilitando o estudo dessas reações através de métodos eletroquímicos, os quais têm sido pouco utilizados para esta finalidade.¹¹

O comportamento eletroquímico da rutina é pouco conhecido. Todavia, em sua estrutura química, a rutina apresenta grupos funcionais OH que podem ser eletroquimicamente oxidados. A oxidação do grupo 3', 4' dihidróxi no anel B pode levar à formação da *o*-quinona correspondente. De maneira semelhante, o grupo 5,7 dihidróxi no anel A pode levar à formação da *m*-quinona correspondente. Foi demonstrado¹² que o catecol no anel B é oxidado mais facilmente que o resorcinol no anel A. Das duas quinonas possíveis de serem formadas, a *o*-quinona é a mais reativa. Sabidamente, *o*-quinonas e *p*-quinonas são muito reativas e podem ser atacadas por uma variedade de nucleófilos. Não há na literatura nenhum trabalho sobre a oxidação eletroquímica da rutina na presença de nucleófilos. Apenas um trabalho relata a oxidação química da rutina utilizando DPPH (do inglês diphenylpicrylhydrazyl) como oxidante.¹³ Contudo, Nematollahi e colaboradores,¹⁴ utilizando técnicas de voltametria cíclica e eletrólise com potencial controlado, estudaram a oxidação eletroquímica da quercetina na presença e na ausência de ácidos benzenosulfínicos, onde os resultados indicaram que a *o*-quinona formada a partir da quercetina participa da reação de adição de Michael com os ácidos benzenosulfínicos formando derivados sulfínicos da quercetina. As estruturas foram caracterizadas por IV, RMN¹H, RMN¹³C, massas e conteúdo de enxofre. O esquema reacional está mostrado abaixo:

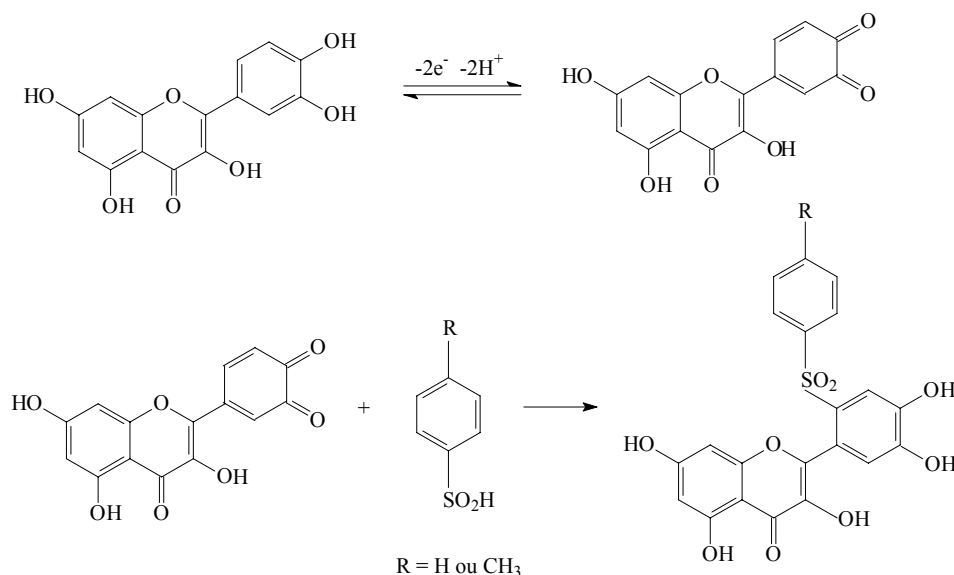


Figura 2. Esquema reacional para a formação dos derivados sulfínicos da quercetina.¹⁴

A síntese eletroquímica de compostos orgânicos tem sido assunto de investigações laboratoriais desde meados do século XIX. Nos últimos anos, devido principalmente à viabilidade econômica, um grande número de reagentes usados em química sintética é preparado por métodos eletroquímicos. A oxidação e a redução eletroquímica em síntese orgânica oferecem algumas vantagens importantes sobre os métodos convencionais: condições mais suaves de reação, as quais freqüentemente garantem uma alta seletividade; utilização de elétrons como agentes redox, que conduz à drástica redução de problemas ambientais; maior eficiência no processo de transformação de matéria prima; facilidade no processo de separação e isolamento do produto.¹⁵

Pelas razões expostas acima, o GEPEEA vem estudando a oxidação eletroquímica dos flavonóides quercetina, morina e rutina, na ausência e na presença do ácido *p*-toluenosulfínico, o qual age como nucleófilo após a oxidação eletroquímica do flavonóide. Este trabalho diz respeito aos estudos realizados com a rutina em solução acetronitrila/tampão fosfato (4:1 v/v).

Objetivos

Este trabalho tem como objetivos investigar a eletro-oxidação da rutina na presença do ácido *p*-toluenosulfínico (APT) como nucleófilo, visando desenvolver um método eletroquímico fácil, em uma etapa, para a síntese de um derivado sulfínico da rutina, e estudar o mecanismo de transferência de elétrons da rutina em solução acetonitrila/tampão fosfato (4:1 v/v) em pH 2,0. Para atingir estas finalidades foram empregados métodos eletroquímicos (voltametria cíclica e eletrólise com potencial controlado) e espectroscópicos (IV, RMN¹³C e RMN¹H). As principais variáveis analisadas foram a velocidade de variação de potencial (v) e as modificações no programa de perturbação do potencial.

3.1 Reagentes

Todos os reagentes utilizados são de grau analítico adquiridos da Sigma (Rutina), da Vetec (H_3PO_4), da Reagen (KH_2PO_4 , K_2HPO_4), da FMaia (Acetona, Álcool Etilico, Acetato de Etila, Acetonitrila), da Acros Organics ($\text{C}_7\text{H}_7\text{SO}_2\text{Na}$). Eles foram utilizados sem purificação prévia. Água destilada e desionizada foram usadas para a preparação das soluções.

3.2 Métodos Eletroquímicos

Utilizou-se um potenciostato/gavanostato EG&G PARTM, modelo 263A, em conjunto com o software M270 acoplado a um computador para registrar as curvas $I \times E$ e $I \times t$. Os gráficos apresentados foram editados no programa de computador ORIGINTM da empresa Micronal. As estruturas químicas foram elaboradas no programa de computador CHEMWINDOWTM da empresa Softshell.

3.3 Voltametria Cíclica

Os voltamogramas cíclicos foram obtidos em uma célula eletroquímica contendo três eletrodos: um disco de carbono vítreo (BAS MF – 2012) como eletrodo de trabalho (E.T.), um cilindro de grafite espectroscópico como eletrodo auxiliar ou contra eletrodo (C.E.) e calomelano saturado como eletrodo de referência (E.R.). Logo, todos os valores de potencial mencionados são referentes a este eletrodo.

O eletrodo de trabalho foi previamente polido antes de registrar cada voltamograma cíclico com pasta de alumina (0,05 μm), disposto em banho de ultra-som para remover a alumina remanescente e, em seguida, lavado com água desionizada. A capacidade da célula eletroquímica era de 30 mL de solução. Empregou-se uma solução de $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (ambas 0,05 mol L^{-1}) como eletrólito suporte. O eletrólito suporte foi misturado à acetonitrila numa proporção (4:1 v/v) de acetonitrila/tampão fosfato. O pH da fase aquosa foi ajustado com H_3PO_4 para pH 2,0. Antes de registrar cada voltamograma cíclico a

solução foi desoxigenada borbulhando nitrogênio através da solução durante 8 minutos. A rutina ($1,0 \text{ mmol L}^{-1}$) e o ácido *p*-toluenosulfínico ($1,2 \text{ mmol L}^{-1}$) foram adicionados em massa após a obtenção de um voltamograma cíclico livre dos mesmos. Nos estudos de influência da velocidade de variação de potencial (v) sobre o perfil voltamétrico da rutina foi utilizada uma faixa de potencial de $-0,10 \text{ V}$ a $+1,60 \text{ V}$. Nos estudos da influência de modificação do potencial de inversão anódico ($E_{\lambda,a}$), o potencial aplicado foi de $0,10 \text{ V}$ mais positivo que o potencial de pico anódico (E_{pa}).

3.4 Eletrólise com Potencial Controlado

O experimento de cronoamperometria foi realizado para fazer a síntese do derivado sulfínico da rutina, bem como para determinar o número de elétrons transferidos. Para a eletrólise com potencial controlado utilizou-se uma célula eletroquímica com dois compartimentos; no compartimento do ânodo colocou-se o eletrodo de trabalho, constituído por quatro cilindros de grafite espectroscópicos (a resposta da rutina sobre eletrodo de grafite espectroscópico é equivalente à sobre eletrodo de carbono vítreo) e o eletrodo de calomelano saturado como eletrodo de referência; no compartimento do cátodo colocou-se o eletrodo auxiliar, composto por um cilindro de grafite espectroscópico. O contato elétrico entre o ânodo e cátodo foi feito através de uma ponte salina preenchida com KCl saturado e ágar-ágar 1,5% em massa, sendo que as extremidades foram vedadas com algodão, impedindo, deste modo, o contato direto da solução teste com o KCl.

A capacidade dos compartimentos da célula eletroquímica era de 80 mL de solução cada. Como descrito anteriormente, empregou-se uma solução de acetonitrila e tampão de $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (ambas $0,05 \text{ mol L}^{-1}$) (4:1 v/v). O potencial aplicado foi de $0,80 \text{ V}$. O pH da fase aquosa foi ajustado com H_3PO_4 . A justificativa para a escolha deste valor de pH está relacionada ao fato de que nesta condição de pH a rutina está totalmente protonada, uma vez que o primeiro pK_{a1} é 7,1. A rutina ($1,0 \text{ mmol L}^{-1}$) e o ácido *p*-toluenosulfínico ($1,2 \text{ mmol L}^{-1}$) foram adicionados em massa apenas no compartimento do ânodo. A cada trinta minutos a eletrólise foi interrompida para a reativação da superfície do eletrodo de trabalho, o qual foi lavado com água e disposto no banho de ultra-som para a remoção dos produtos de oxidação aderidos na superfície. A eletrólise foi iniciada após registrar-se um

voltamograma cíclico sob as mesmas condições já descritas anteriormente. Para o acompanhamento da reação a cada reativação da superfície do eletrodo de trabalho foi gerado um novo voltamograma. As curvas de corrente em função do tempo da reação foram obtidas sob agitação constante. A eletrólise foi encerrada quando a corrente apresentou um decréscimo de cerca de 90% de seu valor inicial. A carga consumida foi obtida através da integração de curva resultante e o número de elétrons calculado.

3.5 Purificação

Após a eletrólise, o produto bruto foi concentrado (com redução de até 80% de seu volume inicial) em evaporador rotatório com pressão reduzida e resfriado. O precipitado obtido após resfriamento foi separado do sobrenadante por filtração a vácuo e o material retido foi submetido à cromatografia em coluna de sílica gel utilizando acetato de etila 100% como eluente. Foram coletadas frações de 25 mL e o fracionamento foi acompanhado por cromatografia em camada delgada (CCD). As frações foram reunidas conforme semelhança em CCD. Para o fracionamento cromatográfico em coluna, utilizou-se sílica gel de granulação 70-230 mesh (0,063-0,200 mm) da Merck. Para cromatografia em camada delgada (CCD) foram utilizadas placas Alugram Sil G/UV₂₅₄ com 0,20 mm de espessura da Macherey-Nagel. Os compostos nas placas cromatográficas foram visualizados sob lâmpada de ultravioleta em 254 nm e por imersão das placas em anisaldeído sulfúrico, seguido de aquecimento da placa. Um composto de coloração alaranjada foi isolado e enviado para serem feitas as análises de IV, RMN ¹H e RMN ¹³C.

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos em espectrofotômetro Perkin Elmer FTIR 16 PC utilizando-se pastilhas de brometo de potássio anidro.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H) foram obtidos em aparelho Bruker AC a 200 MHz e os de carbono-13 (RMN ¹³C) em espectrômetro Varian Mercury Plus a 100 MHz.

O produto identificado foi o *3,3',4',5,7-pentahidróxi-6'(4-metilfenilsulfonyl) flavona*. Abaixo estão os dados de IV, RMN ¹H e RMN ¹³C da sua caracterização.

3,3',4',5,7-pentahidróxi-6'(4-metilfenilsulfonil) flavona – IV (pastilha de KBr): $\nu(\text{cm}^{-1}) = 3399(\text{OH}), 1656(\text{C}=\text{O})$. RMN ^1H (CD_3OD), $\delta(\text{ppm}) = 2,56$ (s, Met, 4-Met-PhSO $_2$), 6,15 (d, $J = 1,86$ Hz, H-6), 6,38 (d, $J = 2,00$ Hz, H-8), 7,12 (s, H-2'), 7,41 (d, $J = 8,11$ Hz, H-2 e H-6, 4-Met-PhSO $_2$), 7,71 (d, $J = 8,14$, H-3 e H-5, 4-Met-PhSO $_2$), 7,86 (s, H-5'). RMN ^{13}C (CD_3OD), $\delta(\text{ppm}) = 147,1$ (C-2), 137,4 (C-3), 176,5 (C-4), 161,4 (C-5), 98,2 (C-6), 164,4 (C-7), 93,6 (C-8), 157,2 (C-9), 104,2 (C-10), 122,0 (C-1'), 116,7 (C-2'), 146,5 (C-3'), 149,9 (C-4'), 118,9 (C-5'), 139,0 (C-6'), 144,3 (C-1, 4-Met-PhSO $_2$), 129,3 (C-2 e C-6, 4-Met-PhSO $_2$), 127,1 (C-3 e C-5, 4-Met-PhSO $_2$), 130,8 (C-4, 4-Met-PhSO $_2$), 29,5 (Met, 4-Met-PhSO $_2$).

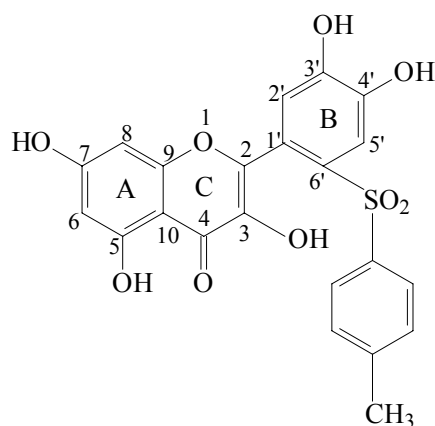


Figura 3. Estrutura química do 3,3',4',5,7-pentahidróxi-6'(4-metilfenilsulfonil) flavona.

4.1. Voltametria Cíclica

4.1.1. Perfil Voltamétrico

A Figura 4 mostra o voltamograma cíclico obtido sobre eletrodo de carbono vítreo para a rutina ($1,0 \text{ mmol L}^{-1}$) em solução acetonitrila e tampão de $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (ambos $0,05 \text{ mol L}^{-1}$) (4:1 v/v), na presença do ácido *p*-toluenosulfínico $1,2 \text{ mmol L}^{-1}$, ($E_{\lambda,C} = -0,10 \text{ V}$ e $E_{\lambda,a} = +1,60 \text{ V/ECS}$), na velocidade de variação de potencial de 100 mV s^{-1} e pH 2,0.

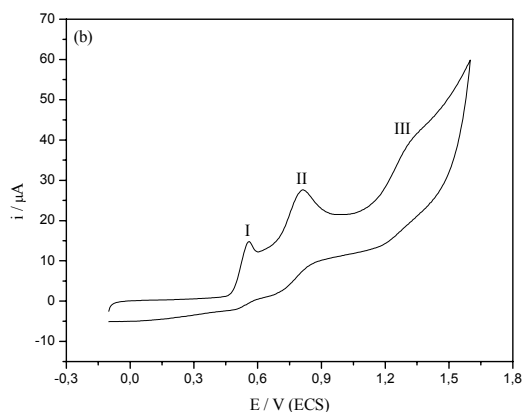


Figura 4. Voltamograma cíclico para a rutina $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em acetonitrila/tampão fosfato (4:1 v/v) na presença de ácido *p*-toluenosulfínico $1,2 \text{ mmol L}^{-1}$ ($C_{\text{vítreo}}$, pH 2,0, 100 mV s^{-1}).

Sob as condições experimentais descritas acima, na Figura 4 são observados três picos de oxidação ($E_p^{\text{I}} = 0,56 \text{ V}$, $E_p^{\text{II}} = 0,81 \text{ V}$ e $E_p^{\text{III}} = 1,32 \text{ V / ECS}$) quando a variação de potencial é feita no sentido positivo. Na variação negativa de potencial há pequenas flutuações de corrente que não permitem localizar precisamente os picos de redução. Isso ocorre, provavelmente, pela pouca sensibilidade da técnica. Técnicas mais sensíveis, como as voltametrias de onda quadrada ou de pulso diferencial, poderiam dar informações adicionais sobre esses processos, todavia a exploração dessas técnicas não faz parte dos objetivos deste trabalho. De maneira similar ao descrito para a quercetina¹⁴, o primeiro pico

(E_p^I) pode estar associado à formação da *o*-quinona nas posições C-3' e C-4', a qual reage com o ácido *p*-toluenosulfínico formando um derivado eletroquimicamente ativo e estável. Os picos E_p^{II} e E_p^{III} , por sua vez, podem estar relacionados à oxidação do derivado sulfínico (em E_p^{II}) e de outro produto formado após E_p^{II} (em E_p^{III}). Essas hipóteses ainda estão sob investigação e, até o momento, não temos informações adicionais sobre processos que estão realmente ocorrendo.

Devido à complexidade dos voltamogramas e ao tempo destinado para a realização da monografia, serão abordados aqui preferencialmente os processos que ocorrem ao redor de E_p^I .

4.2. Influência da Velocidade de Variação de Potencial (v)

A natureza do processo eletródico pode ser caracterizada sobre superfícies planas ou esféricas utilizando a técnica de voltametria cíclica, analisando-se a influência da velocidade de variação de potencial sobre os potenciais e as correntes observadas nos voltamogramas cíclicos.^{16,17} Assim sendo, o comportamento eletroquímico da rutina 1,0 mmol L⁻¹ na presença do ácido *p*-toluenosulfínico foi estudado analisando-se a velocidade de variação de potencial no intervalo de 10 – 500 mV.s⁻¹ em acetonitrila/tampão fosfato (4:1 v/v) em pH 2,0 sobre os picos de oxidação I, II e III. Entretanto, nesse trabalho serão exploradas as informações obtidas apenas para o pico I.

A Figura 5 mostra a influência da velocidade de variação de potencial (v) sobre o perfil voltamétrico da rutina 1,0 mmol L⁻¹ na presença do ácido *p*-toluenosulfínico 1,2 mmol L⁻¹ em pH 2,0.

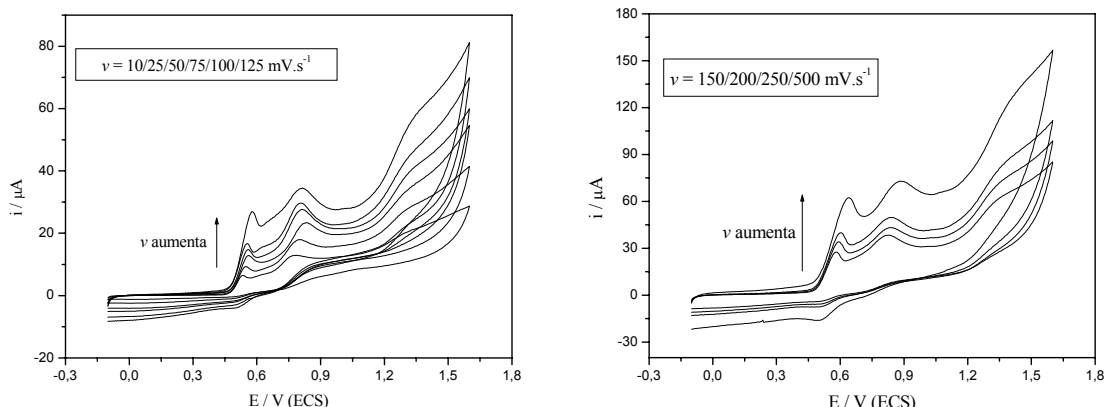


Figura 5. Voltamogramas cíclicos para rutina $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em acetonitrila/tampão fosfato (4:1 v/v) na presença do ácido *p*-toluenosulfínico $1,2 \text{ mmol L}^{-1}$ ($C_{\text{vítreo}}$, pH 2,0, $10\text{--}500 \text{ mV s}^{-1}$).

Nos voltamogramas mostrados acima é possível observar que o aumento de v provoca um aumento nos valores das respectivas densidades de corrente de pico e nos potenciais associados a cada pico voltamétrico. Alguns critérios envolvendo a velocidade de variação de potencial foram aplicados para estudar a reversibilidade e a etapa determinante da velocidade das reações. A figura 6 mostra os gráficos (a) $E_p^I \times v$ e (b) $E_p^{II} \times v$ para a oxidação da rutina na presença do ácido *p*-toluenosulfínico.

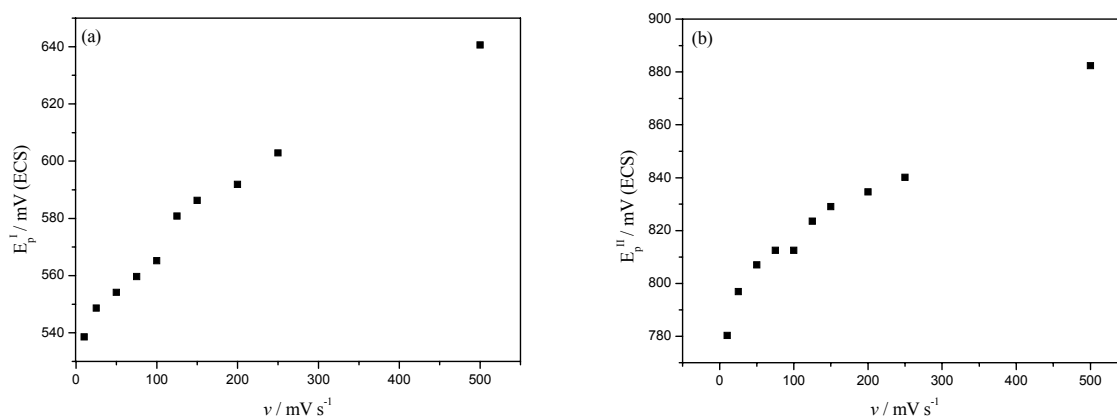


Figura 6. Curvas (a) $E_p^I \times v$ e (b) $E_p^{II} \times v$ para a rutina $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em acetonitrila/tampão fosfato (4:1 v/v) na presença do ácido *p*-toluenosulfínico $1,2 \text{ mmol L}^{-1}$ ($C_{\text{vítreo}}$, pH 2,0).

Observando as Figuras 5 e 6, constata-se que os potenciais se deslocam para valores mais positivos conforme a velocidade aumenta. Para processos eletródicos reversíveis, o potencial de pico independe de v .^{16,17} Logo, conclui-se que os processos associados às diferentes reações de eletrodo são irreversíveis ou há uma transferência eletrônica perturbada por uma reação química acoplada. Nesse caso não foram obtidos dados para o pico III devido à dificuldade em assinalar precisamente a sua localização.

Outro critério usado para estudar a reversibilidade das reações é o cálculo da diferença entre o potencial de pico (E_p) e o potencial de pico à meia altura ($E_{p/2}$). A diferença $|E_p - E_{p/2}|$ é independente da velocidade e vale $56,6/n$ (mV) para reações reversíveis e $47,7/\alpha n$ (mV) para reações irreversíveis. Se $|E_p - E_{p/2}|$ for dependente de v , isso significa que há complicações cinéticas ou reações químicas que precedem ou sucedem a transferência de carga. Esse critério não foi utilizado nos nossos estudos devido à dificuldade em localizar a linha base de cada pico e, por consequência, $E_{p/2}$ ($E_{p/2}$ é o potencial onde $i = i_{p/2}$).

4.2.1. Efeito da Velocidade de Variação de Potencial v Sobre as Densidades de Corrente de Pico (i_p)

Dois critérios usados para estudar a reversibilidade das reações e determinar se o processo de transferência de carga é controlado por difusão ou adsorção são as análises das curvas $\log i_p \times \log v$ e $i_p \times v^{1/2}$.

As figuras 7 e 8 mostram esses gráficos para a rotina $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em pH 2,0 na presença do ácido *p*-toluenosulfônico $1,2 \text{ mmol L}^{-1}$. Essas análises foram feitas somente para as densidades de corrente associadas ao pico I.

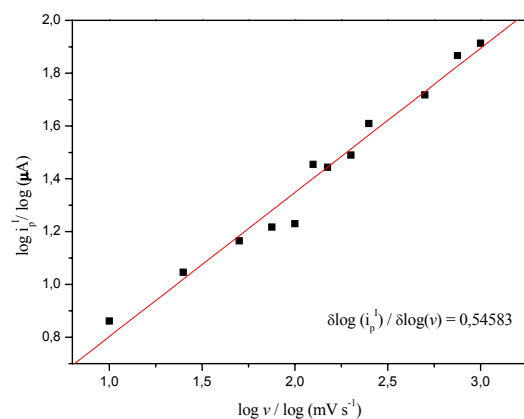


Figura 7. Gráfico $\log i_p^I$ x $\log \nu$ para a rutina $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em acetonitrila/tampão fosfato (4:1 v/v) na presença do ácido *p*-toluenosulfínico $1,2 \text{ mmol L}^{-1}$ (C_{vitreo} , pH 2,0).

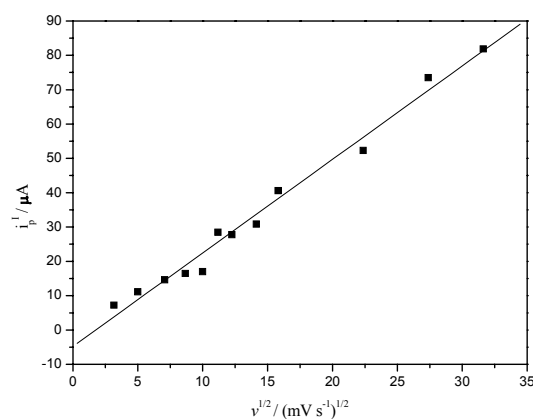


Figura 8. Gráfico i_p^I x $\nu^{1/2}$ para a rutina $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$ em acetonitrila/tampão fosfato (4:1 v/v) na presença do ácido *p*-toluenosulfínico $1,2 \text{ mmol L}^{-1}$ (C_{vitreo} , pH 2,0).

Na figura 7 verificou-se que a curva $\log i_p^I$ x $\log \nu$ apresentou um comportamento linear, sendo que $\delta \log(i_p^I) / \delta \log(\nu) \approx 0,5$ com coeficiente de correlação de 0,9871. Um valor de inclinação próximo a 1,0 é esperado para o gráfico $\log i_p^I$ x $\log \nu$ em um processo eletrodico controlado por adsorção e próximo a 0,5 em processos controlados por difusão. Fica claro, nesse caso, que o controle da reação é difusional.

Em sistemas reversíveis ou irreversíveis sem complicações cinéticas, i_p varia linearmente com $v^{1/2}$, passando pela origem dos pontos. No entanto, o gráfico $i_p \times v^{1/2}$ pode apresentar desvio de linearidade e um valor diferente de zero para o coeficiente linear se no processo eletródico estiverem envolvidas reações químicas anteriores ou posteriores à transferência eletrônica.

Na figura 8, referente somente ao pico I, observa-se que o gráfico $i_p \times v^{1/2}$ é linear, mas não passa pela origem. Isso é uma evidência que as reações eletródicas são controladas difusionalmente, mas há reações químicas acopladas à transferência de carga.

Um critério bastante utilizado para determinar-se a não reversibilidade do processo eletródico é devida a uma transferência eletrônica lenta ou a uma reação química acoplada é a análise da curva $i_p \cdot v^{-1/2} \times v$. A função corrente ($i_p \cdot v^{-1/2}$) é um parâmetro que independe de v para processos reversíveis e irreversíveis. Entretanto, se a irreversibilidade do processo eletródico é proveniente de reação química acoplada ao processo de transferência eletrônica, ($i_p \cdot v^{-1/2}$) varia com v dependendo da natureza da reação química, podendo ser observada uma diminuição ou um aumento da função corrente. A figura 9 mostra o gráfico $i_p \cdot v^{-1/2}$ em função de v para a rutina $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ na presença do ácido *p*-toluenosulfínico e pH 2,0. Essa análise foi feita somente para o primeiro pico de oxidação.

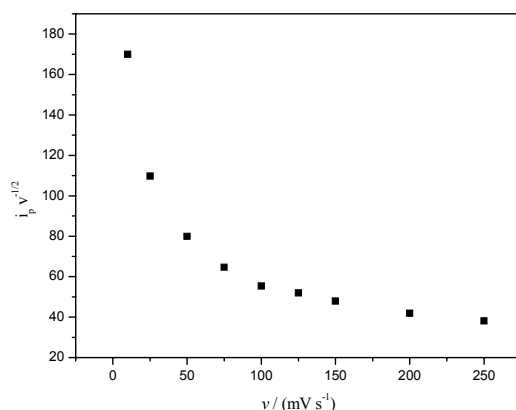


Figura 9. Gráfico $i_p \cdot v^{-1/2} \times v$ para a rutina $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em acetonitrila /tampão fosfato (4:1 v/v) na presença do ácido *p*-toluenosulfínico $1,2 \text{ mmol L}^{-1}$ ($C_{\text{vítreo}}$, pH 2,0).

O deslocamento químico de função corrente com ν observado para a oxidação de rutina sugere a presença de uma reação química acoplada à transferência eletrônica no processo de oxidação da rutina.

4.3. Influência da modificação do potencial de inversão anódico ($E_{\lambda,a}$)

Conforme demonstrado anteriormente, existe uma reação química homogênea subsequente (provavelmente) à formação do produto de oxidação do pico I. Assim, a modificação do potencial positivo de inversão é de fundamental importância para a compreensão comportamento específico dos processos que ocorrem em um determinado pico.

A figura 10 mostra a influência de ν sobre os voltamogramas cíclicos obtidos para a rutina $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ com $E_{\lambda,a} = (E_p^I + 0,10) \text{ V/ECS}$ na presença do ácido *p*-toluenosulfínico $1,2 \text{ mmol L}^{-1}$ em acetonitrila/tampão fosfato (4:1 v/v) em pH 2,0.

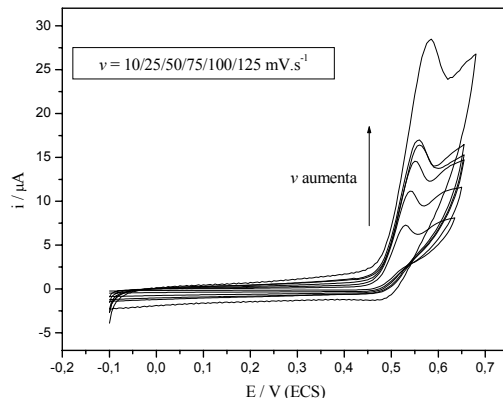


Figura 10. Voltamogramas cíclicos para rutina $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em acetonitrila/tampão fosfato (4:1 v/v) na presença do ácido *p*-toluenosulfínico $1,2 \text{ mmol L}^{-1}$ ($C_{\text{vítreo}}$, pH 2,0, 10-125 mV s^{-1} , $E_{\lambda,c} = -0,10 \text{ V}$, $E_{\lambda,a} = (E_p^I + 0,10 \text{ V/ECS})$).

Os voltamogramas acima mostram claramente a presença de um pico de oxidação irreversível, isto é, o produto formado no pico I não está sujeito à redução. Isso sugere que

o produto formado eletroquimicamente em E_p^I é rapidamente consumido pelo nucleófilo. Rapidamente, confirmando os resultados anteriores que há uma reação química homogênea que sucede a etapa eletroquímica heterogênea de transferência de carga. Logo, os resultados apresentados até aqui, permitem afirmar que no pico I ocorre à oxidação eletroquímica da rutina nas posições C3' e C4', formando a *o*-quinona correspondente. Em solução, a *o*-quinona reage com o ácido *p*-toluenosulfínico, formando um derivado sulfínico. Esse tipo de mecanismo é conhecido na eletroquímica como mecanismo EC (Electrochemical-Chemical), onde uma reação química homogênea (em solução) sucede uma etapa eletroquímica heterogênea de transferência de carga (no eletrodo).

4.4. Eletrossíntese do Derivado Sulfínico da Rutina

4.4.1. Eletrólise com Potencial Controlado

Experimentos de cronoamperometria foram realizados com os objetivos de determinar o número de elétrons envolvidos no primeiro pico de oxidação, fazer a eletrossíntese e identificar o derivado sulfínico da rutina. A eletrólise foi realizada no potencial de 0,8 V, sendo que a solução continha 1,0 mmol L⁻¹ de rutina e 1,2 mmol L⁻¹ do ácido *p*-toluenosulfínico. A eletrólise foi finalizada quando a corrente apresentou um decréscimo de cerca de 90% de seu valor inicial. A carga total foi, então, calculada pela integração da curva $I \times t$.

A figura 11 (a) mostra os voltamogramas cíclicos da rutina 1,0 mmol L⁻¹ na ausência do ácido *p*-toluenosulfínico em diferentes velocidades de variação de potencial. Esses voltamogramas foram obtidos para estudar o comportamento do sistema na faixa de potencial onde foi realizada a eletrólise da rutina na presença do nucleófilo, isto é, $E_{\lambda,c} = -0,10$ V e $E_{\lambda,a} = (E_p^I + 0,10 \text{ V/ECS})$. Nessas condições observou-se claramente que o processo de oxidação da rutina é quase reversível, sendo que os voltamogramas mostram um pico de oxidação e outro da redução dependentes da velocidade.

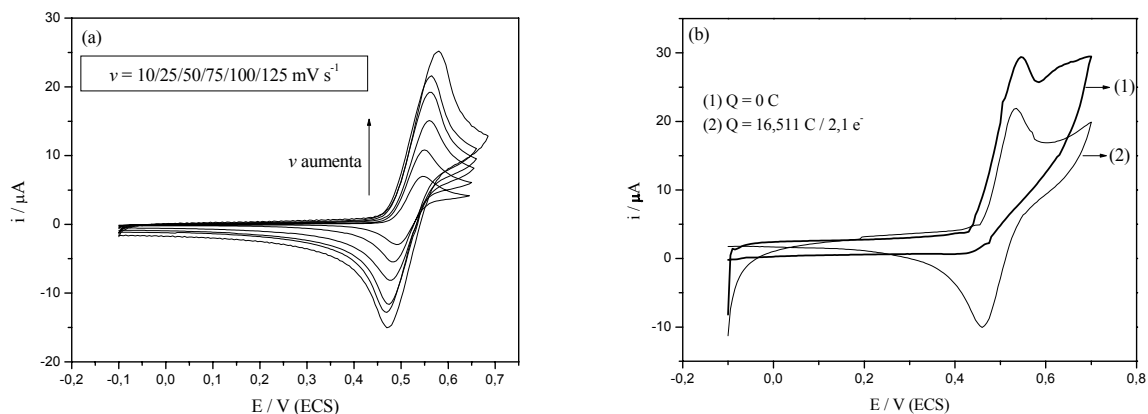


Figura 11. Voltamogramas cíclicos para rutina $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em acetonitrila/tampão fosfato (4:1 v/v) (a) na ausência ($10\text{-}125 \text{ mV s}^{-1}$) e (b) na presença (50 mV s^{-1}) do ácido *p*-toluenosulfínico $1,2 \text{ mmol L}^{-1}$ (1) antes do início da eletrólise e (2) após o término da eletrólise ($C_{\text{vítreo}}$, pH 2,0, $E_{\lambda,c} = -0,10 \text{ V}$, $E_{\lambda,a} = (E_p^I + 0,10 \text{ V/ECS})$).

A figura 11 (b) mostra os voltamogramas cíclicos obtidos sobre eletrodo de carbono vítreo para rutina $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em acetonitrila/tampão fosfato (4:1) em pH 2,0 na presença do ácido *p*-toluenosulfínico $1,2 \text{ mmol L}^{-1}$ na velocidade de variação de potencial de 50 mV s^{-1} antes e após a eletrólise. Foram registrados outros voltamogramas, mas para maior clareza são mostrados apenas estes dois. No voltamograma obtido antes da eletrólise, observa-se um pico de oxidação irreversível. Após a eletrólise, o voltamograma mostra também um pico de redução num processo, aparentemente, quase reversível.

A tabela 2 mostra a carga consumida durante as eletrólises.

Tabela 2. Carga consumida durante as eletrólises

Faixa de tempo (minutos)	Carga (Coulombs)
0 – 10	1,457
10 – 20	2,686
20 - 30	1,583
30 - 40	1,612
40 - 50	1,474
50- 60	1,375
60 – 70	1,721
70 - 80	1,203
80 -110	3,445
0 – 110	$Q_{\text{total}} = 16,511 \text{ C}$

Uma vez que na solução de partida (80 mL) a massa de rutina foi de 0,04884 grama e a carga consumida até o término da eletrólise foi de 16,511 Coulombs, é possível calcular o número de elétrons transferidos no processo correspondente ao pico I aplicando-se as leis de Faraday.^{16,17}

$$\begin{array}{l} 1 \text{ mol de elétrons} \quad \text{-----} \quad 96485 \text{ Coulombs} \\ x \text{ mol de elétrons} \quad \text{-----} \quad 16,511 \text{ Coulombs} \\ x = 1,7113 \times 10^{-4} \text{ mol de elétrons} \end{array}$$

$$\begin{array}{l} 0,04884 \text{ grama} \quad \text{-----} \quad 1,7113 \times 10^{-4} \text{ mol de elétrons} \\ 610,5 \text{ gramas} \quad \text{-----} \quad \text{mol de elétrons (n)} \\ n = 2,1391 \text{ mols de elétrons} \end{array}$$

Durante a eletrólise, principalmente nos minutos iniciais, a solução mudou sua coloração inicial amarela para marrom. Sabidamente, *o*-quinonas conferem a cor marrom à solução onde eles estão presentes, mas são bastante instáveis, decompondo-se em outros produtos e dificultando seu isolamento e caracterização. A observação da cor marrom e o

número de elétrons calculados, sugerem que inicialmente ocorre a oxidação da rutina à *o*-quinona correspondente. A presença do ácido *p*-toluenosulfínico favorece a formação de um produto mais estável que a *o*-quinona, já que à medida que ela é formada, reage com o ácido *p*-toluenosulfínico, sendo consumida pelo nucleófilo numa reação química homogênea (em solução).

4.4.2. Caracterização

O composto formado durante a eletrólise foi isolado e caracterizado por IV, RMN¹H, RMN¹³C, cujos espectros estão anexados no final da monografia. De acordo com esses resultados, o produto isolado é o 3,3',4',5,7-pentahidróxi-6'(4-metilfenilsulfonil) flavona.

Com base nessas informações e nos resultados de voltametria cíclica é proposto o esquema reacional mostrado na figura 12. Nessa proposta, a rutina inicialmente é oxidada formando a *o*-quinona correspondente, num processo eletroquímico envolvendo a presença de dois elétrons e de dois prótons. Essa *o*-quinona é instável e se decompõe em outros produtos eletroquimicamente inativos.¹⁸ Todavia, ela pode ser reduzida ao seu composto inicial, isto é, a rutina. Isso é comprovado pelos voltamogramas expostos na figura 11a, que mostram um pico de oxidação e outro de redução dependentes da velocidade. Na presença do ácido *p*-toluenosulfínico, a rutina é oxidada eletroquimicamente (formando a *o*-quinona) e há uma reação química em fase homogênea subsequente (como sugerido pelos resultados voltamétricos). Essa reação química em fase homogênea é a reação da *o*-quinona com o ácido *p*-toluenosulfínico, formando o 3,3',4',5,7-pentahidróxi-6'(4-metilfenilsulfonil) flavona. Nessa reação, o grupo catecol no anel C é regenerado, como sugerimos na Figura 12. Os voltamogramas antes e após a eletrólise (Figura 11b) são compatíveis com essa proposta. Antes da eletrólise, ocorre a oxidação da rutina com formação da *o*-quinona (na superfície do eletrodo) e imediata reação desta com o nucleófilo (em solução) formando o derivado sulfínico e regenerando o catecol. A variação negativa de potencial não registra nenhum pico e redução, pois não há quinona para ser reduzida. Após a eletrólise, há uma grande quantidade de 3,3',4',5,7-pentahidróxi-6'(4-metilfenilsulfonil) flavona em solução. A voltametria cíclica dessa solução (figura 11b-2) mostra a oxidação do 3,3',4',5,7-

pentahidróxi-6'(4-metilfenilsulfonil) flavona gerando, também, a *o*-quinona correspondente. Todavia, esta *o*-quinona é mais estável e pode ser reduzida quando a variação de potencial é feita no sentido negativo.

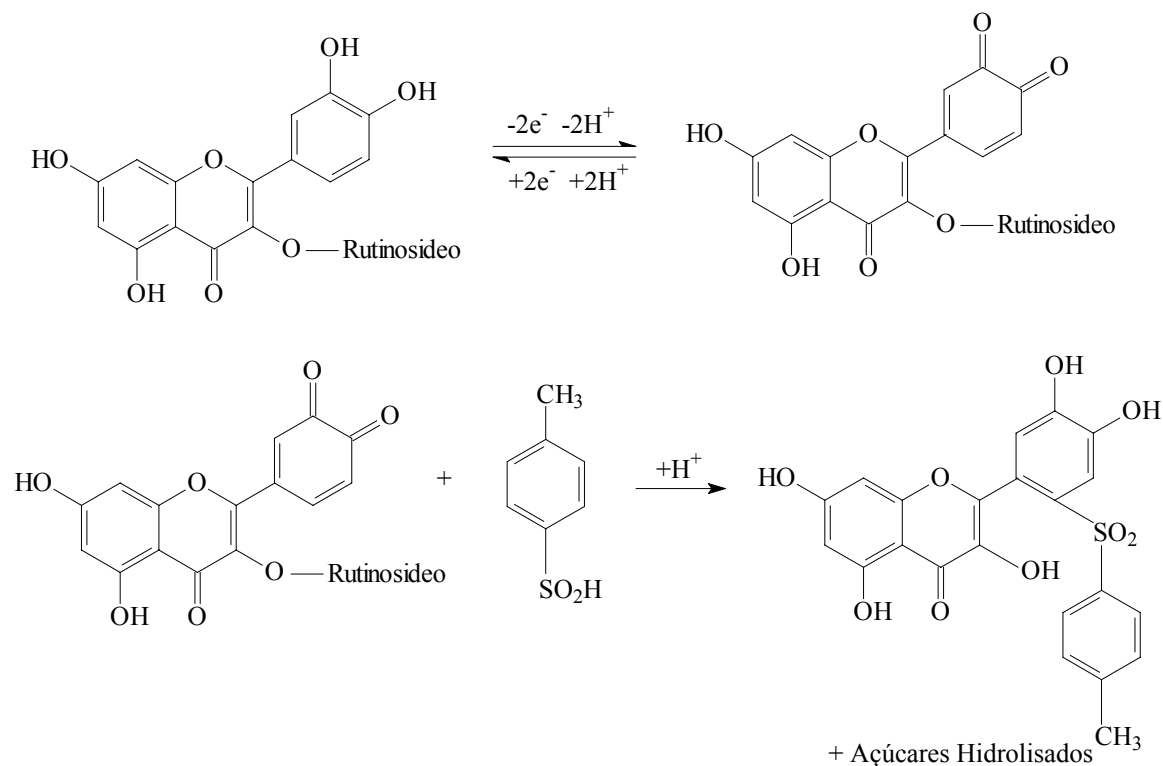


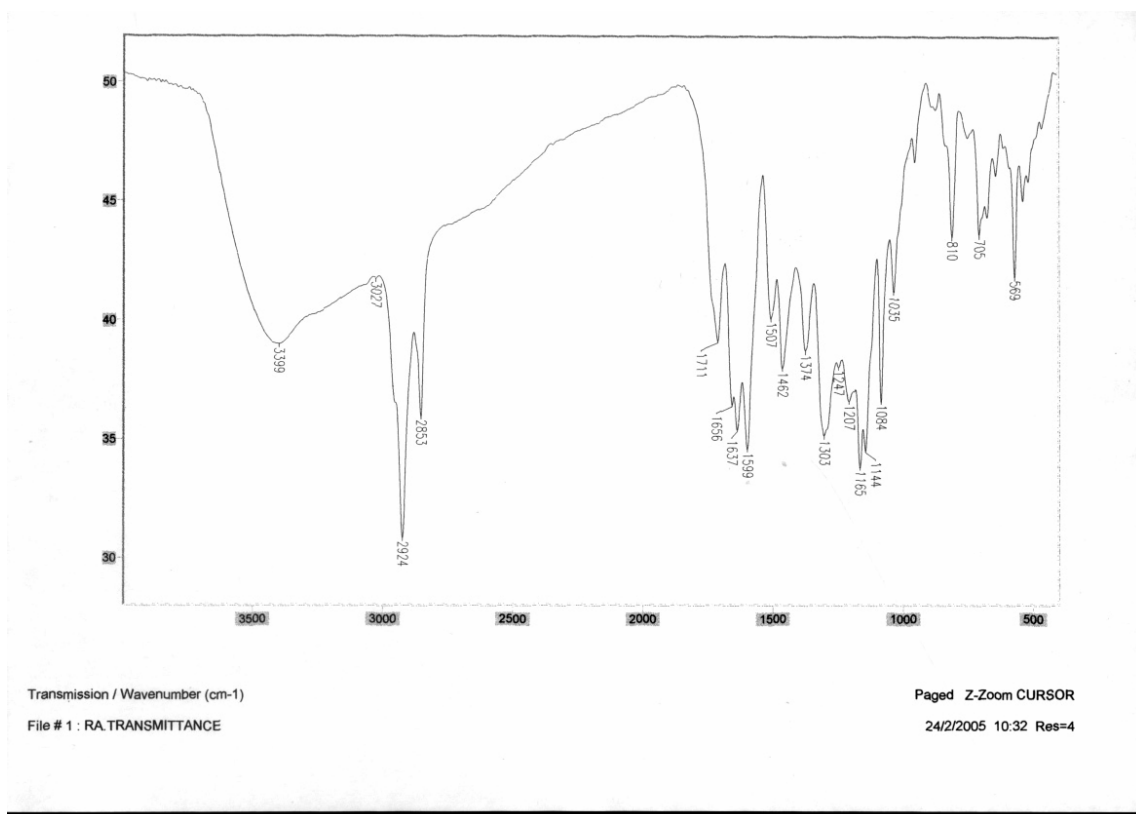
Figura 12. Esquema reacional para formação do 3,3',4',5,7-pentahidróxi-6'(4-metilfenilsulfonil) flavona.

Este trabalho teve como objetivos investigar a eletro-oxidação da rutina na presença do ácido *p*-toluenosulfínico (APT) como nucleófilo, visando desenvolver um método eletroquímico fácil para a eletrossíntese de um derivado sulfínico da rutina e estudar o mecanismo de transferência de elétrons da rutina na presença do nucleófilo em solução acetonitrila/tampão fosfato (4:1) em pH 2,0.

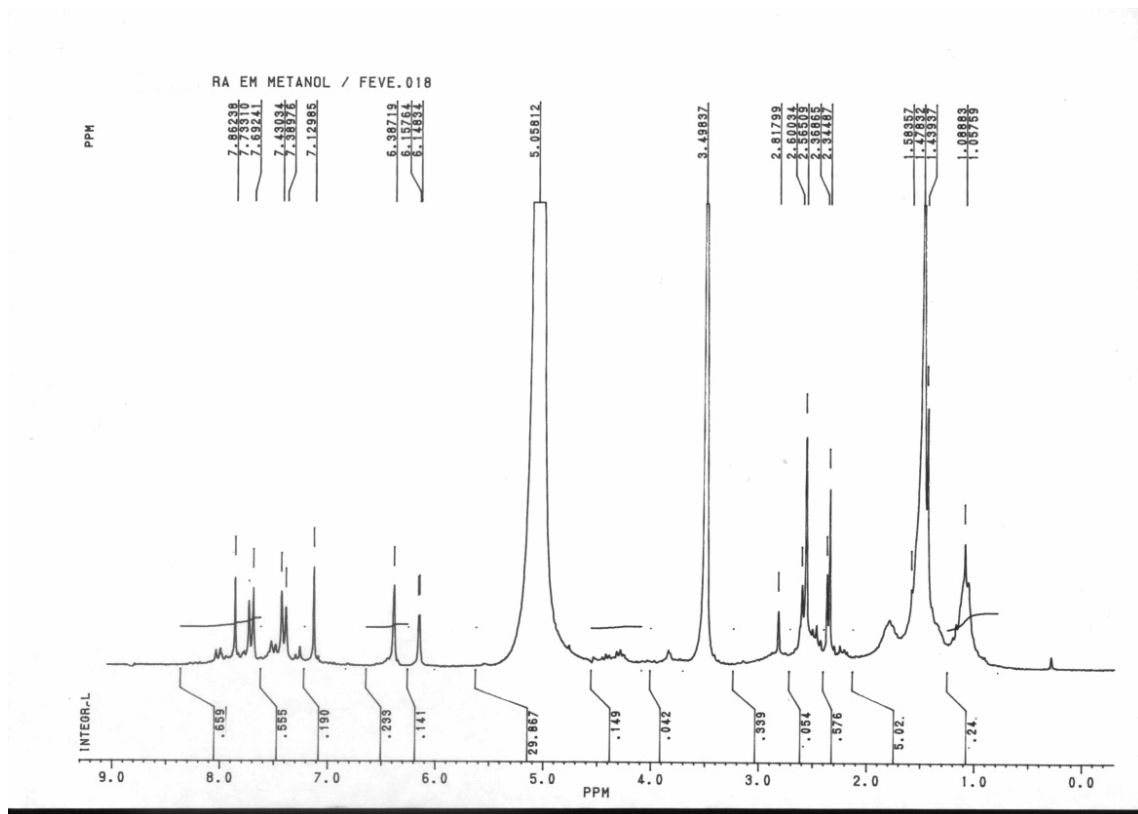
Os estudos eletroquímicos e espectroscópicos permitiram atingir plenamente esses objetivos. Constatou-se que a rutina oxida-se facilmente sobre o eletrodo de carbono vítreo numa etapa irreversível envolvendo dois elétrons e originando a *o*-quinona correspondente. Em solução, a *o*-quinona participa de uma reação de adição de Michael com o ácido *p*-toluenosulfínico, formando um derivado eletroquimicamente ativo. Concomitante a essa reação, há a hidrólise dos açúcares (raminose e glicose) ligados ao anel B, os quais são liberados para a solução. O processo completo é conhecido como mecanismo EC (Electrochemical-Chemical), onde uma reação química homogênea sucede uma reação eletroquímica heterogênea. Os processos eletródicos que ocorrem no pico I são controlados pela difusão, como demonstraram os estudos sobre a influência da velocidade de variação do potencial.

Estudos adicionais continuam a ser realizados no GEPEEA na tentativa de caracterizar os processos eletroquímicos e químicos que ocorrem nos picos voltamétricos II e III.

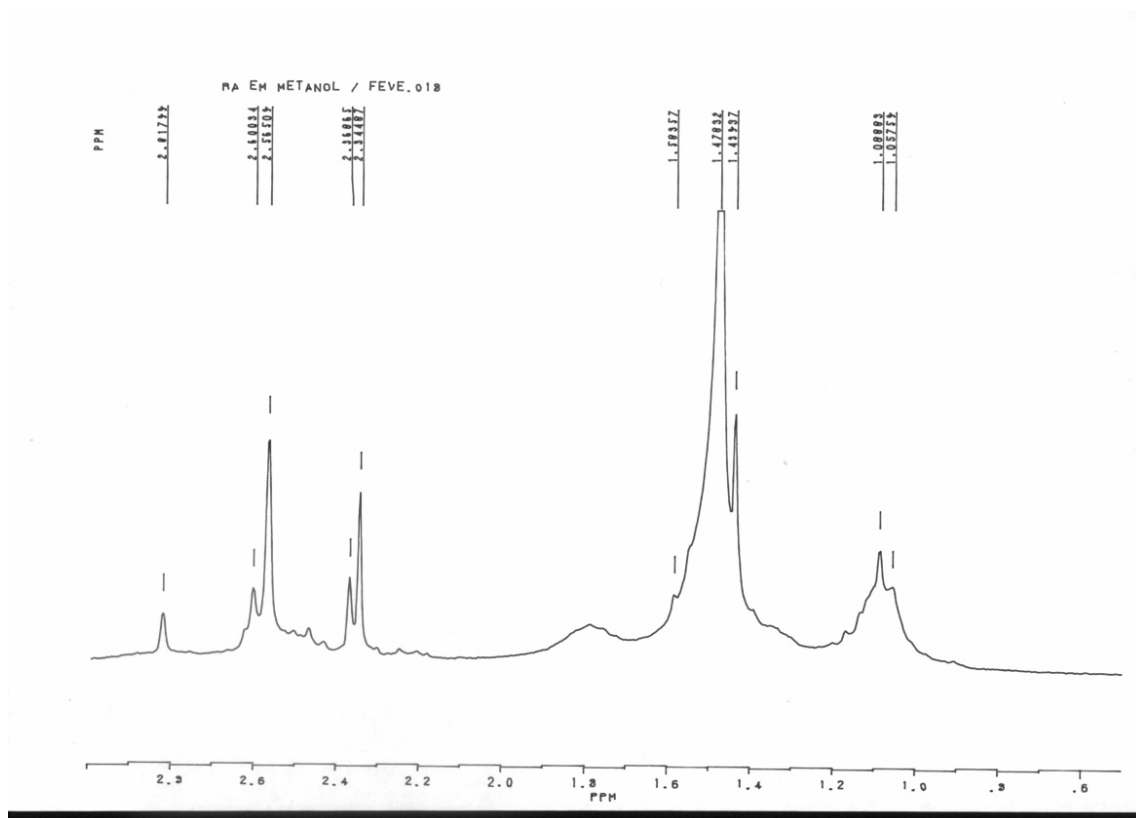
ANEXO: ESPECTROS



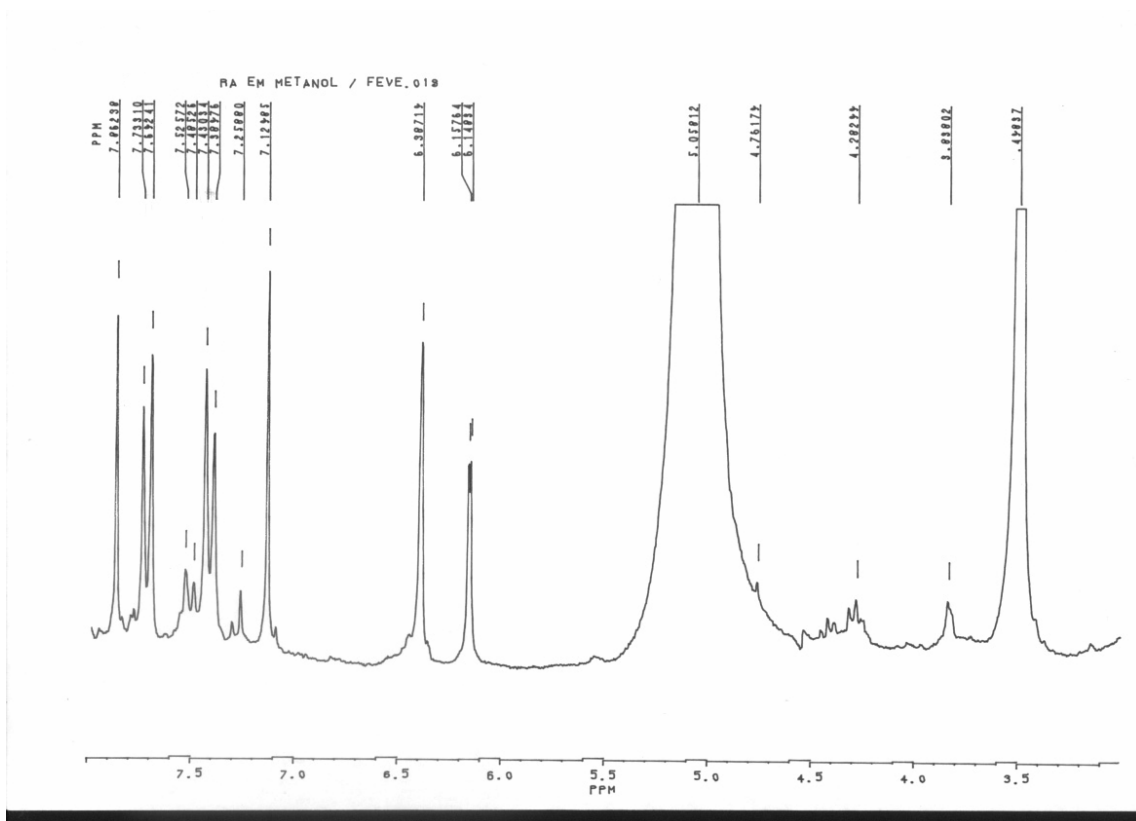
Espectro 1. Espectro de IV do 3,3', 4', 5, 7-pentahidróxi-6'(4-metilfenilsulfonil) flavona.



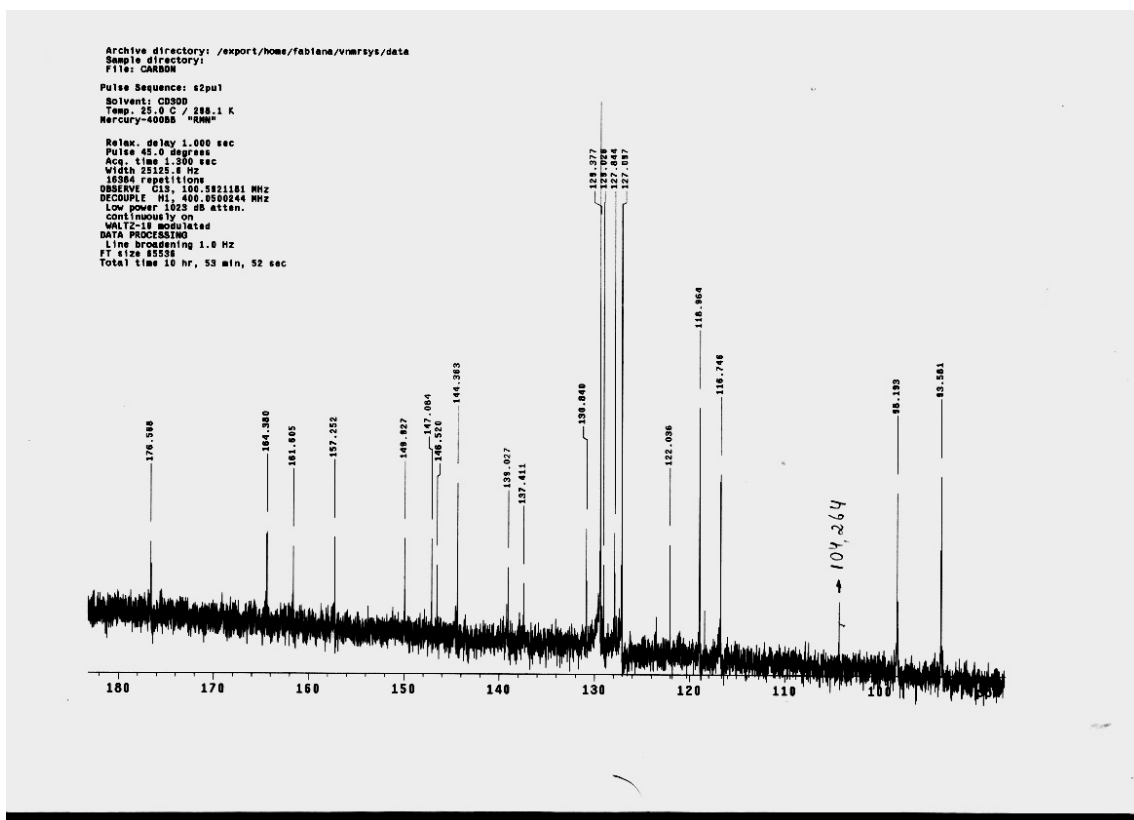
Espectro 2. Espectro de RMN¹H (200 MHz) em metanol deuterado, do 3,3', 4', 5, 7-pentahidróxi-6'(4-metilfenilsulfonyl) flavona.



Espectro 3. Espectro de RMN¹H (200 MHz) em metanol deuterado, do 3,3', 4', 5, 7-pentahidróxi-6'(4-metilfenilsulfonyl) flavona, na região de 0 a 3 ppm.



Espectro 4. Espectro de RMN¹H (200 MHz) em metanol deuterado, do 3,3', 4', 5, 7-pentahidróxi-6'(4-metilfenilsulfonil) flavona, na região de 3 a 8 ppm.



Espectro 5. Espectro de RMN¹³C (50 MHz) em metanol deuterado, do 3,3', 4', 5, 7-pentahidróxi-6'(4-metilfenilsulfonil) flavona, na região de 80 a 180 ppm.

Referências Bibliográficas

- 1 – Simões, C. M.O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R.; *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3^a ed., Editora da UFSC, Florianópolis - SC, **2001**, 499 - 520.
- 2 - Markhm, K. R.; *Techniques of Flavonoid Identification*. Academic Press Inc., New York, **1982**, 46.
- 3 – Agrawal, E. P. K., *¹Carbon-13 NMR of flavonoids Studies in Organic Chemistry*, Vol 39, Elsevier, Amsterdam, **1989**, 341-342.
- 4 – Jovanovic, V. S.; Steenken, S.; Tosic, M.; Marjanovic, B.; Simic, M. G.; *Journal of American Chemical Society*. **1994**, 116, 4846-4851.
- 5- Calabro, M. L.; Tommasini. S.; Donato, P.; Stancanelli, R.; Raneri, D.; Catania, S.; Costa, C.; Villari, V.; Ficarra, P.; *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **2005**, 36, 1019-1027.
- 6- Giacomelli, C.; Ckless K.; Galato, D.; Miranda F. S.; Spinelli A.; *Journal of the Brazilian Chemical Society*. **2002**, Vol. 13 (3), 332-338.
- 7 - Giacomelli, C.; Giacomelli F.C.; Alves, L. O.; Timbola A. K.; Spinelli A.; *Journal of the Brazilian Chemical Society*. **2004**, Vol. 15, (5), 748-755.
- 8 – Pietta, P.; *Journal of Natural Products*. **2000**, 63, 1035.
- 9 – Harper, A.; Murray, R. K.; *Bioquímica*. 7^a ed., SP, Ateneu, **1994**, 351.
- 10 - Sugihara, N.; Arakawa, T.; Ohnishi, M.; Furuno, K.; *Free Radical Biology & Medicine*. **1999**, Vol. 27 (11/12), 1313-1323.
- 11 – Robak, J.; Gryglewski, J.; *Biochemical Pharmacology*. **1988**, 37, 837.
- 12 - Janeiro, P.; Brett, A. M. O.; *Analytica Chimica Acta*. **2004**, 518, 109-115.
- 13 – Dangles, O.; Fargeix, Guillaume.; Dufour, C.; *Journal of Chemical Society*. **1999**; 1387-1395.
- 14- Nematollahi, D.; Malakzadeh, M.; *Journal of Electroanalytical Chemistry*. **2003**, 547 191 – 195.
- 15 – Carrijo, R. M.; Romero, J. R.; *Química Nova*, **2000**, 23(3), 331-337.
- 16- Brett, C. M. A.; Brett, A. M. O.; *Electrochemistry: Principles, Methods, and Applications*. **1993**, Oxford, Great Britain, 174.

- 17– Bard, A.J.; Faulkner, L. R.; *Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications*. **1980**, John Wiley & Sons Inc: New York, 451.
- 18 – Timbola A. K., *Dissertação de Mestrado: Eletro-oxidação da Quercetina em Solução Hidro-alcoólica*. UFSC, **2004** Florianópolis/SC.