

Eclética Química Journal

Original research publication in all aspects of Chemistry
homepage: <http://revista.iq.unesp.br/ojs/index.php/eclética/>
ISSN 1678-4618

| Vol. 41 | 2016 |

Determinação de rutina em formulações farmacêuticas utilizando um sistema de análise por injeção em fluxo envolvendo multicomutação

Déborah C. Azzi¹, Geiser G. Oliveira¹, Bruno C. Janegitz^{1,2}, Viviane G. Bonifácio³, Orlando Fatibello-Filho¹ & Luiz H. Marcolino-Junior^{4*}

Resumo: O presente trabalho descreve um método quimiluminescente de análise por injeção em fluxo envolvendo multicomutação, para a determinação de rutina em formulações farmacêuticas. O método é baseado na oxidação da rutina pelo hipoclorito de sódio, a qual promove o decréscimo da magnitude do sinal quimiluminescente, se comparado à reação na ausência de rutina. Sob condições otimizadas, foi obtida uma curva analítica para concentrações de rutina variando de $5.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ a $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ($r = 0,996$) com um limite de detecção de $9.7 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e uma frequência de amostragem de 120 h^{-1} . Estudos de repetibilidade para uma concentração de rutina de $7,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ apresentaram um desvio padrão relativo (DPR) menor que 5,0% para 10 determinações consecutivas. O método proposto foi aplicado com sucesso na determinação de rutina em formulações farmacêuticas.

Palavras-chave: Análise por injeção em fluxo, Rutina, Quimiluminescência, Multicomutação

Abstract: This paper reports a flow injection chemiluminescence method involving multicommutation for rutin determination in pharmaceutical formulations. The method is based on the oxidation of rutin by sodium hypochlorite which decreases the signal magnitude when compared with the same reaction without the rutin. Under optimized conditions, an analytical curve was obtained for rutin concentration range from $5.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ to $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ($r = 0.9966$) with detection limit of $9.7 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ and a sampling frequency of 120 h^{-1} . Repeatability study for a $7.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ rutin concentration showed a relative standard deviation (RSD) less than 5.0% for ten consecutive determination. The proposed method was applied successfully for rutin determination in pharmaceutical products.

Keywords: Flow injection analysis, Rutin, Chemiluminescence, multicommutation.

¹ Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP, Brasil;

² Departamento de Ciências da Natureza, Matemática e Educação, Universidade Federal de São Carlos, Araras-SP, Brasil;

³ Departamento de Química, Universidade Estadual de Goiás, Anápolis-GO, Brasil;

⁴ Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, Brasil.

*e-mail: luiz1berto@ufpr.br

INTRODUÇÃO

Os flavonoides são compostos fenólicos que apresentam diversidades estruturais, os quais podem ser divididos em diferentes classes^{1,2}. Entre elas podemos destacar as flavanonas, antocianidinas, flavonas, isoflavonas e flavonóis³. Os flavonóis apresentam atividades farmacológicas, os quais têm sido utilizados em tratamentos de doenças como *diabetes mellitus*, alergias e úlceras pépticas⁴. Eles são fitoquímicos, ou seja, de origem vegetal, sendo considerados princípios ativos em muitas plantas.

A rutina (quercetina-3-ramnosilglicosídeo) é um flavonol glicosídico, encontrado em frutas cítricas e em alguns vegetais, que apresentam grande importância terapêutica atuando na inibição da formação de radicais livres e na melhora da resistência das paredes dos vasos capilares³. Além disso, possui ações antioxidantes, anti-inflamatórias, vasodilatadoras, antialérgicas, antivirais, propriedades estimulantes do sistema imunológico e auxilia também no aumento da eficácia da vitamina C evitando sua oxidação^{4,7}.

Diversas técnicas analíticas têm sido empregadas para a determinação de rutina, incluindo cromatografia com detecção espectrofotométrica⁸, eletroquímica^{3,9} e métodos espectrofotométricos¹⁰. Os métodos espectrofotométricos utilizando análise por injeção em fluxo (FIA) são alternativas interessantes para a detecção de compostos em formulações farmacêuticas pois são procedimentos relativamente baratos e facilmente adaptáveis em análise de rotina aplicada em laboratórios de controle de qualidade¹¹. Os sistemas FIA apresentam algumas vantagens, tais como o baixo consumo de reagentes e amostras, baixo risco de contaminação durante a análise e baixo custo da instrumentação¹²⁻¹⁵. Quando associado a um sistema com multicomutação, tais procedimentos tornam-se ainda mais atrativos, pois apresentam alta frequência de amostragem e boa versatilidade¹⁶. O sistema FIA por multicomutação é um sistema no qual comutadores independentes, controlados por computador, controlam a adição de pequenas frações de reagentes e amostras alternadamente no sistema analítico utilizando uma rede de tubos

interconectados, o que permite direcionar os fluxos e utilizá-los em distintos procedimentos analíticos com diferentes tipos de reação.

A luminescência é um fenômeno que descreve a emissão de luz quando uma molécula no estado excitado decai para o estado fundamental. Há alguns tipos de luminescência que se diferenciam pelo estímulo de energia empregada para se obter o estado excitado. Quando a fonte de energia é proveniente de uma reação química, emprega-se o termo quimiluminescência¹⁷. Uma das reações mais exploradas desde o ano 1928 é a oxidação do luminol sendo empregados diversos compostos como agente oxidante¹⁸⁻²². Na literatura encontram-se procedimentos envolvendo reações quimiluminescentes para a determinação de diferentes espécies. Esses procedimentos destacam-se por apresentarem boa sensibilidade e ampla faixa de resposta linear²³⁻²⁶.

O presente trabalho descreve um procedimento analítico para a determinação de rutina em formulações farmacêuticas utilizando um sistema de análise por injeção em fluxo envolvendo multicomutação com a inibição do sinal quimiluminescente, produzido pela oxidação do luminol após a reação com hipoclorito de sódio. A adição de rutina consome parcialmente o hipoclorito, diminuindo assim a intensidade luminosa proporcionalmente à concentração de rutina na amostra. O uso da multicomutação, bem como a quantificação do analito a partir da inibição do sinal medido são as principais novidades do procedimento proposto. Além disso, um aumento significativo da sensibilidade e também da frequência analítica foi observado.

PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Reagentes e soluções

As soluções foram preparadas empregando-se água deionizada e reagente com grau analítico. Os reagentes luminol e rutina foram obtidos da Sigma-Aldrich. Carbonato de potássio (K_2CO_3) e hipoclorito de sódio (NaClO) foram obtidos da Vetec. Uma solução de luminol $9,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada

com uma solução de K_2CO_3 $0,60 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 11. Soluções de hipoclorito de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas a partir de uma solução de 6% v/v diariamente. Também foram preparadas soluções de rutina $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e posteriormente foram diluídas em água deionizada. As amostras comerciais da marca Novarrutina[®] foram adquiridas em farmácias da cidade de São Carlos-SP.

Equipamentos

Foram empregadas válvulas solenoides de três vias (NResearch, West Caldwell, 161T031), tubos de polietileno de 0,8 mm de diâmetro interno e conectores feitos de acrílico. O gerenciamento das válvulas solenoides foi realizado por um microcomputador equipado com uma interface eletrônica (Advantec Corp. PCL 711S). A propulsão das soluções no sistema em fluxo foi realizada por uma bomba peristáltica (Ismatec, modelo 7618-50, 8-canais, Zurique, Suíça) equipada com tubos de Tygon. Empregou-se um fotodetector (OSD50-E, RS 846-711)²⁷ e uma cela de fluxo em polietileno²⁸ para a obtenção das medidas de radiação quimioluminescentes.

Após a aquisição de cada sinal transiente, os dados referentes às medidas da intensidade luminescente (mV) são salvos no arquivo previamente definido, em colunas independentes e o sinal transiente é mostrado no espaço reservado no formulário. Assim, os valores em mV são associados aos valores de tempo nos quais a aquisição foi efetuada.

Diagrama de fluxo e procedimento

Na Figura 1 é apresentado o diagrama de fluxo utilizado no procedimento proposto. O módulo apresentado é constituído por 4 válvulas solenoides (V_1 - V_4), que gerenciam a inserção de reagentes e da solução transportadora no sistema. Inicialmente, todas as válvulas estão fechadas, sendo que a V_1 está invertida. A solução transportadora flui pelo sistema, enquanto as outras soluções ficam reciclando para seus respectivos frascos. Abrindo-se a válvula V_4 , por exemplo, a solução transportadora continua fluindo, as soluções A e R_1 continuam reciclando e a solução R_2 é

introduzida no sistema e, subsequentemente, é transportada à célula de detecção.

Para a obtenção do branco, a válvula V_3 (hipoclorito de sódio) é acionada juntamente com a solução transportadora, as quais fluem pelo percurso analítico por um tempo a ser estabelecido. Na sequência, é então acionada a válvula V_4 (luminol), por um tempo também determinado, permitindo a reação entre o luminol e o hipoclorito, obtendo-se assim o sinal da luminescência.

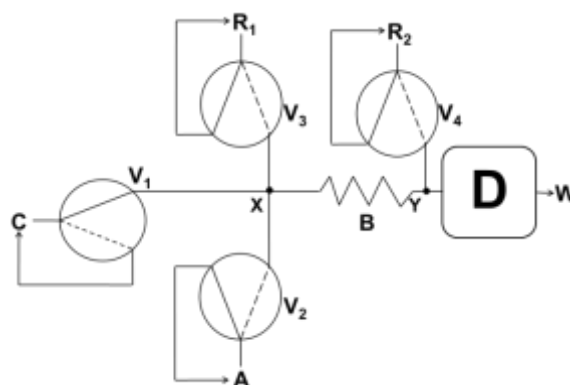


Figura 1. Diagrama de fluxo utilizado para a análise de rutina. C = solução transportadora (K_2CO_3); A = rutina; R_1 = solução de hipoclorito sódio; R_2 = solução de luminol; V_1 , V_2 , V_3 e V_4 = Válvulas solenoides de 3 vias para controle das soluções; D = detector; B = percurso analítico; W = descarte; X e Y = pontos de confluência.

A inibição do sinal da luminescência é promovida pela reação entre a rutina, hipoclorito de sódio e luminol, a qual ocorre abrindo-se simultaneamente as válvulas solenoides V_2 (solução padrão rutina/amostra, A), V_3 (hipoclorito de sódio, R_1) e a V_1 (solução transportadora de carbonato de potássio, C) por um tempo previamente determinado. Assim, a solução transportadora (V_1) retorna para seu frasco e alíquotas de amostra/padrões (V_2) e solução de hipoclorito de sódio (V_3) são inseridas no percurso analítico no ponto X. No percurso analítico (B), ocorre então a reação entre a solução de rutina e hipoclorito de sódio (oxidação da rutina pelo hipoclorito). Na sequência, a válvula V_4 (luminol, R_2) é então acionada e uma alíquota de luminol é inserida no sistema no ponto Y. O luminol reage com o excesso de hipoclorito, que não foi consumido pela rutina, obtendo-se assim o sinal da luminescência. A

diferença entre os sinais do branco (hipoclorito e luminol) e da reação entre hipoclorito, rutina e luminol é determinada, sendo esta proporcional à concentração de rutina.

Preparo das amostras

As amostras de rutina foram preparadas a partir da trituração, com auxílio de um almofariz e pistilo, de dez comprimidos previamente pesados. A massa de dez comprimidos de rutina foi pesada e triturada com auxílio de um almofariz e pistilo. Então, a massa equivalente a de um comprimido de rutina foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL e dissolvida com água deionizada. A solução foi filtrada

por gravidade utilizando um funil de vidro e papel de filtro (10 cm de diâmetro). Transferiu-se uma alíquota desta para um balão volumétrico de 25 mL e completou-se com água deionizada. A solução preparada foi empregada para a determinação de rutina através do procedimento proposto a 25 °C.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A determinação da rutina baseou-se na supressão do sinal quimioluminescente gerado a partir da reação do hipoclorito de sódio com luminol (Figura 2).

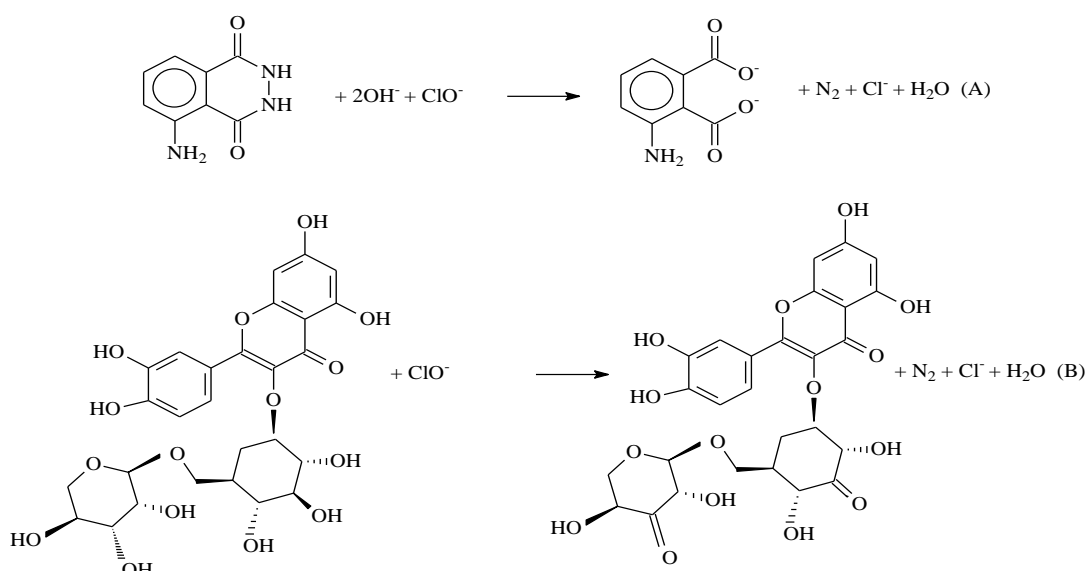


Figura 2. Reação de oxidação da rutina pelo hipoclorito em (A); reação do hipoclorito com o luminol em (B).

Primeiramente, há reação do hipoclorito de sódio com luminol (em meio básico de K_2CO_3 $0,60 \text{ mol L}^{-1}$, com pH 11). (Figura 3A). A adição de rutina consome parcialmente o hipoclorito, diminuindo assim a

intensidade luminosa proporcionalmente à concentração de rutina na amostra (Figura 3B):

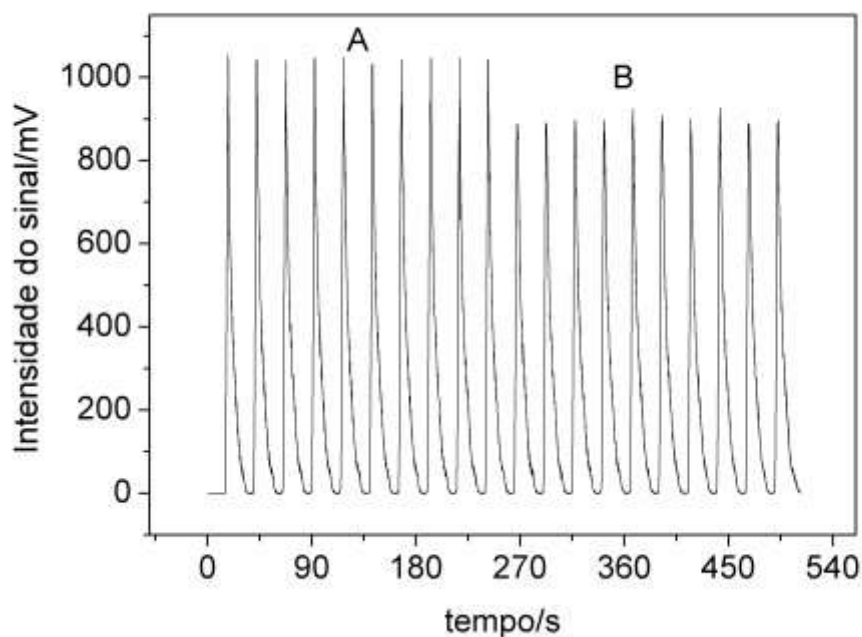


Figura 3. Sinais transientes obtidos empregando-se o sistema proposto: (A) reação do hipoclorito de sódio $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ com luminol $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e (B) após a injeção solução da rutina na concentração de $7,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Demais parâmetros: bobina helicoidal de 75 cm; vazão de 2 mL min^{-1}

Inicialmente, estudou-se a concentração de hipoclorito de sódio no intervalo de concentração de $5,0 \times 10^{-4}$ a $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ utilizando o sistema proposto. As seguintes condições experimentais empregadas foram: solução transportadora de carbonato de sódio $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, $66 \mu\text{L}$ de solução de rutina $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ($V_2 = 2 \text{ s}$), $66 \mu\text{L}$ de solução de hipoclorito de sódio ($V_3 = 2 \text{ s}$) e $66 \mu\text{L}$ de solução de luminol $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ($V_4 = 2 \text{ s}$), bobina helicoidal de 25 cm e vazão de $2,0 \text{ mL min}^{-1}$. Houve um aumento do sinal analítico entre as concentrações de $5,0 \times 10^{-4}$ a $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e não se observou aumento da variação de sinal para maiores concentrações, pois a partir de concentrações superiores a $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ não há um excedente de luminol (reagente limitante) para reagir com o excesso de hipoclorito de sódio. Portanto, selecionou-se a solução de hipoclorito de sódio $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ para estudos posteriores.

A influência da concentração de luminol no sinal analítico foi também avaliada no intervalo de concentração de $5,0 \times 10^{-4}$ a $9,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Mantiveram-se as condições do sistema fixadas em:

$66 \mu\text{L}$ de solução de rutina $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ($V_2 = 2 \text{ s}$), $66 \mu\text{L}$ de solução de hipoclorito de sódio $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ($V_3 = 2 \text{ s}$) e $66 \mu\text{L}$ de solução de luminol nas concentrações mencionadas acima ($V_4 = 2 \text{ s}$), bobina helicoidal de 25 cm, vazão de $2,0 \text{ mL min}^{-1}$ e a solução transportadora de carbonato de sódio $0,05 \text{ mol L}^{-1}$. Observou-se um aumento da variação do sinal analítico até $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de luminol e a partir de então, não ocorreu aumento significativo de sinal, neste caso o hipoclorito se comporta como o reagente limitante da reação, selecionando-se a concentração da solução de luminol $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ para demais estudos.

A próxima etapa do trabalho foi o estudo do tempo de acionamento das válvulas solenoides para as soluções de hipoclorito de sódio e rutina, avaliando-se de maneira simultânea o tempo de acionamento das válvulas. Para isso, variou-se o tempo de acionamento das válvulas solenoides entre 1 a 6 s com a vazão fixa de todos os canais, solução transportadora e reagentes, em $2,0 \text{ mL min}^{-1}$. As demais condições utilizadas foram: solução transportadora de carbonato de sódio $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, $66 \mu\text{L}$ de solução de rutina $3,0 \times 10^{-5}$

mol L⁻¹ (V₂ = 2 s), 66 µL de solução de hipoclorito de sódio 1,0 × 10⁻³ mol L⁻¹ (V₃ = 2 s), 66 µL de solução de luminol 5,0 × 10⁻³ mol L⁻¹ (V₄ = 2 s) e percurso analítico de 25 cm. Constatou-se um aumento do sinal analítico com o tempo de acionamento das válvulas solenoide V₂ e V₃ até 4 s. Para tempos superiores, a resposta permaneceu praticamente constante. Sendo assim, selecionou-se o tempo de 4 s de acionamento simultâneo das válvulas solenoides para hipoclorito de sódio e rutina. Também foi realizado o estudo do tempo de acionamento da válvula solenoide da solução de luminol (V₄) entre 1 e 6 s. Observou-se, que há um aumento do sinal analítico até 3 s e, acima desse tempo, a resposta manteve-se constante. Então, o tempo de 3 s foi selecionado para o acionamento da válvula contendo o reagente quimioluminescentes.

O efeito do comprimento do percurso analítico (B) de 25 a 150 cm foi avaliado. Observou-se que há um aumento da variação do sinal analítico até 75 cm. Em comprimentos maiores que este houve um decréscimo da resposta analítica, o que pode estar

relacionado à diluição do hipoclorito de sódio durante o percurso. Sendo assim, o comprimento selecionado foi de 75 cm.

Estudou-se a influência da vazão das soluções simultaneamente na faixa de 1,0 a 3,0 mL min⁻¹. Verificou-se um aumento no sinal analítico com a vazão até 2,0 mL min⁻¹. Acima desta vazão observou-se o aumento na pressão hidrodinâmica do sistema, além de não se obter sinais reprodutíveis. Portanto, a vazão de 2,0 mL min⁻¹ foi selecionada para estudos posteriores.

Após a otimização dos parâmetros instrumentais, construiu-se a curva analítica para rutina no intervalo de concentração de 5,0 × 10⁻⁶ mol L⁻¹ a 1,0 × 10⁻⁴ mol L⁻¹ utilizando o método FIA proposto como observado na Figura 4. A equação da reta é descrita pela equação: ΔI (mV) = 0,968 – 8,32 × 10³ [Rutina] (mol L⁻¹); r = 0,994 (n=3), com um limite de detecção de 9,70 × 10⁻⁷ mol L⁻¹ ((3 X SD)/S), sendo SD o desvio padrão do branco e S a inclinação da curva analítica).

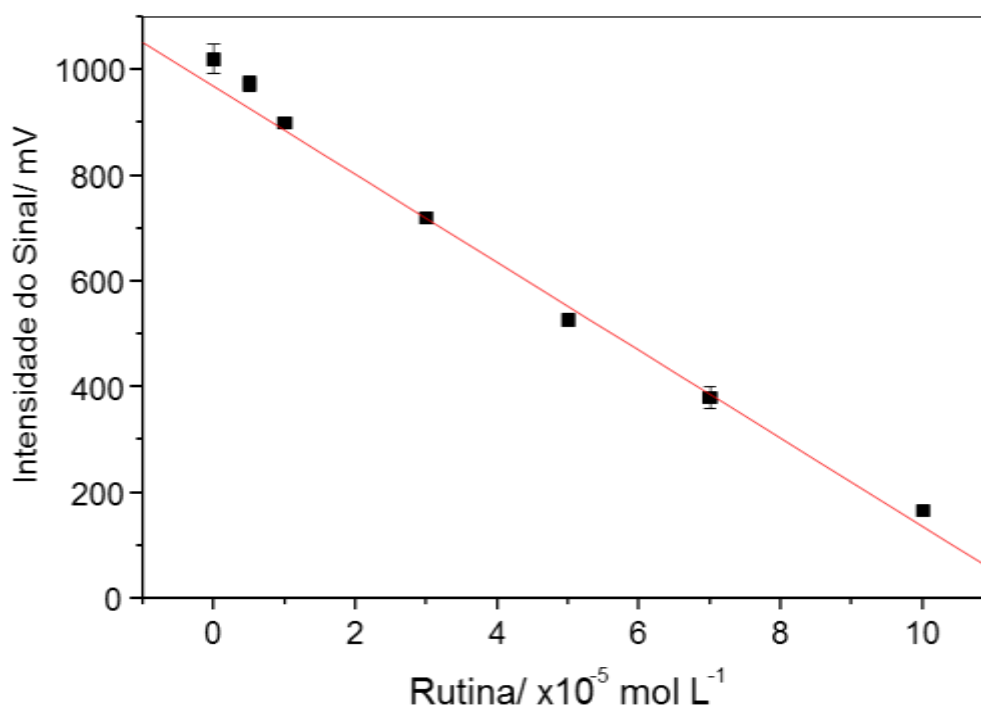


Figura 4. Curva analítica obtida a partir das seguintes adições de rutina: 5,0 × 10⁻⁶; 7,0 × 10⁻⁶; 1,0 × 10⁻⁵; 3,0 × 10⁻⁵; 5,0 × 10⁻⁵; 7,0 × 10⁻⁵ e 1,0 × 10⁻⁴ mol L⁻¹.

Demais condições utilizadas foram: solução transportadora de carbonato de sódio 0,05 mol L⁻¹, hipoclorito de sódio 1,0 × 10⁻³ mol L⁻¹, luminol 5,0 × 10⁻³ mol L⁻¹.

Demais parâmetros: bobina helicoidal de 75 cm e vazão de 2 mL min⁻¹

Obteve-se uma frequência de amostragem de 120 h⁻¹. Para o estudo da repetibilidade (n=10), o sistema proposto apresentou um desvio padrão relativo de 2,8% e 2,6% para as concentrações de rutina de 1,0 × 10⁻⁵ e 7,0 × 10⁻⁵ mol L⁻¹, respectivamente. Realizou-se o estudo de adição e recuperação utilizando soluções padrão em duas diferentes concentrações de rutina (1,0 × 10⁻⁵ e 5,0 × 10⁻⁵ mol L⁻¹), obtendo-se recuperações variando de 97,0 a 104%.

O efeito de potenciais interferentes na determinação de rutina em formulações farmacêuticas foi estudado utilizando-se uma solução de rutina de 3,0 × 10⁻⁵ mol L⁻¹. Excipientes e estabilizantes como

amido, sacarose, cafeína e óxido de ferro foram testados um a um nas concentrações declaradas nos produtos comerciais. Não se observou interferência significativa sobre o sinal analítico nos valores estudados para essas substâncias.

Realizou-se a determinação de rutina em formulações farmacêuticas comerciais pelo método quimioluminescente proposto e por um método espectrofotométrico comparativo²⁹. Os resultados obtidos estão em boa concordância dentro de um intervalo de confiança de 95%, empregando-se o teste-t pareado como observado na Tabela 1.

Tabela 1. Determinação de rutina em formulações farmacêuticas pelo procedimento proposto e pelo o método comparativo²⁹

Amostras	Rutina (mg g ⁻¹)			Er(%)		Teste t*	Test f
	Valor rotulado	Comparativo	Proposto	E ₁	E ₂		
A	300	295±2	298±3	-0,6	1,0		
B	300	297±3	291±4	-3,0	-2,0	0,225	0,75
C	300	299±2	300±2	0	0,3		

n = 3, nível de confiança de 95%

E₁= procedimento proposto vs. valor rotulado

E₂= procedimento proposto vs. procedimento comparativo

*t_{crit}=2,92

*f_{crit}=19

Ademais, o procedimento proposto apresentou faixa linear e limite de detecção semelhante a alguns trabalhos descritos na literatura para a determinação de rutina como observado na Tabela 2.

Tabela 2. Procedimentos analíticos propostos para a determinação de rutina

Técnica	Faixa linear (mol L ⁻¹)	Limite de detecção (mol L ⁻¹)	Ref
Voltametria	$1,0 \times 10^{-7} - 2,0 \times 10^{-6}$	$2,3 \times 10^{-8}$	[30]
Fluorescência	$5,0 \times 10^{-6} - 4,0 \times 10^{-5}$	$1,2 \times 10^{-6}$	[31]
Cromatografia	$8,2 \times 10^{-5} - 6,6 \times 10^{-4}$	$4,2 \times 10^{-5}$	[32]
Espectrofotometria	$6,6 \times 10^{-6} - 3,9 \times 10^{-5}$	$1,2 \times 10^{-6}$	[33]
Quimiluminescência	$5,0 \times 10^{-6}$ a $1,0 \times 10^{-4}$	$9,7 \times 10^{-7}$	Este trabalho

CONCLUSÕES

Neste trabalho apresentamos um método de análise por injeção em fluxo envolvendo multicomutação e quimiluminescência para a determinação de rutina em formulações farmacêuticas. A adição de rutina consumiu parcialmente o hipoclorito (que reage com o luminol), diminuindo assim a intensidade luminosa proporcionalmente à concentração de rutina na amostra. O procedimento proposto foi aplicado com sucesso na determinação de rutina em formulações farmacêuticas. Os resultados obtidos estão em boa concordância dentro de um intervalo de confiança de 95%, empregando-se o

teste-t pareado. O método é simples, de baixo custo com alta frequência de amostragem e acurácia e pode ser utilizado para a determinação deste fármaco em laboratórios de análises de rotina e de controle de qualidade. Ademais, o procedimento proposto pode ser utilizado em aulas de química analítica quantitativa e química analítica instrumental para ampliar os conhecimentos de alunos de graduação.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, a CAPES e à FAPESP (2015/19099-2) pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

- [1] P. H. Marco, R. J. Poppi, I. S. Scarminio, Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais, *Quim. Nova*, **2008**, *31*, 1218-1223.
- [2] H. P. Hendrickson, A. D. Kaufman, C. E. Lunte, Electrochemistry of catechol-containing flavonoids, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **1994**, *12*, 325-334.
- [3] G. Magarelli, L. H. C. Lima, J. G. Silva, J. R. Souza, C. S. P. de Castro, Rutin and total isoflavone determination in soybean at different growth stages by using voltammetric methods, *Microchem. J.*, **2014**, *117*, 149-155.
- [4] H. G. Rodrigues, Y. S. A. Diniz, L. A. Faine, J. A. Almeida, A. A. H. Fernandes, E. L. B. Novelli, Suplementação nutricional com antioxidantes naturais: efeito da rutina na concentração de colesterol-HDL, *Revista de Nutrição*, **2003**, *16*, 315-320.
- [5] S. Yang, G. Li, J. Zhao, H. Zhu, L. Qu, Electrochemical preparation of Ag nanoparticles/poly(methylene blue) functionalized graphene nanocomposite film modified electrode for sensitive determination of rutin, *J. Electroanal. Chem.*, **2014**, *717*, 225-230.
- [6] D. Miao, J. Li, R. Yang, J. Qu, L. Qu, P. B. Harrington, Supersensitive electrochemical sensor for the fast determination of rutin in pharmaceuticals and biological samples based on poly(diallyldimethylammonium chloride)-functionalized graphene, *J. Electroanal. Chem.*, **2014**, *732*, 17-24.
- [7] W. Sun, X. Wang, H. Zhu, X. Sun, F. Shi, G. Li, Z. Sun, Graphene-MnO₂ nanocomposite modified carbon ionic liquid electrode for the sensitive electrochemical detection of rutin, *Sens. Act. B*, **2013**, *178*, 443-449.
- [8] N. K. Glavac, K. Stojilkovski, S. Kreft, C. H. Park, I. Kreft, Determination of fagopyrins, rutin, and quercetin in Tartary buckwheat products, *LWT-Food Sci. Technol.*, **2017**, *79*, 423-427.
- [9] R. M. Xing, H. T. Yang, S. N. Li, J. H. Yang, X. Y. Zhao, Q. L. Wang, S. H. Liu, X. H. Liu, A sensitive and reliable rutin electrochemical sensor based on palladium phthalocyanine-MWCNTs-Nafion nanocomposite, *J. Solid State Electrochem.*, **2017**, *21*, 1219-1228.
- [10] D. Lupascu, C. Tuchilus, F. G. Lupascu, S. Constantin, M. Apotrosoaei, I. M. Vasincu, A. T. Iacob, L. Profire, Rutin semisynthetic derivatives with antifungal properties, *Farmacia*, **2017**, *65*, 184-188.
- [11] L. H. Marcolino-Junior, V. G. Bonifácio, F. C. Vicentini, B. C. Janegitz, O. Fatibello-Filho, Amperometric Determination of Captopril Using a Carbon Paste Electrode in Flow Analysis, *Can. J. Anal. Sci. Spectr.*, **2009**, *54*, 45-51.
- [12] V. G. Bonifacio, O. Fatibello-Filho, L. H. Marcolino-Junior, Flow-injection spectrophotometric determination of dipyrone in pharmaceutical formulations using a solid-phase reactor with copper(II) phosphate, *Central Eur. J. Chem.*, **2013**, *11*, 1830-1836.
- [13] F. C. Vicentini, W. T. Suarez, E. T. G. Cavalheiro, O. Fatibello-Filho, Flow-injection spectrophotometric determination of captopril in pharmaceutical formulations using a new solid-phase reactor containing AgSCN immobilized in a polyurethane resin, *Braz. J. Pharm. Sci.*, **2012**, *48*, 325-333.

- [14] G. G. Oliveira, B. C. Janegitz, M. B. Batistao, F. H. Salami, O. Fatibello-Filho, O. D. Leite, Determinação de paracetamol pela inibição da reação quimiluminescente do luminol-hipoclorito de sódio em um sistema de análise em fluxo empregando o conceito de multicomutação, *Quim. Nova*, **2009**, *32*, 1755-1759.
- [15] W. T. Suarez, O. D. Pessoa-Neto, B. C. Janegitz, H. J. Vieira, R. C. Faria, O. Fatibello-Filho, Flow Injection Spectrophotometric Determination of N-Acetylcysteine and Captopril Employing Prussian Blue Generation Reaction, *Anal. Lett.*, **2011**, *44*, 2394-2405.
- [16] A. F. Lavorante, M. A. Feres, B. F. Reis, Multi-commutation in Flow Analysis: A Versatile Tool for the Development of the Automatic Analytical Procedure Focused on the Reduction of Reagent Consumption, *Spectr. Lett.*, **2006**, *39*, 631-650.
- [17] E. C. Ferreira, A. V. Rossi, A Quimiluminescência como Ferramenta Analítica: do Mecanismo a Aplicações da Reação do Luminol em Métodos Cinéticos de Análise, *Quim. Nova*, **2002**, *25*, 1003-1011.
- [18] J. Q. Chen, J. Shu, J. Chen, Z. R. Cao, A. Xiao, Z. Y. Yan, Highly luminescent S,N co-doped carbon quantum dots-sensitized chemiluminescence on luminol-H₂O₂ system for the determination of ranitidine, *Luminescence*, **2017**, *32*, 277-284.
- [19] W. Y. Gao, C. Wang, K. Muzyka, S. A. Kitte, J. P. Li, W. Zhang, G. B. Xu, Artemisinin-Luminol Chemiluminescence for Forensic Bloodstain Detection Using a Smart Phone as a Detector, *Anal. Chem.*, **2017**, *89*, 6161-6165.
- [20] Y. Y. Sheng, H. L. Yang, Y. Wang, L. Han, Y. J. Zhao, A. P. Fan, Silver nanoclusters-catalyzed luminol chemiluminescence for hydrogen peroxide and uric acid detection, *Talanta*, **2017**, *166*, 268-274.
- [21] M. Zhou, A. L. Wang, C. Li, X.W. Luo, Y. J. Ma, Flow-based determination of methionine in pharmaceutical formulations exploiting TGA-capped CdTe quantum dots for enhancing the luminol-KIO₄ chemiluminescence, *J. Lumin.*, **2017**, *183*, 206-211.
- [22] H. Yao, X. M. Huang, P. Y. Shi, Z. Lin, M. L. Zhu, A. L. Liu, X. H. Lin, Y. H. Tang, DPPH-luminol chemiluminescence system and its application in the determination of scutellarin in pharmaceutical injections and rat plasma with flow injection analysis, *Luminescence*, **2017**, *32*, 588-595.
- [23] M. Amjadi, J. L. Manzoori, T. Hallaj, T. Shahbazsaghir, Application of the chemiluminescence system composed of silicon-doped carbon dots, iron(II) and K₂S₂O₈ to the determination of norfloxacin, *Microchim. Acta*, **2017**, *184*, 1587-1593.
- [24] S. T. Li, T. Z. Yang, J. J. Zhao, Y. Huang, S. L. Zhao, Chemiluminescence Noncompetitive Immunoassay Based on Microchip Electrophoresis for the Determination of β -Subunit of Human Chorionic Gonadotropin, *J. Chromatogr. B.*, **2017**, *1053*, 42-47.
- [25] Z. Saeedi, A. Lotfi, J. Hassanzadeh, N. Bagheri, Highly sensitive determination of copper (II) ions using fluorescence and chemiluminescence emissions of modified CdS quantum dots after its preconcentration by dispersive liquid-liquid microextraction, *Can. J. Chem.*, **2017**, *95*, 704-709.
- [26] D. Q. Yang, Y. Y. He, Y. Y. Sui, F. N. Chen, Determination of catechol in water based on gold nanoclusters-catalyzed chemiluminescence, *J. Lumin.*, **2017**, *187*, 186-192.

- [27] O. D. Leite, O. Fatibello, H. J. Vieira, F. R. P. Rocha, N. S. Miranda Cury, A Multicommutated Flow-based System for Hydrogen Peroxide Determination by Chemiluminescence Detection Using a Photodiode, *Anal. Lett.*, **2007**, *40*, 3148-3157.
- [28] O. D. Leite, O. Fatibello, F. R. P. Rocha, Um Experimento de Análise em Fluxo Envolvendo Reações Enzimáticas e Quimiluminescência, *Quim. Nova*, **2004**, *27*, 337-341.
- [29] Rutin in drugs, Official Methods of Analysis of AOAC Internacional, Arlington:AOAC Internacional, 1995, Vol. 1
- [30] Y. Lei, D. Du, L. Tang, C. Tan, K. Chen, G.-J. Zhang, Determination of Rutin by a Graphene-Modified Glassy Carbon Electrode, *Anal. Lett.*, **2014**, *48*, 894-906.
- [31] J. M. Carvalho, K. C. Leandro, A. R. da Silva, R. Q. Aucélio, Selective Determination of Rutin by Fluorescence Attenuation of the CdS-2-mercaptopropionic Acid Nanocrystal Probe, *Anal. Lett.*, **2012**, *46*, 207-224.
- [32] K. Ashok Kumar, S. Ramachandra Shetty, L. Narsu, HPTLC Method Development and Validation for Determination of Rutin in Flavanoidal Fraction of Hibiscus micranthus Linn, *E-Journal Chem.*, **2011**, *8*, 1444-1450.
- [33] H. Xu, Y. Li, H.-W. Tang, C.-M. Liu, Q.-S. Wu, Determination of Rutin with UV-Vis Spectrophotometric and Laser-Induced Fluorimetric Detections Using a Non-Scanning Spectrometer, *Anal. Lett.*, **2010**, *43*, 893-904.