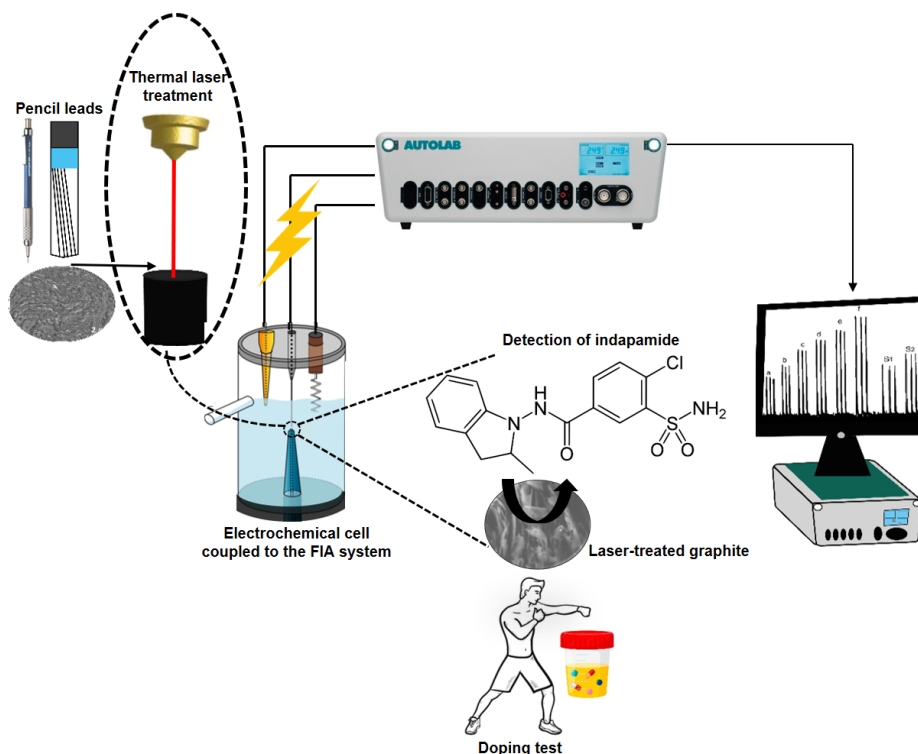


Graphical Abstract



ELETRODOS DE GRAFITE TRATADO A LASER PARA QUANTIFICAÇÃO AMPEROMÉTRICA DE INDAPAMIDA

Thawan G. Oliveira¹, Irlan S. Lima¹, Wilson A. Ameku¹, Josué M. Gonçalves¹, Henrique E. Toma¹ and Lúcio Angnes^{1,*}.

¹ – Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP

Thawan.oliveira@usp.br

Resumo: A gravação a laser é uma técnica conveniente, rápida, de uma etapa e ecologicamente correta, usada para produzir superfícies mais condutoras por pirólise local. O tratamento térmico do laser também pode remover materiais não condutores das superfícies dos eletrodos e melhorar o desempenho eletroquímico. A melhoria foi avaliada por ferramentas eletroquímicas como voltamogramas cíclicos e espectroscopia de impedância eletroquímica usando $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ e dopamina como sondas redox. Os resultados eletroquímicos observados mostraram que uma superfície tratada apresentou melhora na transferência de elétrons e menor resistência à transferência de carga. Otimizamos os parâmetros da máquina a laser para alcançar o desempenho eletroquímico aprimorado da mina de grafite, como tipo de grafite e potência do laser, taxa de varredura e distância de saída. O material resultante foi adequadamente caracterizado por espectroscopia Raman e microscopia eletrônica de varredura (MEV), onde foi observada uma superfície irregular composta por partículas cristalinas de grafite. Além disso, como prova de conceito, foi aplicado para detectar indapamida (IND) em urina sintética por análise de injeção em fluxo (FIA), uma droga diurética frequentemente usada por atletas para alterar a composição da urina e ocultar o consumo proibido de substâncias. em testes de doping.

Palavras-chave: laser; sensor eletroquímico; diurético; análise por injeção em fluxo (FIA).

Laser-scribed pencil lead electrodes for amperometric quantification of indapamide

Abstract: Laser engraving is a convenient, fast, one-step, and environmentally-friendly technique used to produce more conductive surfaces by local pyrolysis. The laser's thermal treatment can also remove non-conductive materials from the electrode surfaces and improve electrochemical performance. The improvement was assessed by electrochemical tools such as cyclic voltammograms and electrochemical impedance spectroscopy using $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ and dopamine as redox probes. The electrochemical results observed showed that a treated surface showed an improvement in electron transfer and less resistance to charge transfer. We optimized laser machine parameters to reach the enhanced electrochemical performance of the graphite mine, such as graphite grade and laser power, scan rate, and output distance. The resultant material was adequately characterized by Raman spectroscopy and scanning electron microscopy (SEM), where an irregular surface composed of crystalline graphite particles was noticed. Furthermore, as a proof-of-concept, it was applied to detect indapamide (IND) in synthetic urine by flow injection analysis (FIA), a diuretic drug often used by athletes to alter urine composition to hide forbidden substance consumption in doping tests.

Keywords: *pencil lead; laser; electrochemical sensor; diuretic; flow injection analysis (FIA).*

Introdução

A técnica de gravação a laser é uma maneira rápida, prática e ecológica de padronizar trilhas condutoras de grafeno tridimensionais em materiais com teor de carbono por pirólise local direta [1]. Permite a produção em massa e a miniaturização de dispositivos eletroquímicos sem a necessidade de reagentes ou de um ambiente controlado. Além do tratamento superficial de materiais carbonáceos, a gravação a laser também tem sido utilizada para produzir superfícies de carbono em substratos poliméricos como poliimida [2], polieterimida [3] e papelão [4], gerando sensores eletroquímicos para as mais diversas aplicações [1].

O processo de gravação a laser melhora o desempenho eletroquímico dos eletrodos. Entre os fatores que contribuem para essa melhoria podem ser listados o aumento da cristalinidade e da área superficial do material, a remoção de materiais não condutores e até mesmo a geração de grafeno [5]. No caso de eletrodos construídos com grafite, a remoção de detritos torna-se um dos fatores mais importantes [6]. Além disso, foi demonstrado que a associação de gravação a laser e tratamento eletroquímico foi eficaz na otimização da estrutura de grafite do eletrodo serigrafado comercial, resultando em melhor desempenho [7].

Na literatura, existem muitos estudos utilizando lápis de grafite para aplicações de eletroanálise. No entanto, até onde sabemos, as minas de grafite usadas para carregar lapiseiras ainda não foram submetidas a tratamento a laser para melhorar o desempenho eletroquímico. As minas de grafite são materiais acessíveis e econômicos encontrados em vários graus (de 10B a 10H) [8]. As minas de grafite são constituídas por uma mistura de ligantes de argila/cera e pó de grafite. Quanto mais argila e cera tiverem, mais duros (H) e mais claros serão os traços deixados no papel; por outro lado, quanto mais grafite em sua composição, mais macias ou mais pretas (B) serão as minas de grafite [8]. Sua estrutura é composta por ligações de carbono pendentes e átomos de carbono hibridizados com sp^2 no plano basal e nas bordas, e a presença de grupos de oxigênio, como carboxila e carbonila, proporciona desempenho eletroquímico diferenciado [9]. Devido às suas propriedades, é amplamente aplicado em diversas áreas, como a biomedicina, para medir a concentração de anticorpos anti-toxina diftérica em amostras de soro para avaliar o grau de imunização [9].

Neste estudo, os cabos de grafite foram tratados com laser para melhorar suas características eletroquímicas. Após estabelecidas as melhores condições, as grafites tratadas foram aplicadas à quantificação de indapamida em baixas concentrações. Esse diurético de intensa ação anti-hipertensiva [10] está proibido no esporte desde 1988, pois é utilizado para reduzir o peso corporal para qualificar o competidor em uma categoria de menor peso, bem como para manipular a urina a fim de mascarar resultados positivos nos testes antidoping [11]. Portanto, sete graus diferentes de eletrodos de grafite foram testados usando diferentes parâmetros da laser de CO₂, como taxa de varredura, potência do laser e distância focal da fonte do laser, para encontrar o melhor eletrodo de grafite e condições ideais de tratamento. Experimentos eletroquímicos foram explorados para selecionar o melhor eletrodo. Caracterizações adicionais das superfícies dos eletrodos gravados a laser foram feitas por espectroscopia Raman e microscopia eletrônica de varredura (MEV). O eletrodo de grafite otimizado foi aplicado para a análise de indapamida em amostras de urina sintética utilizando amperometria e análise de injeção em fluxo (FIA).

Experimental

Tratamento a laser dos eletrodos de grafite

Após a série de experimentos, as minas de grafite H apresentaram o melhor desempenho, e cerca de 70% da extensão de cada mina era envernizada. A extremidade revestida foi lixada para retirada do revestimento e em seguida polida em papel de escritório até obter uma superfície lisa e brilhante. Na sequência, as minas de lápis foram fixadas (individualmente ou em grupos) na massa de modelar em uma posição que formasse um ângulo de 90° com a base da máquina a laser. Posteriormente, a saída do laser foi posicionada a 10 mm da superfície polida do grafite do lápis. O laser escaneou uma área de 3 × 3 mm usando uma potência e taxa de varredura de 50% e 1 mms⁻¹. O tratamento durou aproximadamente 10 s quando unidades individuais foram tratadas. Em experimentos envolvendo grupos de minas, a área foi aumentada para 5 x 5 mm. Durante o uso como eletrodo o contato elétrico foi estabelecido no lado oposto, na região não revestida.

Caracterização eletroquímica

Voltamogramas cíclicos (CVs) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) foram registrados usando o potenciostato PGSTAT 128N com o módulo FRA2. Para avaliar o desempenho dos eletrodos gravados a laser, foram realizados experimentos utilizando um eletrodo de carbono vítreo (GCE), um grafite não tratado (NTGr) e o grafite tratado a laser (LTGr) como eletrodo de trabalho. Ag/AgCl (3,0 mol L⁻¹ KCl) e Pt como eletrodo de referência e auxiliar, respectivamente, completaram o arranjo. Os (três) diferentes eletrodos de trabalho foram avaliados por experimentos de voltametria cíclica utilizando solução de 1 mmol L⁻¹ de [Fe(CN)₆]^{3-/4-} preparada em 0,10 mol L⁻¹ de KCl e também utilizando 1,0 mmol L⁻¹ de dopamina em tampão acetato 0,10 mol L⁻¹, utilizando uma taxa de varredura de 50 mV s⁻¹. A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) também foi explorada para comparar os eletrodos de grafite não tratados e tratados. Os experimentos foram realizados no potencial de circuito aberto (usando o mesmo Ag/AgCl (3,0 mol L⁻¹ KCl) e eletrodo de Pt empregado em CVs) em uma solução contendo 4,0 mmol L⁻¹ [Fe(CN)₆]^{3-/4-} preparado em solução de KCl 0,10 mol L⁻¹ aplicando potencial alternado com amplitude de 10 mV operando na faixa de frequência de 0,10 Hz a 100 kHz.

Resultados e Discussão

Comportamento eletroquímico

O tratamento a laser melhorou o desempenho eletroquímico do grafite. Para demonstrar esse aspecto, duas espécies bem conhecidas, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ e dopamina foram selecionadas para testes comparativos. A separação pico a pico (ΔE_p) da sonda redox da esfera interna $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ diminuiu de 467 mV para 112 mV (Figura 1A). No caso da dopamina, o ΔE_p diminuiu de 249 mV para 138 mV (Figura 1B), indicando que a transferência de elétrons entre o eletrodo e a molécula orgânica tornou-se rápida [12].

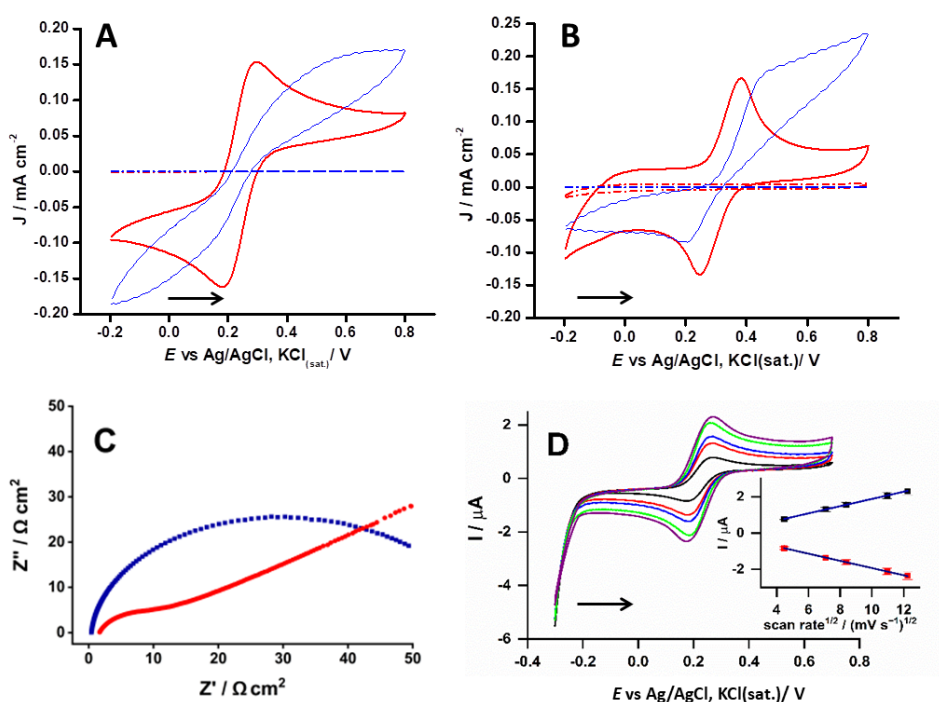


Figura 1– Voltamogramas cíclicos (CVs) registrados com uma taxa de varredura de 50 mV s⁻¹ usando grafite tipo H não tratado - NTGr (azul) e tratado - LTGr (vermelho). (A) Solução aquosa de KCl 0,10 mol L⁻¹ contendo 1,0 mmol L⁻¹ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$; (B) Solução tampão acetato 0,10 mol L⁻¹ com dopamina 1,0 mmol L⁻¹. (C) A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) foi realizada no potencial de circuito aberto usando um eletrodo de referência Ag/AgCl (3,0 mol L⁻¹ KCl) em solução de 0,10 mol L⁻¹ KCl contendo 4,0 mmol L⁻¹ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$; (D) Estudo em diferentes taxas de varredura em 1,0 mmol L⁻¹ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$.

Caracterização Morfológica

O efeito do tratamento a laser na estrutura morfológica do eletrodo LTGr tipo H foi analisado usando FE-SEM [13]. A superfície do NTGr polida em papel sulfite apresenta uma superfície relativamente áspera e escamosa (Coluna 2A). Após o tratamento com laser (coluna 2B), a superfície do eletrodo apresenta uma morfologia mais complexa (como solos erodidos) com um aumento visível na área de superfície com plaquetas expostas à grafite mais visíveis (tactóides)[14]. Na verdade, o tratamento a

laser introduziu intensas alterações morfológicas que suportam uma resposta eletroquímica melhorada [15].

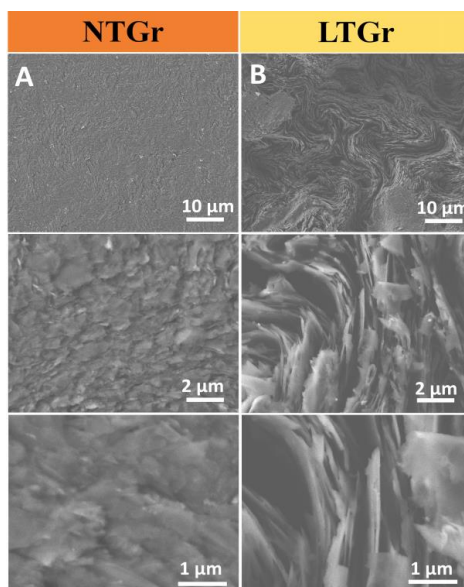


Figura 2— Imagens FE-SEM de grafite (Coluna A) não tratada e (Coluna B) tratada com laser de duas regiões diferentes e em ampliação crescente (as ampliações das imagens aumentam de cima para baixo: $\times 1000$, $\times 10\,000$ e $\times 25\,000$).

Deteccão amperométrica de indapamida por FIA

O sistema FIA é composto por uma válvula de injeção em acrílico, com alça de amostragem que delimita o volume injetado. A parte de propulsão do fluido é governada pela gravidade, que possui um reservatório a uma determinada altura. A célula de fluxo eletroquímica foi fabricada em nosso próprio laboratório. Tubo de polietileno com diâmetro interno de 1,5 mm foi utilizado para o sistema de fluxo de linha única. A célula de fluxo eletroquímico foi construída com ponta de micropipeta de polipropileno (com volume interno de $\sim 1000 \mu\text{L}$) e apresenta configuração de jato de parede, conforme mostrado na **Figura 3**.

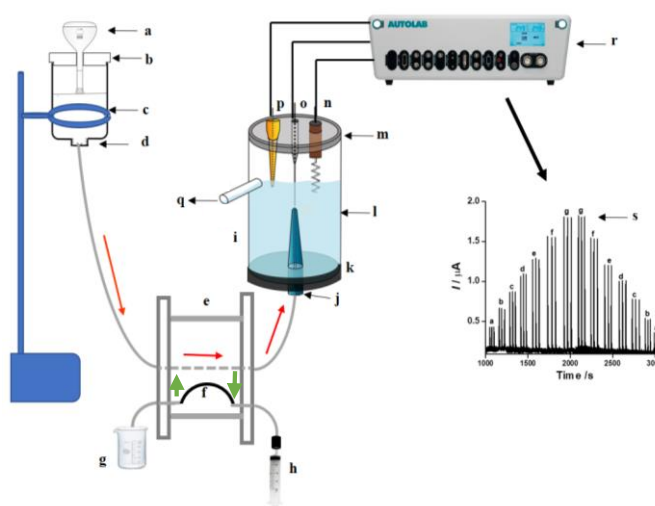


Figura 3 – Diagrama esquemático mostrando a configuração experimental para estudos baseados em FIA: A, balão volumétrico de 500 mL; B, suporte PLA (ácido polilático) impresso em impressora 3D; C, frasco de polietileno (1 L); D, tubo de polietileno adaptado à tampa do frasco para condução do eletrólito; E, injetor de comutação; F, circuito amostral; G, amostra; H, siringe; I, célula eletroquímica; J, pipeta (volume interno 1 mL) – entrada de fluxo; k, suporte para fixação da pipeta; L, tubo cônico de acrílico; M, tampa da célula com três furos centrais; N, contraeletrodo; O, eletrodo de trabalho (LTGr); P, eletrodo de referência; R, potenciostato; S, amperograma.

Para aplicação na quantificação de indapamida (IND) foram avaliados o comportamento eletroquímico do fármaco por voltametria cíclica (CV), sendo testada a repetibilidade do sinal (corrente de pico) realizando ciclagens na mesma faixa de potencial (**Figura 4B**). No segundo ciclo, observou-se um intenso bloqueio da superfície do eletrodo, possivelmente produto da adsorção do analito/produtos da reação na superfície do eletrodo. No terceiro ciclo o efeito de "envenenamento" da sua superfície se intensificou.

Com estes experimentos ficou evidente que o bloqueio ocorre devido à adsorção dos produtos gerados na oxidação. Passou-se então a buscar uma condição favorável de trabalho. Após diversas tentativas, descobriu-se que restringindo a janela de potencial entre $E_i = -0,20$ V a $E_f = 0,23$ V, (onde apenas o primeiro processo ocorre), o envenenamento da superfície do eletrodo não ocorre (**Figura 4C**). Então adota-se 0,2 V para quantificação de IND por FIA.

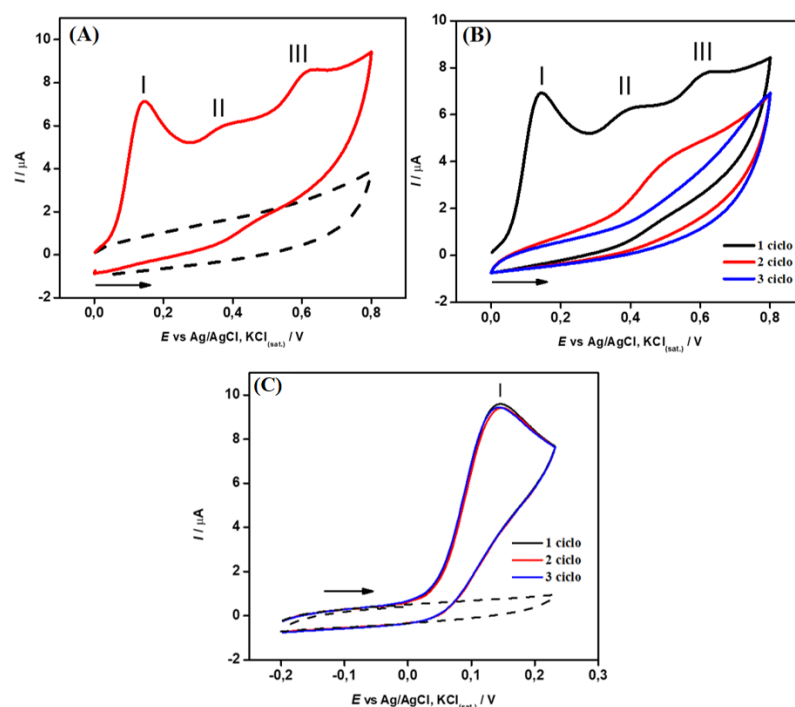


Figura 4 - Voltamogramas cíclicos de: tampão fosfato, (pH = 12), $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (tracejado); solução de IND $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão fosfato, (pH 12), $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (vermelho). (B) Três ciclos em sequência na mesma solução contendo $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de IND em tampão fosfato, pH = 12, $0,10 \text{ mol L}^{-1}$. (C) Restrito na região do

processo I, três ciclos repetidos na presença de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de IND. Condições experimentais: ET = GCE, EA = platina, ER = Ag/AgCl/KCl_(sat.).

A **Figura 5** avalia se houve efeito memória durante as medições amperométricas, sendo realizada uma curva com concentrações crescentes e decrescentes de IND variando de 10 a $70 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ (**Figura 5A**). Uma boa linearidade das respostas nesta faixa de concentração fica clara na **Figura 5B**. A regressão linear da série crescente resultou em ($I_p = 0,023 [\text{IND}] + 0,182$, $R^2 = 0,998$) e a série decrescente foi calculada como ($I_p = 0,025 [\text{IND}] + 0,037$, $R^2 = 0,991$). Para avaliar a repetibilidade na análise, foi realizada uma série de 10 injeções de indapamida $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, fixando o potencial em $0,2 \text{ V}$ (**Figura 5C**). O desvio padrão relativo foi calculado em $0,70\%$, atestando a boa precisão do método FIA-amperométrico. Para demonstrar a viabilidade da análise em amostras reais, duas amostras enriquecidas de urina sintética foram preparadas e testadas (**Figura 5D**).

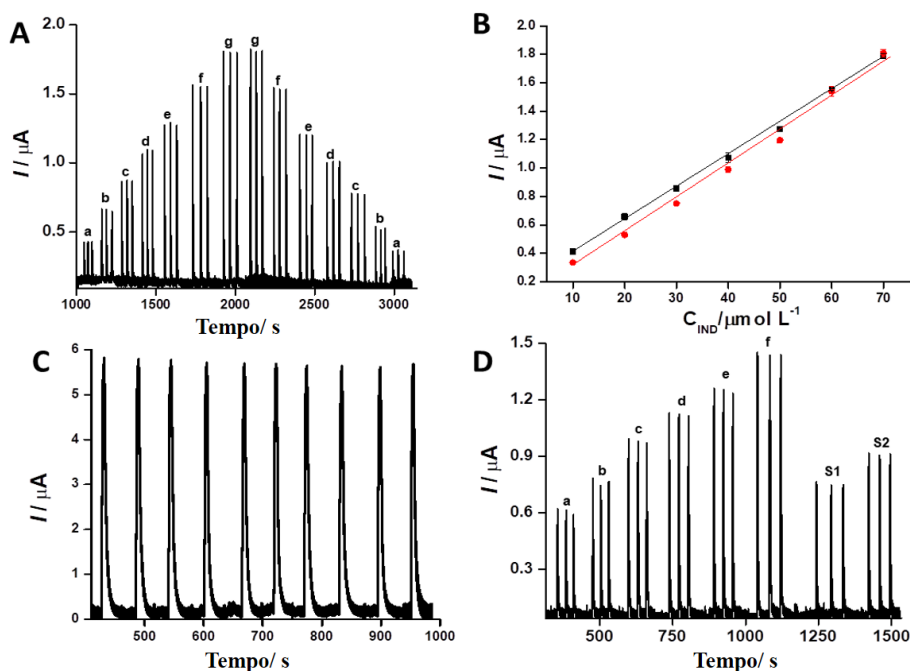


Figura 4– (A) Curvas analíticas com concentrações crescentes e decrescentes de IND variando de (a) 10, (b) 20, (c) 30, (d) 40, (e) 50, (f) 60, (g) $70 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. (B) Ajustes lineares nas curvas de calibração com aumento e diminuição da concentração de IND. (C) Estudos de repetibilidade ($n=10$) de 1 mmol L^{-1} IND. (D) Amperograma para determinação de IND pelo sistema FIA em urina sintética enriquecida. Curva analítica (a) 20, (b) 30, (c) 40, (d) 50, (e) 60, (f) $70 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, (S1) amostra 1 e (S2) amostra 2. Condições experimentais : tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH}=12$), loop de amostragem de $150 \text{ } \mu\text{L}$, vazão $1,6 \text{ mL/min}$ e potencial $+ 0,20 \text{ V}$ vs Ag/AgCl ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$ KCl).

O procedimento para quantificação de indapamida foi realizado em amostras de “urina enriquecida” (30 e $40 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) preparadas. A regressão linear dos sinais gerados pelas seis primeiras soluções (20 a $70 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) seguiu o ajuste ($I_p = 0,016 [\text{IND}] + 0,278$, $R^2 = 0,996$). As duas amostras de urina sintética enriquecida com IND foram injetadas, na concentração de $30 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ (amostra 1) e $40 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ (amostra 2) conforme ilustrado na (Figura 4D). A recuperação foi calculada em $94,5\%$ e $94,7\%$. O limite de detecção de $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de indapamida foi determinado experimentalmente

(O L). Estes resultados indicam que o método apresenta um bom desempenho analítico para avaliação de IND em amostras de interesse clínico e de doping.

Conclusões

O tratamento a laser demonstrou-se uma técnica eficaz, rápida e conveniente para tratar minas de grafite sem a necessidade de produtos químicos. Poderia eliminar materiais não condutores e pequenas partículas de grafite menos cristalinas para melhorar a transferência de elétrons, que foi avaliada por CVs usando dopamina e $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ como sondas redox e EIS usando $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Os resultados eletroquímicos mostraram diminuição nas diferenças pico a pico do CV e um incremento na cinética de transferência de carga. O tratamento produziu uma superfície mais rugosa composta por partículas cristalinas que foram adequadamente caracterizadas por espectros Raman e MEV. Usando a técnica FIA, a mina de grafite foi aplicada com sucesso para detectar a indapamida como prova de conceito em urina sintética. Portanto, o tratamento a laser mostrou-se um procedimento verde e conveniente para melhorar o desempenho eletroquímico dos materiais eletródicos, comprovando seu potencial para fabricar eletrodos de baixo custo e alto desempenho de forma massiva.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (números de bolsas: 2019/22126-2, 2018/16896-7, 2017/13137-5 e 2014/50867-3) e Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq (processos 311847-2018-8, 465389/2014-7, 305247/2022-0 e 131305/2021-2). Os autores agradecem também ao Dr. Fabio Rodrigues e ao MSc. Evandro Pereira da Silva pelas medidas de espectroscopia Raman.

Referências

1. Ameku, W.A.; Negahdary, M.; Lima, I.S.; Santos, B.G.; Oliveira, T.G.; Paixão, T.R.L.C.; Angnes, L. Laser-Scribed Graphene-Based Electrochemical Sensors: A Review. *Chemosensors* **2022**, *10*, 505, doi:10.3390/chemosensors10120505.
2. Mendes, L.F.; Pradela-Filho, L.A.; Paixão, T.R.L.C. Polyimide Adhesive Tapes as a Versatile and Disposable Substrate to Produce CO₂ Laser-Induced Carbon Sensors for Batch and Microfluidic Analysis. *Microchemical Journal* **2022**, *182*, 107893, doi:10.1016/j.microc.2022.107893.
3. Kawai, M.S.; de Lima, L.F.; de Araujo, W.R. A Disposable and Low-Cost Laser-Scribed Graphene Electrochemical Sensor for Simultaneous Detection of Hydroquinone, Paracetamol and Methylparaben. *Materials Letters* **2023**, *330*, 133211, doi:10.1016/j.matlet.2022.133211.
4. de Araujo, W.R.; Frasson, C.M.R.; Ameku, W.A.; Silva, J.R.; Angnes, L.; Paixão, T.R.L.C. Single-Step Reagentless Laser Scribing Fabrication of Electrochemical Paper-Based Analytical Devices. *Angewandte Chemie* **2017**, *129*, 15309–15313, doi:10.1002/ange.201708527.
5. Rocha, D.P.; Ataíde, V.N.; de Siervo, A.; Gonçalves, J.M.; Muñoz, R.A.A.; Paixão, T.R.L.C.; Angnes, L. Reagentless and Sub-Minute Laser-Scribing Treatment to Produce Enhanced Disposable Electrochemical Sensors via Additive Manufacture. *Chemical Engineering Journal* **2021**, *425*, 130594, doi:10.1016/j.cej.2021.130594.

6. N. Ataíde, V.; A. Ameku, W.; P. Bacil, R.; Angnes, L.; Araujo, W.R. de; C. Paixão, T.R.L. Enhanced Performance of Pencil-Drawn Paper-Based Electrodes by Laser-Scribing Treatment. *RSC Advances* **2021**, *11*, 1644–1653, doi:10.1039/D0RA08874A.
7. Alba, A.F.; Totoricaguena-Gorriño, J.; Sánchez-Ilárduya, M.B.; Ruiz-Rubio, L.; Vilas-Vilela, J.L.; Lanceros-Méndez, S.; del Campo, F.J. Laser-Activated Screen-Printed Carbon Electrodes for Enhanced Dopamine Determination in the Presence of Ascorbic and Uric Acid. *Electrochimica Acta* **2021**, *399*, 139374, doi:10.1016/j.electacta.2021.139374.
8. Kaneko, S.; Shimizu, Y.; Rachi, T.; Kato, C.; Tanaka, S.; Naganuma, Y.; Katakura, T.; Satoh, K.; Ushiyama, M.; Konuma, S.; et al. Multigraphene Growth on Lead-Pencil Drawn Silver Halide Print Paper Irradiated by Scanning Femtosecond Laser. *Jpn. J. Appl. Phys.* **2015**, *55*, 01AE24, doi:10.7567/JJAP.55.01AE24.
9. Ameku, W.A.; Ataíde, V.N.; Costa, E.T.; Gomes, L.R.; Napoleão-Pêgo, P.; William Provance, D.; Paixão, T.R.L.C.; Salles, M.O.; De-Simone, S.G. A Pencil-Lead Immunosensor for the Rapid Electrochemical Measurement of Anti-Diphtheria Toxin Antibodies. *Biosensors* **2021**, *11*, 489, doi:10.3390/bios11120489.
10. Chaffman, M.; Heel, R.C.; Brogden, R.N.; Speight, T.M.; Avery, G.S. Indapamide. A Review of Its Pharmacodynamic Properties and Therapeutic Efficacy in Hypertension. *Drugs* **1984**, *28*, 189–235, doi:10.2165/00003495-198428030-00001.
11. Cadwallader, A.B.; De La Torre, X.; Tieri, A.; Botrè, F. The Abuse of Diuretics as Performance-Enhancing Drugs and Masking Agents in Sport Doping: Pharmacology, Toxicology and Analysis. *British Journal of Pharmacology* **2010**, *161*, 1–16, doi:10.1111/j.1476-5381.2010.00789.x.
12. Shahzadi, M.; Nisar, S.; Kim, D.-K.; Sarwar, N.; Rasheed, A.; Ahmad, W.; Afzal, A.M.; Imran, M.; Assiri, M.A.; Shahzad, Z.M.; et al. Highly Efficient, Non-Covalent Functionalization of CVD-Graphene via Novel Pyrene-Based Supporter Construct. *Chemosensors* **2023**, *11*, 83, doi:10.3390/chemosensors11020083.
13. Celiešiūtė, R.; Trusovas, R.; Niaura, G.; Švedas, V.; Račiukaitis, G.; Ruželė, Ž.; Pauliukaite, R. Influence of the Laser Irradiation on the Electrochemical and Spectroscopic Peculiarities of Graphene-Chitosan Composite Film. *Electrochimica Acta* **2014**, *132*, 265–276, doi:10.1016/j.electacta.2014.03.137.
14. Li, Z.; Li, K.; Wang, S.; Teng, C. Covalent Patterning of Graphene for Controllable Functionalization from Microscale to Nanoscale: A Mini-Review. *Frontiers in Chemistry* **2022**, *10*.
15. Lenner, M.; Kaplan, A.; Huchon, Ch.; Palmer, R.E. Ultrafast Laser Ablation of Graphite. *Phys. Rev. B* **2009**, *79*, 184105, doi:10.1103/PhysRevB.79.184105.