



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

**ESTUDOS PARA DETERMINAÇÃO DE 4-AMINOFENAZONA EM
AMOSTRAS DE COCAÍNA USANDO ELETRODO DE CARBONO VÍTREO
MODIFICADO COM NANOCOMPÓSITO DE ÓXIDO DE GRAFENO
REDUZIDO E AZUL DA PRÚSSIA**

KARSONN BATISTA DOS REIS

Dissertação de Mestrado

UBERLÂNDIA/MG

2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

ESTUDOS PARA DETERMINAÇÃO DE 4-AMINOFENAZONA EM AMOSTRAS DE COCAÍNA USANDO ELETRODO DE CARBONO VÍTREO MODIFICADO COM NANOCOMPÓSITO DE ÓXIDO DE GRAFENO REDUZIDO E AZUL DA PRÚSSIA

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Química.

Área de concentração: Química Analítica.

Mestrando: Karsonn Batista dos Reis

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Mathias Richter

Linha de Pesquisa: Eletroquímica Aplicada

UBERLÂNDIA/MG

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

R375e
2022

Reis, Karsonn Batista dos, 1985-
Estudos para determinação de 4-aminofenazona em amostras de cocaína usando eletrodo de carbono vitreo modificado com nanocompósito de óxido de grafeno reduzido e azul da Prússia [recurso eletrônico] / Karsonn Batista dos Reis. - 2022.

Orientador: Eduardo Mathias Richter.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia.
Programa de Pós-Graduação em Química.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2023.7016>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.

1. Química. I. Richter, Eduardo Mathias, 1965-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDU: 54

André Carlos Francisco
Bibliotecário - CRB-6/3408



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química
 Av. João Naves de Ávila, 2121, Bloco 5I - Bairro Santa Mônica, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: (34) 3239-4385 - www.cpgquimica.iq.ufu.br - cpgquimica@ufu.br



ATA

Programa de Pós-Graduação em:	Química				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico PPGQUI				
Data:	Vinte e um de dezembro de dois mil e vinte e dois	Hora de início:	19:00	Hora de encerramento:	22:47
Matrícula do Discente:	12022QMI009				
Nome do Discente:	Karson Batista dos Reis				
Título do Trabalho:	"Estudos para determinação de 4-aminofenazona em amostras de cocaína usando eletrodo de carbono vítreo modificado com nanocompósito de óxido de grafeno reduzido e azul da Prússia."				
Área de concentração:	Química				
Linha de pesquisa:	Eletroquímica Aplicada				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	"Desenvolvimento de procedimentos analíticos simples e rápidos para triagens de amostras de interesse forense".				

Reuniram-se de forma online, na plataforma *Google Meet* (<https://meet.google.com/tzi-vwyf-kbk>), a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Química, assim composta: Professores Doutores: Rodrigo Amorim Bezerra da Silva, da Universidade Federal de Uberlândia, Wallans Torres Pio dos Santos, da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri e Eduardo Mathias Richter, orientador do candidato.

Iniciando os trabalhos, o presidente da mesa, Dr. Eduardo Mathias Richter, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato, agradeceu a presença de Todos e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.



Documento assinado eletronicamente por **Eduardo Mathias Richter, Professor(a) do Magistério Superior**, em 04/01/2023, às 10:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Wallans Torres Pio dos Santos, Usuário Externo**, em 04/01/2023, às 10:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Amorim Bezerra da Silva, Professor(a) do Magistério Superior**, em 04/01/2023, às 11:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4115592** e o código CRC **31E1278A**.

Dedico este trabalho
da minha avó
(Maria das Dores -
in memoriam) e dos
meus filhos de
quatro patas Xexeu,
Suzy e Dalila.

AGRADECIMENTOS

- A Deus, pela vida a cada dia, mesmo sabendo que não sou merecedor.
- À minha avó Maria das Dores Batista (in memorian), pelos ensinamentos e por tudo que representou na minha vida porque também foi pai e mãe.
- Aos meus filhos Xexeu, Suzy e Dalila (in memorian) vocês foram a grande razão para eu ter chegado aqui.
- À minha tia Miriam e seus filhos Francisca e Júnior pela ajuda nos momentos em que precisei.
- À minha mãe Silvana Batista e irmã Tânia Maria.
- À Universidade Federal de Uberlândia - UFU e ao Instituto de Química IQUFU
- Aos professores da banca da qualificação, Dr. Rodrigo Amorim Bezerra e o Dr. Jefferson Ferrari.
- Ao meu orientador Eduardo Mathias Richter e a todos do Núcleo de Pesquisa em Eletroanalítica (NUPE) - UFU
- Aos meus amigos Pedro Borges, Murilo e Samuel Carlos do Grupo de Química de Materiais Inorgânicos Nanoestruturados (GQMIN) – UFU
- As minhas amigas Anízia Durans, Naila Collins e Ronária Lima
- Aos meus amigos da Engenharia Química em especial minha equipe: Howdennys, Elita, Gabriela e Jeferson
- Aos meus amigos de Cocal – PI, Carlos, Rayane, Marcielle e Adson que a nossa amizade possa permanecer firme e forte.
- Ao Rafael, Fernanda, Fábio, Luciana, Christiane, Jonas, Patrícia Ramalho, Vitorino, Rosangela, Marcelo, Junior, Jorge, Cilene, Jessica, Michelle, Guga, Paolla, Bianca, Franciyellen, Daniela, Lícia Ramos, Jaciara Martins, Adrielle Rocha e a todos os demais amigos que me proporcionaram a realização desse sonho;
- Gratidão.

PUBLICAÇÕES E CONGRESSOS NO PERÍODO

Trabalho apresentado na forma de painel eletrônico no I Workshop GMIT (Grupo de Materiais Inorgânicos do Triângulo) sob título “Preparação eletroquímica do nanocompósito óxido de grafeno reduzido/azul da Prússia”. 2021, Uberlândia, Minas Gerais - Brasil.

Trabalho apresentado na forma de painel no XXII Brazilian Congresso of Toxicology (CBTOX), sob título “Selective determination of 4-aminopyrine in seized cocaine samples by a reduced graphene oxide/ blue Prussian”. 2022, Balneário Camboriú – Santa Catarina – Brasil.

RESUMO

Neste trabalho mostramos a preparação por via eletroquímica de um filme de nanocompósito de óxido de grafeno reduzido e azul da Prússia (rGO/FeHCF) e sua posterior aplicação como sensor eletroquímico na detecção de 4-aminofenazona (4AF) em amostras de cocaína apreendidas. O material foi produzido sobre um eletrodo de carbono vítreo em um sistema eletroquímico típico de três eletrodos por voltametria cíclica (CV) imerso em uma dispersão de GO com íons Fe^{2+} . Após secagem, este precursor foi submetido a voltamogramas cíclicos sucessivos em solução de ferrocianeto de potássio, obtendo-se o nanocompósito rGO/FeHCF desejado. Os testes eletroquímicos após formação do filme demonstraram um efeito sinérgico entre os materiais que pôde ser evidenciado pelo aumento de intensidade de corrente e pela boa estabilidade química durante 50 CVs em meio ácido (pH = 4). As caracterizações realizadas por meio de espectroscopia Raman e de absorção no infravermelho com transformada de Fourier mostraram efetiva redução do GO bem como a formação do filme de PB. As imagens de microscopia mostraram partículas de PB bem distribuídas sobre folhas de rGO sendo sua constituição também confirmada por EDX. Nos estudos por CV, investigações foram realizadas para identificar a região onde o analito apresentava atividade redox usando o eletrodo de carbono vítreo modificado e não modificado. Estudos realizados por análise por injeção em batelada com detecção amperométrica demonstraram que a determinação de 4AF foi possível em amostras de cocaína (sem interferência dos adulterantes comuns presentes neste tipo de amostra). Além disso, também foi feita uma comparação utilizando o eletrodo de GC para verificar a possibilidade de determinação deste eletrodo de trabalho em relação a 4AF. Além disso, uma comparação também foi realizada usando o eletrodo de GC não modificado para a determinação de 4AF. Percebeu-se que o eletrodo de GC apresentou melhor sensibilidade para a determinação de 4AF, demonstrando que o eletrodo sem modificação também é uma boa alternativa para a determinação deste analito em amostras forenses.

Palavras – chaves: 4 – aminopirina, eletrodo modificado, voltametria cíclica, amperometria, eletroquímica, drogas de abuso.

ABSTRACT

In this work we show the electrochemical preparation of a nanocomposite film of reduced graphene oxide and Prussian blue (rGO/FeHCF) and its subsequent application as an electrochemical sensor in the detection of 4-aminophenazone (4AF) in seized cocaine samples. The material was produced on a glassy carbon electrode in a typical three-electrode electrochemical system by cyclic voltammetry (CV) immersed in a GO dispersion with Fe²⁺ ions. After drying, this precursor was subjected to successive cyclic voltammograms in potassium ferricyanide solution, obtaining the desired rGO/FeHCF nanocomposite. The electrochemical tests after film formation demonstrated a synergistic effect between the materials that could be evidenced by the increase in current intensity and by the good chemical stability during 50 CVs in acid medium (pH = 4). The characterizations carried out by means of Raman spectroscopy and infrared absorption with Fourier transform showed effective reduction of GO as well as the formation of the PB film. The microscopy images showed PB particles well distributed on rGO sheets and their constitution was also confirmed by EDX. In CV studies, investigations were carried out to identify the region where the analyte showed redox activity using the modified and unmodified glassy carbon electrode. Studies carried out by batch injection analysis with amperometric detection demonstrated that the determination of 4AF was possible in cocaine samples (without interference from the common adulterants present in this type of sample). In addition, a comparison was also performed using the unmodified GC electrode for the determination of 4AF. It was noticed that the GC electrode showed better sensitivity for the determination of 4AF, demonstrating that the clean electrode is also a good alternative to the determination of this analyte in forensic samples.

Keywords: 4 – aminopyrine, modified electrode, cyclic voltammetry, amperometry, electrochemistry, drugs of abuse.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química da 4 – Aminofenazona	4
Figura 2 - Rampa de programação de potencial no sentido anódico (A), voltamograma típico para processos redox reversíveis (B) [38].	7
Figura 3 - Voltamograma cíclico típico com guias para obtenção dos parâmetros [43]. 7	
Figura 4 - Diagrama esquemático de uma célula BIA apresentado por Wang onde (A) eletrodo de trabalho, (B) eletrodo auxiliar, (C) eletrodo de referência, (D) ponteira da micropipeta, (E) buraco para inserção de eletrólito, (F) barra de agitação e (G) saída de drenagem [50].....	8
Figura 5 - Diagrama adaptado das etapas de operação do sistema BIA.....	9
Figura 6 - Estrutura do carbono vítreo proposto por Jenkins e Kawamura [75].	13
Figura 7 - (a) Grafeno embrulhado em forma (b) esfera (fulereno), (c) enrolado (nanotubo de carbono de parede simples) e (d) empilhado (grafite) [82].	14
Figura 8 - Modelo de Lerf-Klinowski para a estrutura do grafeno [102].....	16
Figura 9 - Representação das estruturas do GO e rGO [110].	17
Figura 10 - Estruturas cristalinas do AP "insolúvel" (a) e "solúvel" (b) [126].	19
Figura 11 - CVs para a eletrodeposição de rGO em uma dispersão precursora de 1,0 mg mL ⁻¹ de OG em eletrólito de suporte contendo 0,05 mol L ⁻¹ de Na ₂ SO ₄ , sobre a superfície do GCE, utilizando velocidade de varredura 10 mV s ⁻¹	27
Figura 12 - CVs para a eletrodeposição de rGO/Fe em uma dispersão precursora de 1,0 mg mL ⁻¹ de OG, 1,0 mmol L ⁻¹ de FeSO ₄ , em eletrólito de suporte contendo 0,05 mol L ⁻¹ de Na ₂ SO ₄ , sobre a superfície do GCE, utilizando velocidade de varredura 10 mV s ⁻¹ . 28	
Figura 13 - CVs para a eletrodeposição de Fe em uma dispersão precursora de 1,0 mmol L ⁻¹ de FeSO ₄ , em eletrólito de suporte contendo 0,05 mol L ⁻¹ de Na ₂ SO ₄ , sobre a superfície do GCE, utilizando velocidade de varredura 10 mV s ⁻¹	28
Figura 14 - CVs mostrando a formação do rGO/FeHCF (a) e FeHCF (b) em 1,0 mmol L ⁻¹ de K ₃ [Fe(CN) ₆]. Eletrólito de suporte: 0,1 mol L ⁻¹ de KCl (pH = 2, ajustado com HCl); 6 ciclos de -0,2 a 0,6 V, à 100 mV s ⁻¹	29
Figura 15 - Teste de estabilidade dos eletrodos modificados com rGO/FeHCF (linha azul) e FeHCF (linha vermelha) em soluções com diferentes pHs (2,0; 4,0; 7,0; 9,0) ajustado com HCl e NaOH. Eletrólito de suporte, 0,1 mol L ⁻¹ de KCl, dados da CV (-0,2 a 0,6 V, à 100 mVs ⁻¹).....	30

Figura 16 - Variação da intensidade da corrente relativa no decorrer de 50 voltamogramas cíclicos em 0,1 mmol L ⁻¹ de KCl para rGO/FeHCF e FeHCF	31
Figura 17 - Espectros Raman obtidos neste trabalho.	32
Figura 18 - Espectros de infravermelho com transformada de Fourier obtidos neste trabalho para os diferentes materiais estudados.	34
Figura 19 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura dos filmes de GO (a), rGO (b), FeHCF (c) e rGO/FeHCF (d). Filme de rGO/FeHCF sobre eletrodo de FTO (e) e (f).	35
Figura 20 - Espectros de raio X por dispersão em energia dos filmes de GO (a), rGO (b), FeHCF (c) e rGO/FeHCF (d).	36
Figura 21 - CVs obtidos com o eletrodo de GCE não modificado na ausência e presença de 4AF (A). CVs obtidos com o eletrodo de GCE modificado com o nanocompósito rGO/FeHCF na presença e ausência de 4AF (B). Eletrólito de suporte: 0,1 mol L ⁻¹ de KCl (pH = 4, ajusta com HCl); faixa de potencial: -0,2 a 1,2 V, velocidade de varredura, 100 mVs ⁻¹	37
Figura 22 - Teste de velocidade de varredura do eletrodo modificado com rGO/FeHCF frente à 2,5 mmol L ⁻¹ de 4AF (a). Relação I_{pa} vs v^{1/2} (b). Relação log I_{pa} vs log v (c). Relação E_{pa} vs v (d). Eletrólito de suporte: 0,1 mol L ⁻¹ de KCl (ajustado com HCl, pH = 4); Velocidade de varredura de -0,2 a 1,2 V.	38
Figura 23 - Gráficos referentes à otimização das variáveis do sistema BIA para determinação de 4AF: (a) potencial aplicado (0,80 V) (b) velocidade de injeção (164 μL s ⁻¹), (c) volume de injeção (80 μL). Eletrólito suporte: 0,1 mol L ⁻¹ de KCl (ajustado com HCl, pH = 4). [4AF] = 2,5 μmol L ⁻¹	40
Figura 24 - Amperograma referente às injeções de interferentes comumente encontrados em amostras de cocaína apreendida juntamente com a solução padrão de [4AF] = 2,5 μmol L ⁻¹ . Eletrólito de suporte 0,1 mol L ⁻¹ de KCl (ajustado com HCl, pH= 4); Potencial aplicado: 0,80 V; Velocidade de injeção: 164 μL s ⁻¹ e Volume de injeção: 80 μL.....	41
Figura 25 - Amperograma referente às injeções de 4AF padrão e com amostras de COCap (a). Teste de repetibilidade realizado por 6 injeções de baixa (0,5 μmol L ⁻¹) e 6 injeções de alta concentração (10 μmol L ⁻¹) de 4AF (b). Curvas de calibração das injeções crescentes e decrescentes do padrão (c). Eletrólito de suporte: 0,1 mol L ⁻¹ de KCl (ajustado com HCl, pH = 4); Potencial aplicado: 0,80 V; Velocidade de injeção 164	

$\mu\text{L s}^{-1}$; Volume de injeção: 80 μL . Concentrações usadas para obtenção da curva analítica: 0,25; 0,50; 0,75, 1; 2,5; 5,0; 7,5; 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 42

Figura 26 – Amperograma referente às injeções de 4AF padrão usando eletrodo de GC

(a). Curvas de calibração das injeções crescentes e decrescentes do padrão (b). Eletrólito

suporte: 0,1 mol L^{-1} de KCl (ajustado com HCl, pH= 4); Potencial aplicado: 0,8 V;

Velocidade de injeção 164 $\mu\text{L s}^{-1}$; Volume de injeção: 80 μL . Concentrações usadas

para obtenção da curva analítica: 0,50; 1; 2; 7,5; 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efeitos colaterais da 4AF	5
Tabela 2 - Linhas gerais da evolução dos EQMs.	10
Tabela 3 - Reagentes utilizados neste trabalho.....	22
Tabela 4 - Resumo da preparação dos materiais.	26
Tabela 5 - Variação da corrente relativa do pico de oxidação durante 50 CVs.....	31
Tabela 6 - Resumo das bandas discutidas e a razão das entre as bandas ID e IG	33
Tabela 7 - Variáveis otimizadas para análise de 4AF por BIA-AD. Teste de repetibilidade realizado por 6 injeções de baixa ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$) e 6 injeções de alta concentração ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl (ajustado com HCl, pH= 4).	41
Tabela 8 - - Parâmetros analíticos obtidos da curva da detecção por BIA-AD de 4AF no eletrodo modificado com rGO/FeHCF.	43
Tabela 9 – Parâmetros analíticos obtidos da curva da detecção por BIA-AD de 4AF no eletrodo de GC.....	44
Tabela 10 – Comparação da quantificação de 4AF por meio de outros métodos analíticos.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4AF	4 – Aminofenazona
AMP	Amperometria
BIA	Análise por injeção em batelada – do inglês “ <i>Batch Injection Analysis</i> ”
COCap	Cocaína apreendida
EDS	Espectroscopia de raio X por dispersão em energia – do inglês “ <i>Energy dispersive X-ray spectroscopy</i> ”
EQM	Eletrodo quimicamente modificado
FeHCF	Hexacianoferrato de ferro
FTIR	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier – do inglês “ <i>Fourier-transform infrared spectroscopy</i> ”
FL	Faixa linear
GO	Graphene oxide
GC	Glass carbon
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
PB	Prussian blue
rGO (<i>oxide</i>)	Óxido de grafeno reduzido (rGO – do inglês <i>reduced graphene oxide</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Considerações Gerais	1
1.2	4 - Aminofenazona	3
1.3	Técnicas Eletroquímicas	6
1.3.1	<i>Voltametria Cíclica</i>	6
1.3.2	<i>Detecção amperométrica acoplada ao sistema BIA</i>	7
1.4	Eletrodos quimicamente modificados	9
1.5	Carbono vítreo	12
1.6	Grafeno e derivados	13
1.7	Azul da Prússia	18
2	OBJETIVOS	21
2.1	Objetivo Geral	21
2.2	Objetivos Específicos	21
3	METODOLOGIA	22
3.1	Reagentes e Soluções	22
3.2	Instrumentação	22
3.2.1	<i>Medidas Eletroquímicas</i>	22
3.2.2	<i>Espectroscopia Raman</i>	23
3.2.3	<i>Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier</i>	23
3.2.4	<i>Microscopia eletrônica de varredura</i>	23
3.2.5	<i>Espectroscopia de raio X por dispersão em energia</i>	24
3.3	Preparação dos materiais	24
3.3.1	<i>Óxido de grafeno</i>	24
3.3.2	<i>Óxido de grafeno reduzido</i>	24
3.3.3	<i>Síntese do óxido de grafeno reduzido e óxido de ferro</i>	25
3.3.4	<i>Síntese do óxido de grafeno reduzido e hexacianoferrato de ferro</i>	25
3.3.5	<i>Hexacianoferrato de óxido de ferro</i>	25
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	27
4.1	<i>Síntese eletroquímica do rGO</i>	27
4.2	<i>Síntese eletroquímica do rGO/Fe</i>	27
4.3	<i>Síntese eletroquímica do Fe</i>	28
4.4	<i>Modificação dos materiais (rGO/Fe, Fe)</i>	29
4.5	<i>Estudo do pH sobre os eletrodos modificados rGO/FeHCF e FeHCF</i>	29

4.6	<i>Espectroscopia Raman</i>	31
4.7	<i>Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier</i>	33
4.8	<i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	34
4.9	<i>Espectroscopia de raio X por dispersão de energia (EDS)</i>	36
5.1	Estudo eletroquímico da 4-aminofenazona no eletrodo rGO/FeHCF.....	37
5.1.2	<i>Efeito da velocidade de varredura na determinação da 4AF na superfície do eletrodo rGO/FeHCF</i>	38
5.1.3	<i>Determinação da 4AF por BIA-AD utilizando o eletrodo modificado rGO/FeHCF</i>	39
6	CONCLUSÕES	46

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Gerais

Nos últimos anos tem se observado uma diminuição no grau de pureza da cocaína, raramente encontra-se essa droga 100% pura sendo comercializada pelos traficantes [1, 2]. Algumas substâncias de baixo custo tem sido adicionadas a essa droga, com o objetivo de aumentar seu volume gerando dessa forma maiores lucros durante as vendas. Essas substâncias farmacologicamente inativas são chamadas de diluentes. Como por exemplo, tem-se açúcares, carbonatos, bicarbonatos e amido [1].

Por outro lado, substâncias farmacológicas chamadas de adulterantes tem sido comumente adicionada a cocaína, a presença dessas substâncias pode intensificar os efeitos psicotrópicos ou mesmo reduzir os efeitos dessa droga após o seu consumo [3]. Os adulterantes mais recorrentes encontrados em amostras de cocaína são: lidocaína, benzocaína, procaína, fenacetina e levamisol.

A presença dessas substâncias em amostras de cocaína apreendidas tem ganhado grande destaque em laboratórios forenses, uma vez que podem indicar dados importantes quanto a sua produção e distribuição. Além disso, a caracterização da droga bem como a identificação de sua composição, principalmente dos adulterantes é de suma importância, uma vez que essas substâncias por serem farmacológicas podem gerar sérios danos à saúde dos usuários [4].

No entanto essas substâncias que são adicionadas à cocaína estão em constante mudança, o que dificulta muito as investigações policiais, bem como também imprevisíveis riscos à saúde. Na literatura diversos trabalhos relatam pesquisas abordando meios para identificar os adulterantes e/ou diluentes presentes nas adulterações da cocaína comercializada pelos traficantes.

Um monitoramento realizado na Holanda no período de 1997 - 2009 mostrou que os principais adulterantes encontrados em amostras de cocaína foram: benzocaína, fenacetina, procaína, levamisol, lidocaína e hidroxizina. Nesse mesmo estudo, foi revelado também que a prática de adulteração dessa droga aumentou significativamente passando de 6,5% em 1999 para 53,6% em 2007 [5].

No Brasil, uma pesquisa realizada com 210 amostras apreendidas em diversos estados brasileiros no período de 2009-2012 identificou fenacetina, levamisol e lidocaína como os principais adulterantes adicionados a cocaína [6, 7]. A referida pesquisa também

estudou no período de 2008-2010 amostras dessa droga apreendida no estado de Minas Gerais, identificando lidocaína, cafeína e a benzocaína como principais adulterantes. [8].

Em 1997, no Estado de São Paulo, um estudo com 389 amostras de cocaína apreendida revelou a presença de lidocaína, procaína e cafeína como principais adulterantes [9]. Em outro trabalho, uma análise com 31 amostras de apreensões feitas em Minas Gerais (MG) e Amazonas (AM), determinando a concentração da cocaína e seus adulterantes indicou uma variação de pureza da cocaína de 6,8% - 97,8%. Em relação as amostras do estado de Minas Gerais, 72% apresentavam pureza inferior a 20%, sendo nesse referido estudo a cafeína o adulterante com maior presença 76% nas amostras apreendidas [10].

Numa outra análise realizada também no Brasil com 54 amostras de cocaína apreendidas e que estava associada ao tráfico internacional indicou que o grau de pureza dessa droga tinha variado de 16,5% a 91,4% somente no ano de 2011, sendo o levamisol o adulterante mais encontrado nessas amostras. Outras substâncias como lidocaína, cafeína, fenacetina e 4-aminofenazona também foram encontradas nessas amostras, porém em menores concentrações [11].

É importante frisar que na literatura existem diversos relatos de usuários atendidos em caráter emergencial devido aos efeitos adversos provocados pela adulteração da cocaína, como por exemplo: intoxicação aguda causada pela presença de fenitoína [12], um fármaco do grupo dos antiepilépticos muito usado na prevenção de convulsões. Além disso, intoxicações com anticolinérgicos como a atropina também foram relatadas [13].

A identificação e quantificação de adulterantes e diluentes tem sido de suma importância, principalmente para as forças de segurança nacional, uma vez que possibilita dados estratégicos no combate do tráfico dessa droga [14]. Além disso, permite intensificar o controle sobre determinados medicamentos que podem contribuir para uma questão de saúde pública há interação destes com a cocaína por meio da prática da adulteração dessa droga [15].

Testes preliminares fundamentados em reações de cor e turbidez são muito utilizados em campo e em laboratório com o objetivo de se obter uma identificação qualitativa de substâncias controladas [16]. Esses testes são compostos de técnicas simples e rápidas que visa materializar o objeto do crime e amparar o auto de prisão em flagrante delito, além disso servem também para nortear o exame definitivo [17].

O teste colorimétrico é um desses exames preliminares sendo muito comum e bastante aplicado para definir a presença de uma certa substância em uma amostra [18].

Para a cocaína, o teste usado dentro desta categoria é o chamado de teste de Scott e que consiste em três etapas em que cada uma é adicionado um reagente para consequente observação de um fenômeno característico que se estabelece como resultado possível de análise [19].

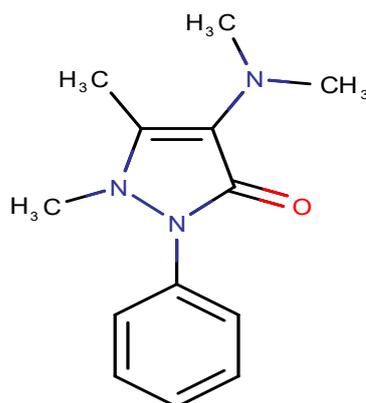
Apesar de vários autores reconhecerem uma especificidade satisfatória do teste de Scott para a cocaína, uma série de profissionais da química forense tem reportado problemas de falso-positivos em relação a esse teste [20]. Diante dessa situação e apresentando vantagens como baixo custo, fácil manuseio, possibilidade de análise *in loco* e uma boa resposta na identificação de substâncias ilícitas, as técnicas eletroquímicas podem se tornar uma alternativa viável frente aos testes colorimétricos.

Embora seja reportado na literatura diversos trabalhos empregando técnicas eletroquímicas na detecção de substâncias ilícitas, as mesmas, bem como os testes colorimétricos não irão substituir técnicas já consagrados, como a Cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massas (GC-MS) [21], Cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (GC-FID) [22] e a Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) [23].

Nesse trabalho vai ser abordado estudos sobre a determinação de 4-aminofenazona em amostras de cocaína. Esse medicamento foi reportado como adulterante em amostras de cocaína apreendidas no Brasil em 2011. Essa substância pode apresentar efeitos colaterais bastante severos se consumido de maneira irregular e, portanto, é de extrema importância seu monitoramento.

1.2 4 - Aminofenazona

A 4-aminofenazona (4AF) sintetizada pela primeira vez por Friedrich Stolz e Ludwig Knorr e que também é chamada de aminopirina ou 4-dimethylamino-1,5dimethyl-2-phenylpyrazol-3-one (IUPAC), cuja estrutura é apresentada na Figura 1, é um fármaco, que foi inserido em 1888 no mercado com o nome Pyramidon [24, 25]. Esse fármaco ganhou muita popularidade entre os médicos por causa dos seus efeitos analgésicos, anti-inflamatórios e antipiréticos, sendo bastante usado no tratamento da artrite reumatoide e da febre reumática [26]. O mecanismo de ação principal desse fármaco está relacionado a redução da síntese de prostaglandinas no tecido [27].

Figura 1 - Estrutura química da 4 – Aminofenazona

Fonte: DrugBank

Apesar da sua eficácia no tratamento dessas enfermidades, esse fármaco traz consigo alguns efeitos colaterais se consumido de maneira inadequada como: reações alérgicas, irritabilidade, sudorese copiosa, disúria, dispneia, ansiedade, tenesmo, infiltração gordurosa do fígado, degeneração do músculo cardíaco, cianose, zumbido, leucopenia, danos nos rins, coma, morte por insuficiência circulatória após colapso cardiovascular, além de causar também agranulocitose e formação de nitrosaminas [24, 25, 26, 28].

Em 1949, numa tentativa de diminuir esses efeitos colaterais bastante preocupantes da 4AF, a Geigy (atual Novartis) anunciou uma nova formulação intravenosa de mistura de aminopirina e fenilbutazona, a essa formulação a empresa chamou de “Irgapirina”. No entanto, experimentos posteriores demonstraram que a fenilbutazona agia como analgésico e anti-inflamatório bastante eficaz, sendo comercializada pela Geigy em 1952 como o nome de butazolidina [26].

Em virtude da toxicidade provocada pela 4AF, ela foi retirada do mercado em muitos países ocidentais entre as décadas de 1960 e 1970. No entanto, em países orientais como a China ainda se faz uso desse medicamento de forma ilegal, sendo usado em combinação com a cafeína ou fenacetina para formulação de compostos farmacêuticos no tratamento de pacientes com sintomas de febre e enxaqueca e no tratamento de pacientes com doenças reumáticas [29].

Devido aos efeitos colaterais em decorrência do consumo da 4AF, tornou-se necessário a identificação desse fármaco em medicamentos falsificados chineses usados no tratamento antirreumático. Para a investigação desse fármaco utilizou-se, a técnica espectroscopia de terahertz (THz), um tipo de espectroscopia vibracional e rotacional correspondente a região do espectro eletromagnético na faixa de frequências entre 0,1 e

10 THz (3,3 a 333 cm^{-1}) [30]. Essa técnica tem sido reportada na literatura na identificação, reconhecimento e classificação de amostras e na análise quantitativa, de uma diversidade de substâncias com o uso de métodos multivariados de análise [31]. Ela é comumente utilizada na investigação de medicamentos falsificados [28]. A **Tabela 1**, mostra os efeitos da 4AF nos sistemas e órgãos humanos.

Tabela 1 - Efeitos colaterais da 4AF [32].

1 Sistemas e órgãos	Efeitos colaterais dá 4AF
Hematológico	Problema na medula óssea causada pela 4AF geralmente vem acompanhada com risco de morte.
Gastrointestinal	A toxicidade gastrointestinal por 4AF não é muito forte em relação a outros analgésicos e anti-inflamatórios, devido ao seu efeito anti-inflamatório ser fraco
Fígado	Não é hepatóxica, mas devido a reação de hipersensibilidade, pode ocorrer casos de toxicidade no fígado.
Trato urinário	É responsável direto por dano renal, podendo causar Albuminúria e hematúria. Também pode causar nefropatia analgésica.
Pele	Pode causar necrólise epidérmica tóxica, dermatite esfoliativa e síndrome de Stevens-Johnson.
Imunológico	Em alguns pacientes predispostos, observou-se reações alérgicas cutâneas, choque anafilático agudo, broncoespasmo agudo e sensibilidade cruzada a aspirina.
Efeitos a longo prazo (Tumorigenicidade)	A 4AF bem como seus derivados podem ser metabolizados e formarem nitrosaminas (substâncias cancerígenas).

Em 2011, a 4AF foi reportada na literatura como adulterante da cocaína [33]. Essa confirmação foi feita após análise em amostras de cocaína apreendida pelas forças

policiais do DF, e seu aparecimento se deu associado a uma outra substância usada como adulterante, a fenacetina [34].

Diversos métodos são propostos na literatura para determinação da 4AF entre os quais podemos citar: cromatografia líquida de alta performance (HPLC) com detecção ultravioleta (UV/Vis) [35], espectrometria de massa [36], eletroforese capilar com detecção eletroquímica [37]. Entretanto, este trabalho buscou o desenvolvimento de um método eletroquímico para determinação desse composto em amostras de cocaína possibilitando assim o fornecimento de dados estratégicos no combate ao tráfico dessa droga.

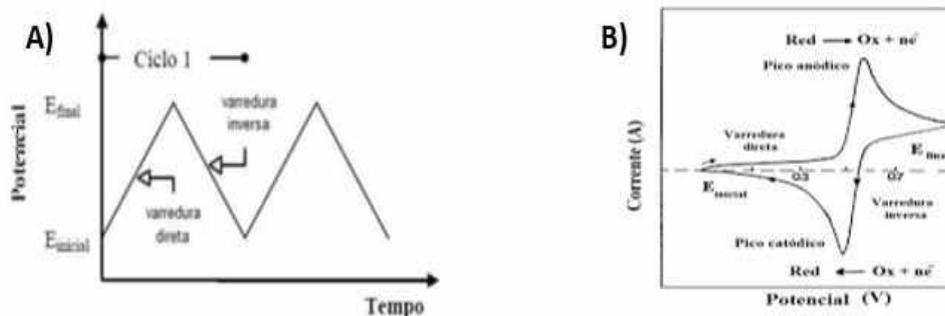
1.3 Técnicas Eletroquímicas

1.3.1 Voltametria Cíclica

A voltametria cíclica (CV, do inglês *Cyclic Voltammetry*) é uma técnica amplamente utilizada na obtenção de reações eletroquímicas. A eficiência dessa técnica estar em fornecer rapidamente informações relevantes sobre a cinética da reação de transferência de elétrons e sobre a termodinâmica dos processos redox, além disso a CV permite uma rápida localização dos valores de potenciais redox [38]. Geralmente, a CV é o experimento inicial em um estudo eletroquímico [39, 40].

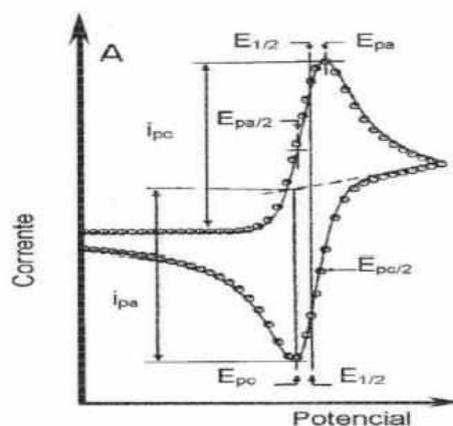
Essa técnica consiste na aplicação de uma variação linear do potencial, até atingir um potencial máximo, a partir daí se inicia a varredura inversa, variando linearmente o potencial no sentido oposto, até alcançar um potencial mínimo programado, finalizando assim um ciclo [41]. A variação de incrementos de potencial é a mesma para ambas as polarizações, e o número de excitação repetido várias vezes. A programação pode ser realizada tanto no sentido positivo com uma polarização anódica, quanto no sentido negativo, iniciando com uma polarização catódica. A resposta obtida é um voltamograma que relaciona o potencial (E) em função da corrente (i), como pode ser observado na **Figura 2**.

Figura 2 - Rampa de programação de potencial no sentido anódico (A), voltamograma típico para processos redox reversíveis (B) [38].



A **Figura 3**, mostra alguns parâmetros eletroquímicos que são bastante importantes na CV como: potencial de pico anódico (E_{pa}), potencial de pico catódico (E_{pc}), corrente de pico anódico (I_{pa}), corrente de pico catódico (I_{pc}), e o potencial de meia onda ($E_p/2$) [42].

Figura 3 - Voltamograma cíclico típico com guias para obtenção dos parâmetros [43].



A partir dos principais parâmetros obtidos é possível obter informações quanto a reversibilidade do sistema em estudo (reversível, quase-reversível e irreversível) e, assim, avaliar a influência do meio reacional sobre estes parâmetros, bem como analisar sobre a existência e estabilidade de radicais e intermediários formados durante a redução e oxidação de espécies eletroativas [44].

1.3.2 Detecção amperométrica acoplada ao sistema BIA

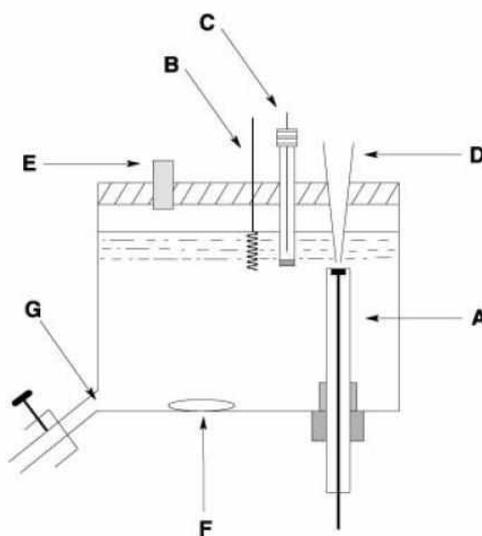
A detecção amperométrica acoplada a sistemas de análise por injeção em batelada (BIA) consiste em injeções sequenciais de amostras sobre a face de um eletrodo na configuração *wall-jet* mergulhado em um maior volume de eletrólito. Esse sistema

hidrodinâmico fornece medidas sensíveis e com maior frequência analítica (> 30 injeções h^{-1}) em comparação com o sistema estacionário [45, 46].

Este conjunto eletroquímico pode ser usado como um sistema para análises *in situ*, devido sua portabilidade em apresentar características como o uso de pequenos volumes de amostra (comumente entre 20 e 100 μL) o que reduz a contaminação do eletrodo (curto tempo de contato entre a amostra e o eletrodo) e permite ainda fazer mais de 200 injeções sem alterar o eletrólito de suporte na célula BIA (altas taxas de diluição) e não há necessidade de manuseio dos eletrodos. Todos os parâmetros adicionais como, volume de injeção, velocidade de injeção, curva de análise e injeção de amostra são feitos através de uma micropipeta eletrônica [47, 48].

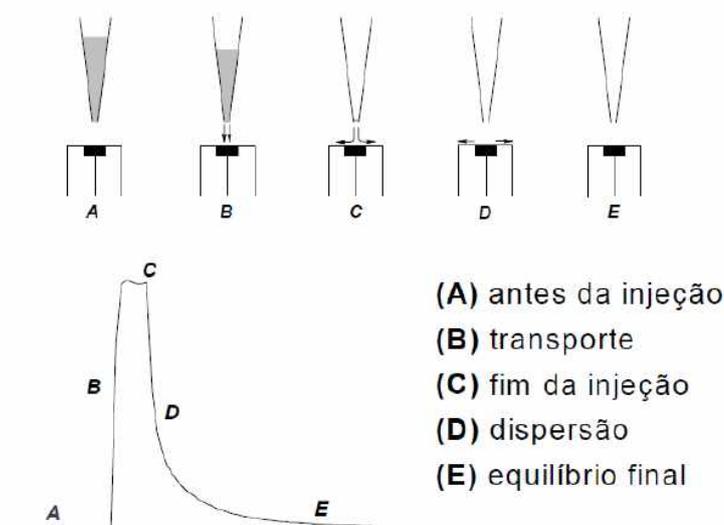
A utilização de uma impressora 3D permite produzir células personalizadas para essa finalidade à baixo custo e sem necessidade de mão de obra especializada. A prototipagem de células de acordo com as necessidades específicas de cada sistema pode aumentar ainda mais o desempenho do sistema BIA [49]. A **Figura 4** mostra a primeira célula BIA descrito por Wang, bem como a disposição dos componentes para a realização da análise.

Figura 4 - Diagrama esquemático de uma célula BIA apresentado por Wang onde (A) eletrodo de trabalho, (B) eletrodo auxiliar, (C) eletrodo de referência, (D) ponteira da micropipeta, (E) buraco para inserção de eletrólito, (F) barra de agitação e (G) saída de drenagem [50].



Quando ocorre a passagem da espécie em análise sobre a superfície do eletrodo, são registrados picos (sinais transientes), conforme pode ser observado na **Figura 5**.

Figura 5 - Diagrama adaptado das etapas de operação do sistema BIA [50].



Como exemplificado na **Figura 5**, no início da análise (A), antes da injeção da amostra ou analito na superfície do eletrodo há uma corrente não faradaica, ou seja, corrente residual indicando, por exemplo, o acúmulo de carga na dupla camada elétrica. Após injeção (B) se inicia o sinal da corrente faradaica, que é produzida por processos de oxirredução dentro da célula eletroquímica, até o pico máximo de corrente (C) quando toda espécie eletroativa injetada reage através do processo redox do analito. Como a corrente é proporcional com a concentração de amostra, esta decai (D), já que toda concentração da espécie injetada vai sendo consumida, diminuindo então sua concentração, até que a corrente volta ao valor de corrente não faradaica (E), proveniente do sistema [51].

Entretanto, um dos problemas desse tipo de sistema quando se aplica eletrodos sólidos em detecção eletroquímica é o de contaminação/adsorção de componentes na superfície do eletrodo de trabalho. Esse problema pode ser contornado, em sistemas hidrodinâmicos, pela aplicação repetitiva e alternada de pulsos de potenciais de limpeza [52].

1.4 Eletrodos quimicamente modificados

O termo eletrodo quimicamente modificado (EQMs) foi dada por Murray e colaboradores em 1975 [53]. Trata-se da imobilização de espécies quimicamente ativas sobre uma superfície eletródica promovendo uma melhora na reatividade e seletividade do substrato base após sua modificação. O desenvolvimento desses dispositivos visa o

aumento na taxa de transferência de elétrons, eletrocatalise, possibilidade de pré-concentração de espécies em solução, dentre outras [54, 55]. Os EQMs têm sua aplicação para diversas finalidades como por exemplo: estudo em eletrocatalise e de cinética de transferência de elétrons, fotoeletroquímica e desenvolvimento de sensores e biosensores [56].

Apesar do termo EQM ter sido introduzido na década de 70, já existiam trabalhos envolvendo a modificação de eletrodos na década de 60 para uso com diversos propósitos, como pode ser observado na **Tabela 2**. Um dos primeiros estudos de grande relevância relatando esse tipo de procedimento é atribuído a Lane e Hubbard (1973), onde foram adsorvidas olefinas funcionalizadas na superfície de eletrodos de platina no intuito de investigar a tendência de grupos alcenos quimissorverem-se sobre a superfície deste eletrodo [57].

Tabela 2 - Linhas gerais da evolução dos EQMs [58].

Metas	Ação
Imobilização de grupos funcionais, Cheek e Nelson (1964).	Melhora da seletividade e sensibilidade
Incorporação de catalisadores inorgânicos (ftalocianinas metálicas), Jasinski (1965)	Maior sensibilidade
Incorporação de catalisadores biológicos (imobilização de glicose oxidase), Updike e Hicks (1967)	Melhora da seletividade
Utilização de filmes poliméricos (polipirrol) Diaz (1970)	Estabilidade, seletividade
Aparecimento da denominação (eletrodos quimicamente modificados, EQM), Murray e col. (1975)	Definição da terminologia
Uso de membranas biológicas (membrana de fosfolipídios), Miller e Milazzo (1981)	Aplicações in vivo
Microelétrodos modificados, Fleischman (anos 80)	Melhora da estabilidade, tempo de vida
Incorporação de aditivos	Maior sensibilidade e seletividade

Um EQM é basicamente composto por duas partes, o eletrodo base e um modificador químico. A forma de preparação é definida pelas características analíticas apropriadas que o sensor deve possuir, como; condutividade elétrica e estabilidade térmica, além disso, deve ser levado em consideração a praticidade e a viabilidade de execução do procedimento de modificação.

Em relação ao eletrodo base, os mais amplamente utilizados são: ouro, platina, pasta de carbono e carbono vítreo. Este último apresenta excelentes propriedades mecânicas e elétricas, além de um amplo intervalo de potencial de trabalho, resistência ao ataque de solventes e uma boa performance em eletroanálise, todas essas características faz dele um bom substrato na modificação de eletrodos [59].

Além do substrato base é necessário um modificador o qual será mobilizado na superfície do substrato. Dentre as espécies químicas utilizadas podemos destacar os, nanomateriais de carbono, como o grafeno e seus derivados e os hexacianometalatos como o azul da Prússia. Esses materiais vêm recebendo bastante notoriedade neste aspecto, podendo ser usados para determinação de diversos analitos [60, 61].

Existem diversos métodos de modificação da superfície de eletrodos relatados na literatura como, adsorção, ligação covalente, deposição de filmes poliméricos e formação de materiais compósitos [62], além do método *dropcasting* [63]. A modificação por adsorção é um método bastante simples e que consiste na exposição do eletrodo há uma solução contendo um agente modificador [64].

O método via ligação covalente parte do princípio de que o agente modificador pode ser ligado covalentemente ao substrato do eletrodo por meio de alterações de grupos funcionais presentes na superfície do eletrodo, como álcoois, ácidos carboxílicos (fenóis), anidridos e cetonas (quinonas) [65].

A modificação de superfícies eletródicas pelo método da deposição de filmes poliméricos, é uma técnica que permite a imobilização de muitas monocamadas da espécie ativa na superfície modificada, o que acaba aumentando de forma considerada a resposta eletroquímica. O uso desse tipo de modificador tem sido bastante empregado no desenvolvimento de sensores pois garante a proteção da superfície dos eletrodos contra impurezas [66] e pode bloquear interferentes [67].

O método de *dropcasting* é um tipo de modificação por adsorção, neste método uma gota da dispersão do modificador é transferida para a superfície e a secagem pode ocorrer de diversas maneiras, incluindo filtração à vácuo e evaporação [68].

Para a obtenção de um eletrodo modificado com materiais compósitos, o procedimento é dado pela mistura direta do modificador com o substrato, sendo este uma matriz condutora. Compósitos com características condutoras tem sido utilizado no desenvolvimento de sensores eletroquímicos apresentando bons resultados [69], como por exemplo o emprego de compósitos grafite-epóxi na determinação amperométrica de pesticidas [70].

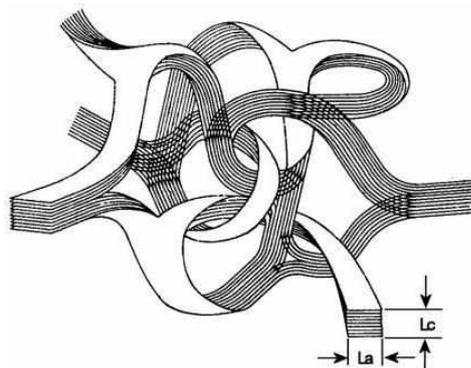
Materiais a base de carbono, como o carbono vítreo que será mais bem detalhado no próximo item, são bons exemplos de substratos para esse tipo de modificação por formarem fases condutoras ideais na obtenção de materiais compósitos, daí serem muito utilizados como sensores amperométricos [71].

1.5 Carbono vítreo

O carbono vítreo (GC – do inglês *glass carbon*), também conhecido como carbono polimérico vítreo, é assim chamado por ser um material que quando polido apresenta brilho idêntico ao vidro. [72]. Os primeiros estudos sobre o GC datam das décadas de 60 e 70 e sua primeira aplicação foi na utilização em cadinhos para tratamento térmico de semicondutores e cerâmicas [73, 74, 75]. Hoje, o GC é comumente utilizado como eletrodo, empresas como a Sigradur e Carburundum, entre outras dominam o processo de obtenção e produção desse material, além da manufatura de peças como chapas, cadinhos, monolitos e tubos.

O processo de obtenção do GC consiste primeiro na moldagem do precursor polimérico como o álcool furfúrico, resinas fenólicas, celulose e poliácridonitrila em temperaturas inferiores a 100 °C. Após essa etapa o material é submetido a processo de carbonização seguido de grafitização [76]. O GC apresenta uma estrutura de planos empilhados idêntica à estrutura da grafita, no entanto difere desta última no aspecto de não apresentar o empilhamento dos planos linearmente arranjados em relação ao eixo cristalográfico “c”, mas sim entrelaçados e enovelados de modo aleatório no espaço. Essa estrutura é comumente conhecida com turbostrática. A **Figura 6** traz o modelo proposto para o GC.

Figura 6 - Estrutura do carbono vítreo proposto por Jenkins e Kawamura [75].



Propriedades como condução térmica e elétrica isotrópica, resistência a altas temperaturas, inércia química e baixa densidade são características importantes que esse material apresenta, o que faz dele ser útil em várias aplicações [77]. Além disso, a ampla faixa de potencial que se pode aplicar sem haver degradação do solvente/eletrólito permite esse há esse material ser utilizado como eletrodo de trabalho [78]. O GC também é usado como eletrodo suporte para obtenção de eletrodos modificados sendo nesse caso empregado como sensores, biosensores, capacitores e no reconhecimento molecular [79] [80].

Devido a inércia química e baixa densidade esse material tem sido também utilizado na construção de válvulas cardíacas e próteses dentárias, uma vez que há pouca baixa rejeição do corpo humano em relação a esse material [81]. Além disso, estudos revelam o uso do GC como proteção térmica de aeronaves, devido à baixa massa específica e resistência a elevadas temperaturas [77].

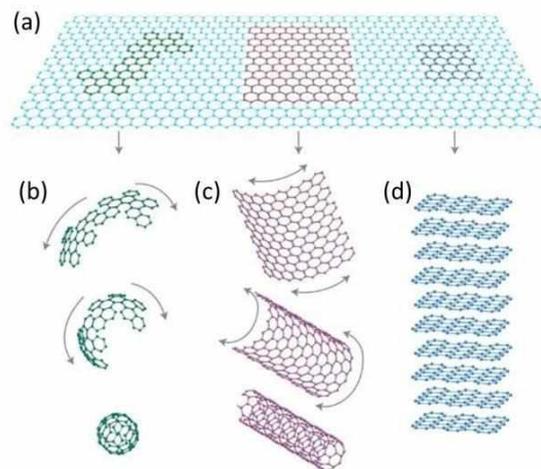
No entanto, mesmo apresentando características interessantes tem-se poucas publicações sobre o GC. Desde a década de 70, o número de publicações referente a materiais de carbono vem crescendo, sendo majoritariamente ligado principalmente aos nanotubos de carbono, e nos últimos anos, na obtenção e isolamento de folhas de grafeno, sendo este último material detalhado com mais detalhe na próxima seção.

1.6 Grafeno e derivados

O grafeno é um material bidimensional (2D) constituído por uma monocamada plana de átomos de carbono hibridizados sp^2 , ligados entre si formando uma estrutura cristalina hexagonal. Esse material é considerado como bloco fundamental de outras formas gráficas de diferentes dimensionalidades como, a grafite (3D), os nanotubos de carbono (1D) e os fulerenos (0D) [82] como pode ser observado na **Figura 7**. O grafeno

começou a ganhar grande destaque em 2004, quando os cientistas André Geim e Konstantin Novoselov conseguiram isolar e caracterizá-lo pela primeira vez, proporcionando a eles o Prêmio Nobel de Física em 2010 [83].

Figura 7 - (a) Grafeno embrulhado em forma (b) esfera (fulereno), (c) enrolado (nanotubo de carbono de parede simples) e (d) empilhado (grafite) [82].



Mesmo com a recente descoberta do grafeno (2004), já se tinha um certo conhecimento de sua existência por volta de 1947 quando o físico P.R. Wallace estudou de forma teórica esse material pela primeira vez [84]. Em 1962 um grupo de pesquisadores conseguiram obter finas lâminas de carbono ao fazerem a redução do óxido de carbono por aquecimento. Entretanto acreditou-se naquela época ser impossível termodinamicamente isolar o grafeno em temperatura ambiente, pois achavam que a rede 2D não fosse estável devidos as flutuações térmicas, o que impossibilitava que a ordem cristalina de longo alcance fosse impedida [85].

A grande atração por parte da comunidade científica em relação ao grafeno é devido, principalmente, as excelentes propriedades que ele apresenta, como por exemplo: boa condutividade térmica e elétrica, boa transparência, ótima resistência mecânica, uma ampla área de superfície (teoricamente, por volta de $2630 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ para grafeno de camada única), alta flexibilidade, boa impermeabilidade óptica e biocompatibilidade, dentre outras [86].

Devido a essas propriedades, o grafeno tem sido muito promissor para diversas aplicações em áreas como na eletroquímica (sensores e biosensores) [87, 88], na área da eletrônica na produção de materiais como transistores, telas *touch screen* e aparelhos flexíveis [89, 90] e na área da fotônica para fabricação de fotodetectores e moduladores ópticos [91, 92].

Diversos métodos são relatados na literatura para obtenção do grafeno, entretanto, nenhum deles possibilita sua produção em larga escala industrial e nem com grau de pureza adequado [93], o que tem limitado sua aplicação em diversas outras áreas. Entre os métodos usados na obtenção desse material podemos destacar o método da clivagem mecânica.

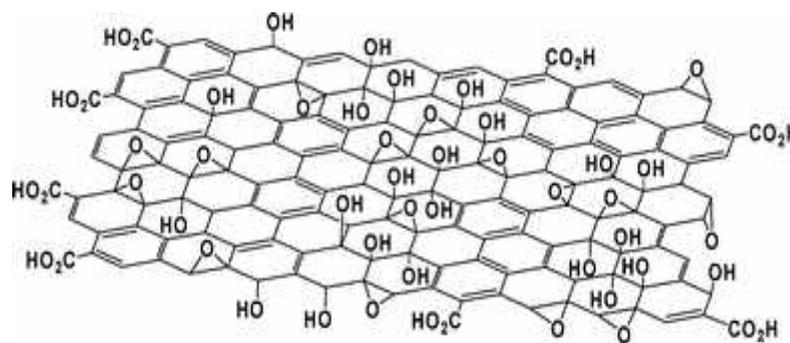
Este método, usado pelos pesquisadores André Geim e Konstantin Novoselov, consiste na clivagem repetitiva de camadas de grafite pirolítico altamente orientado (HOPG, do inglês *Highly Oriented Pyrolytic Graphite*), usando uma fita adesiva e que depois é colocada em cima de um substrato de óxido de silício (SiO_2) para assim ser observado o grafeno. A vantagem deste método é a obtenção do grafeno com elevada qualidade cristalina [94]. Além desse método, outros como a deposição de vapor químico (CVD), esfoliação química em fase líquida e crescimento de grafeno epitaxial em SiC são comumente relatados na literatura [95].

Para contornar essa problemática referente a produção do grafeno puro, tem se usado derivados do grafeno, como o óxido de grafeno (GO, do inglês *graphene oxide*) e o óxido de grafeno reduzido (rGO, do inglês *reduced graphene oxide*), como alternativa para aplicações variadas principalmente em sensores eletroquímicos usando o grafeno como suporte [96].

O GO é um material bidimensional obtido do grafeno pela adição de grupos funcionais de oxigênio na estrutura, alterando dessa forma o estado de hibridização sp^2 original do grafeno para o estado de hibridização sp^3 . A presença desses grupos funcionais se revela como defeitos e são localizados no plano basal da estrutura modificando, dessa forma, as propriedades elétricas desse material. Além disso, a presença desses grupos funcionais confere ao GO hidrofiliabilidade, o que permite ser usado em soluções coloidais [97, 98].

Entre os diversos métodos usados para obtenção do GO, o mais utilizado é o método de Hummers. Esse método, consiste numa mistura de flocos de grafite com permanganato de potássio (KMnO_4) e ácido sulfúrico (H_2SO_4) durante um determinado intervalo de tempo [99]. A presença do ácido sulfúrico auxilia na esfoliação do grafite, que atua como agente de intercalação nas suas camadas facilitando dessa forma a ação do agente oxidante [100]. Em relação à estrutura desse material, o modelo mais aceito atualmente é o de Lerf-Klinowski, ilustrado na **Figura 8**, onde é considerado a presença no plano basal das folhas de grafeno grupos hidroxila e epóxi [101].

Figura 8 - Modelo de Lerf-Klinowski para a estrutura do grafeno [102]



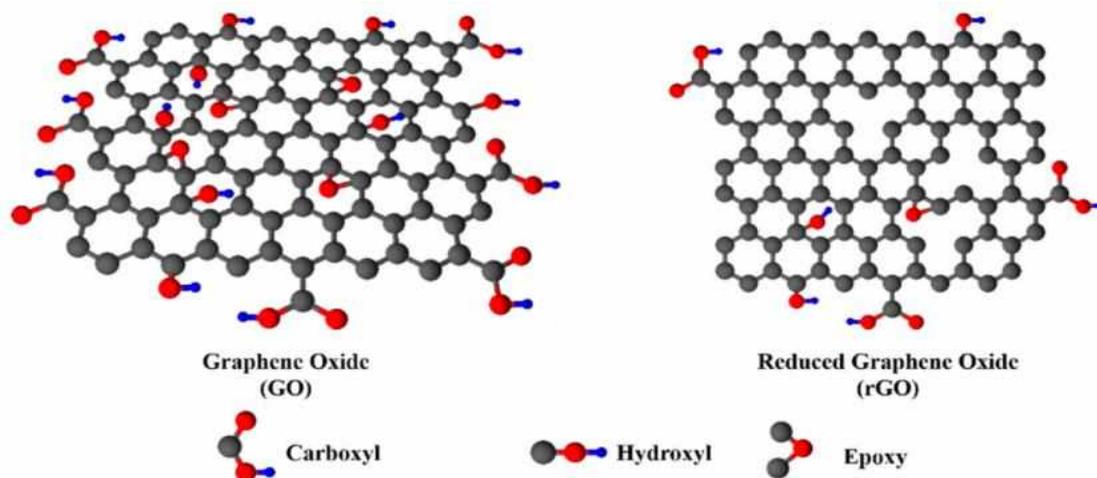
No que tange as aplicações desse material, ele apresenta vantagens sobre o grafeno pelo fato de ser quimicamente funcionalizado com muita facilidade. Os grupos funcionais (epóxis) presentes na sua estrutura podem ser facilmente atacados por grupos aminas (-NH₂), possibilitando dessa forma imobilizar covalentemente pequenas moléculas orgânicas, polímeros e até biomoléculas que apresentam esse grupo funcional [103]. Uma outra aplicação desse material é relacionada com a área da saúde, na qual o GO pode ser usado como purificador de água [104, 105]. Além disso, ele pode ser aplicado como biosensor e antibactericida [106].

Na área da energia, o GO tem sido testado e apresentado bons resultados no armazenamento de energia e na produção de baterias mais eficientes [107]. E por fim, a utilização desse material como intermediário na obtenção de rGO. Em processos de produção de grafeno que permita defeitos na estrutura, o rGO tem sido uma alternativa bastante viável.

No entanto, a maior desvantagem apresentada pelo óxido de grafeno, é a sua resistência elétrica o que dificulta sua utilização na modificação de eletrodos. Devido sua estrutura apresentar grupos funcionais oxigenados que lhe confere uma hibridização sp³, isso faz com que ele seja um isolante. Para contornar essa situação é feita a redução do óxido de grafeno para óxido de grafeno reduzido [108].

O óxido de grafeno reduzido (rGO), é um material obtido após a redução de grande parte dos grupos funcionais oxigenados presentes na estrutura do GO. É uma das formas comumente empregadas quando se deseja obter grafeno, porque permite dessa forma recuperar características, estrutura e desempenho do material primitivo [109]. Além de ser bastante viável para produção em larga escala e com baixo custo [110]. A **figura 9**, mostra a estrutura do rGO após redução do GO.

Figura 9 - Representação das estruturas do GO e rGO [110].



A obtenção do rGO, pode ocorrer por três métodos: redução térmica, redução química e redução eletroquímica [111], sendo esta última utilizada neste trabalho. O método eletroquímico consiste na aplicação de um potencial no óxido de grafeno por meio das técnicas voltamétricas ou amperométricas. A vantagem apresentada por este último método consiste em elevadas razões C/O para o óxido de grafeno reduzido, sendo interessante devido a simplicidade do método, que o torna promissor para a redução eficiente do óxido de grafeno [112].

Em relação a aplicação desse material, a presença de defeitos em sua estrutura devido aos grupos funcionais remanescentes, faz com que ele seja muito promissor para aplicação como sensor de gás, uma vez que a presença desses defeitos seja um fator favorável para adsorção de gás [110]. Diversos outros estudos com aplicação do rGO são relatados na literatura, como por exemplo, na utilização de substrato para modificação de eletrodos. Nesse aspecto o processo de transferência de elétrons melhora bastante e vem sendo muito trabalhado nos últimos anos, pois possibilita a construção de sensores eletroquímicos [113, 114, 115].

Além disso, tem sido reportado na literatura trabalhos sobre nanocompósitos a base de derivados de grafeno e azul da Prússia (AP). A combinação das propriedades desses materiais tem sido uma boa alternativa na fabricação de biossensores de glicose e sensores de H_2O_2 , uma vez que os derivados do grafeno podem melhorar a transferência eletrônica favorecendo assim o AP a catalisar a redução de H_2O_2 [116, 117].

1.7 Azul da Prússia

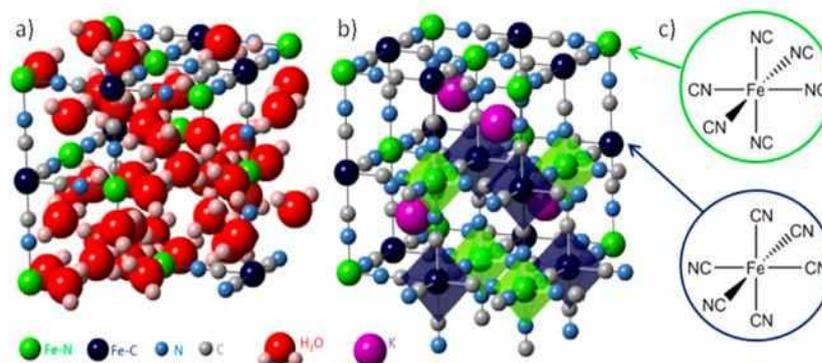
O azul da Prússia (PB, do inglês *Prussian blue*) também denominado de hexacianoferrato (II) de ferro (III), cuja fórmula mínima é $\text{Fe}^{\text{III}}_4[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ (n 14 a 16) [118] é um composto inorgânico que foi descoberto de forma involuntária em 1704 pelo alemão e fabricante de tintas Heinrich Diesbach [119], quando ele trabalhava em seu laboratório na cidade de Berlim. Devido ao seu alto valor comercial, o método de obtenção desse composto ficou em sigilo por durante 20 anos, sendo revelado somente em 1724, quando foi descrito e publicado por John Woodward [120, 121].

Os primeiros estudos sobre a estrutura do AP foram propostos com base em difração de raios-X (DRX), revelando uma estrutura básica constituída por íons férricos Fe^{3+} e Fe^{2+} , que se intercalam em uma rede cristalina cúbica de face centrada por meio de ligantes cianetos ($\text{C}\equiv\text{N}$) em ponte [122, 123]. Dessa forma, a rede cristalina é formada de tal maneira que cada íon Fe^{3+} é coordenado octaedricamente por átomos de nitrogênio e os íons Fe^{2+} ligam-se aos átomos de carbono. A estrutura ainda contém sítios vazios que são ocupados por moléculas de água, tendo suas dimensões da célula cúbica de 10,2 Å e cavidade tipo zeolítica de 3,2 Å [118, 122].

De acordo com Herren *et al*, as águas que ocupam os sítios vazios na estrutura do AP podem ser de dois tipos: água coordenada, que preenche os locais vazios de nitrogênio e a água não coordenada, que ocupa os sítios intersticiais vagos da célula unitária do AP [124].

Ainda em relação aos primeiros estudos sobre a estrutura cristalina desse material, foram propostas duas estequiometrias, uma “insolúvel” de fórmula $\text{Fe}^{\text{III}}_4[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]_3$ e outra solúvel, de fórmula $\text{KFe}^{\text{III}}[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]$. No entanto, essa classificação não possui conotação de solubilidade, pois ambas as estruturas são insolúveis com semelhança na constante de solubilidade ($\sim K_{ps} = 10^{-40}$) [125]. A **Figura 10** mostra as duas estruturas “solúvel” e “insolúvel” para o AP.

Figura 10 - Estruturas cristalinas do AP "insolúvel" (a) e "solúvel" (b) [126].



Na literatura, alguns métodos de obtenção do AP são relatados. Neste trabalho, o método utilizado foi o eletroquímico que consiste na aplicação de um potencial em uma solução de ferricianeto de potássio e cloreto de ferro (III) proporcionando a dissociação do mesmo em íons férrico e cianeto, em meio ácido. A participação de um elétron proveniente do eletrodo é necessária para a redução do íon férrico ao ferroso para se coordenar ao ferricianeto e, assim, obter o AP. Porém, o mesmo elétron é capaz de reduzir o íon ferricianeto ao ferrocianeto que se coordena ao Fe^{3+} dissociado para formar o AP [127]

O AP apresenta três estados de oxidação, sendo diferenciados pela sua coloração. A presença de dois centros metálicos de Fe (II) indica redução do AP em BP (branco da Prússia) de fórmula $\text{K}_2\text{Fe}^{\text{II}}[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]$ e nesse caso é incolor. Já a presença de apenas centros metálicos de Fe (III), promove oxidação do AP em VB (verde de Berlim) de fórmula $\text{Fe}^{\text{III}}[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6] + \text{K}^+ + \text{e}^-$, e coloração verde. Se os centros metálicos apresentarem valência mista Fe (II) e Fe (III) tem-se uma coloração azul bastante intensa (azul da Prússia) de fórmula $\text{KFe}^{\text{III}}[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]$ [128].

Após os estudos desenvolvidos por Nerff, que demonstrou camadas eletroativas eram formadas após deposição eletroquímica do AP na superfície de um eletrodo [123], a gama de aplicações envolvendo esse material cresceu consideravelmente, possibilitando o desenvolvimento de diversos dispositivos eletroquímicos como células fotovoltaicas [129], biosensores [130] e sensores [131], sendo esta última, sua maior aplicação devido sua capacidade eletrocatalítica na redução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), onde o AP é comumente chamado de peroxidase artificial [132].

O trabalho de Karyakin e col. em 1994 [133], demonstrando alta seletividade para redução de H_2O_2 após modificar um eletrodo de carbono vítreo com filme do AP, ampliou os estudos com esse material e seus análogos como possíveis sensores: na determinação

de íons persulfato [134], ácido ascórbico [135], oxidação da hidrazina [136] pesticidas [137], além de outras espécies.

Entretanto, uma das limitações quanto ao uso do AP envolve sua baixa estabilidade e condutividade. Porém, uma rota que tem sido utilizada para contornar essa problemática é a preparação de nanocompósitos contendo materiais de carbono, por exemplo. É relatado na literatura que esses materiais têm sido uma alternativa viável para aumentar a estabilidade e condução elétrica do AP [138, 139].

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral desse trabalho consiste na determinação de 4AF em amostras de cocaína usando um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanocompósito de óxido de grafeno reduzido e azul da Prússia para possível aplicação como sensor eletroquímico.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Síntese eletroquímica do óxido de grafeno reduzido;
- ✓ Síntese eletroquímica dos filmes rGO/FeO_x e FeO_x;
- ✓ Utilização dos filmes rGO/FeO_x e FeO_x para obtenção por via eletroquímica do nanocompósito rGO/FeHCF e do hexacianoferrato de ferro FeHCF;
- ✓ Caracterização dos materiais sintetizados por meio de técnicas espectroscópicas e microscópicas como: Espectroscopia Raman, Espectroscopia na região do Infravermelho, Espectroscopia de raios X por dispersão em energia e microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- ✓ Aplicação do nanocompósito como sensor eletroquímico usando a técnica BIA-AD para detecção da 4AF em amostras de cocaína.
- ✓ Comparação entre os eletrodos rGO/FeHCF e GC para a determinação de 4AF por meio de curva analítica.

3 METODOLOGIA

3.1 Reagentes e Soluções

Todas as soluções foram preparadas em água deionizada ($R \geq 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) obtida por meio do sistema de purificação Milli-Q da Millipore (Bedford, MA, EUA), sob temperatura ambiente e sem remoção do oxigênio dissolvido. Os reagentes, suas purezas e devidas origens estão exibidas na **Tabela 4**.

Tabela 3 - Reagentes utilizados neste trabalho.

Reagentes	Fórmula química	Procedência	Pureza
Óxido de grafeno		CN Shanghai	90%
Sulfato de sódio anidro	Na_2SO_4	Biotec	99%
Sulfato de ferro II heptahidratado	FeSO_4	Merck	99%
Cloreto de Potássio	KCl	Isofar	99%
Ácido clorídrico	HCl	Neon	37%
Ferricianeto de Potássio	$\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$	Panreac	99%
4-aminofenazona	$\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}$	Alpha Cesar	98%
Fenacetina	$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}_2$	Sigma-Aldrich	97%
Levamisol	$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{S}$	Sigma-Aldrich	99%
Benzocaína	$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_2$	Sigma-Aldrich	99%
Cafeína	$\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2$	Synth	99%
Ácido Bórico	H_3BO_3	Panreac	99%
Glicose	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	Biotécnica	99%
Procaína	$\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2$	Sigma-Aldrich	97%
Cocaína	$\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{NO}_4$	Polícia Federal	98%

3.2 Instrumentação

3.2.1 Medidas Eletroquímicas

Todas as medidas eletroquímicas deste trabalho foram obtidas utilizando um potenciostato da marca Metrohm DropSens modelo μStat 300 e controlado pelo software DropView 8400. A célula eletroquímica foi constituída em um sistema de três eletrodos, sendo carbono vítreo (GC, do inglês glassy carbon), Ag/AgCl/KCl_(sat.) e um fio de platina usados como eletrodos de trabalho, referência e auxiliar, respectivamente. A técnica de

voltametria cíclica (CV) foi utilizada para a síntese, modificação e teste de estabilidade do pH dos materiais envolvidos. A técnica de amperometria foi aplicada na análise quantitativa da molécula da 4AF. Todos os experimentos realizados em temperatura ambiente.

3.2.2 Espectroscopia Raman

Durante a incidência de radiação em um meio transparente, frações do feixe incidido são espalhadas em todas as direções. O espectro Raman é obtido ao irradiar um laser de radiação monocromática visível na amostra. Durante a irradiação, o espectro espalhado é medido a um ângulo de 90°. Esta técnica de caracterização não é destrutiva. [140].

Os espectros Raman foram adquiridos usando uma potência de incidência de 10% de um laser de íons de Ar de comprimento de onda de 633 nm. O equipamento usado foi o microscópio LabRAM HR Evolution da HORIBA (Japão).

3.2.3 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

Na espectroscopia de infravermelho no modo ATR, o feixe de radiação passa pelo cristal de ATR, que é um meio mais denso, para a amostra, que é um meio menos denso, onde ocorre uma reflexão. Este cristal proporciona uma análise direta e não destrutiva, sem necessidade de preparo de amostra. [140].

A obtenção de espectros de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foi realizada no equipamento Frontier MIR/FIR da PerkinElmer (EUA) utilizando o acessório de refletância total atenuada (ATR – do inglês Attenuated total reflectance) da Pike Technologies (EUA).

3.2.4 Microscopia eletrônica de varredura

A técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV), consiste na utilização de um feixe de elétrons gerado de um filamento ou cristal com a finalidade de explorar detalhadamente a superfície de uma amostra transmitindo o sinal detectado a uma tela catódica em que a varredura está sincronizada perfeitamente com o feixe incidente [141]. Um bom desempenho da lente objetiva e um diâmetro reduzido proporciona uma boa resolução.

A interação do feixe de elétrons com a amostra resulta na liberação de elétrons (secundários, espalhados, dentre outros), raios X característicos e fótons que são

coletados por detectores gerando um sinal na qual é formada a imagem, sendo os elétrons secundários os de maior interesse em virtude da melhor resolução e da observação da variação de relevo da superfície analisada [142].

As imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram obtidas a partir de microscópio Vega 3 da Tescan (República Tcheca) operado em 20 kV com detector de elétrons secundários.

3.2.5 Espectroscopia de raio X por dispersão em energia

A espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS) é uma técnica de microanálise que permite a ampliação e visualização de amostras em áreas específicas. Ela é baseada na detecção de raios X emitidos por amostras durante as transições eletrônicas decorrentes de um feixe de elétrons. A vantagem do EDS é o fornecimento rápido nas análises qualitativas e semiquantitativas gerando em poucos segundos um espectro de raios X variando entre zero a dezenas de quilo elétron – volts [143, 144].

Os espectros de raios X por energia dispersiva (EDS) foram adquiridos em um equipamento modelo INCA X-ACT Oxford acoplado a um microscópio Vega 3 TESCAN operado a 20 kV usando um detector de elétrons secundários.

3.3 Preparação dos materiais

Na realização das medidas eletroquímicas, os filmes dos materiais em estudo foram preparados sobre a superfície de um eletrodo de GC. Nos estudos de caracterização usando as técnicas de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier, espectroscopia Raman, microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de raios X por dispersão em energia, os filmes foram preparados sobre uma superfície de óxido de ouro.

3.3.1 Óxido de grafeno

A produção do filme de GO foi realizada pelo gotejamento (*drop-casting*) de 10 μL da dispersão precursora do filme de GO que continha 1,0 mg mL^{-1} de GO e 0,05 mol L^{-1} de Na_2HPO_4 (pH= 3,0). O material foi seco à temperatura ambiente por 24 h.

3.3.2 Óxido de grafeno reduzido

A obtenção do óxido de grafeno reduzido (rGO) transcorreu por voltametria cíclica (10 ciclos) em uma faixa de potencial de -0,75 a -1,5V, com velocidade de 10 mV

s^{-1} em uma dispersão contendo $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ de GO e $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de Na_2SO_4 ($\text{pH} = 3$) como eletrólito de suporte, sob agitação magnética. Todas essas condições envolvidas para a síntese de todos os materiais tiveram como base trabalhos desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa.

3.3.3 Síntese do óxido de grafeno reduzido e óxido de ferro

A formação do precursor rGO/FeO_x se deu nas mesmas condições do item 3.3.2 com acréscimo de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de FeSO_4 como precursor das espécies de ferro. Após esse processo, o eletrodo modificado passou por uma lavagem por imersão em água destilada e posterior secagem de 10 minutos em ambiente local.

3.3.4 Síntese do óxido de grafeno reduzido e hexacianoferrato de ferro

A obtenção do filme de óxido de grafeno reduzido e hexacianoferrato de ferro se deu com a imersão do eletrodo modificado no precursor rGO/FeO_x em solução de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ contendo $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl (ajustado com HCl $\text{pH} = 2$), como eletrólito de suporte. A técnica usada foi voltametria cíclica (6 ciclos seguidos a 100 mV s^{-1} num intervalo de potencial de $-0,2$ a $+0,6 \text{ V}$).

3.3.5 Hexacianoferrato de óxido de ferro

A preparação desse material se deu de forma semelhante ao nanocompósito rGO/FeHCF. O filme precursor de FeO_x foi preparado sem a presença do rGO usando uma solução contendo $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de Na_2SO_4 e $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de FeO_x sob agitação magnética e voltametria cíclica (10 ciclos), de $-0,75$ a $-1,5\text{V}$ a uma velocidade de 10 mV s^{-1} . Após secagem do eletrodo modificado, ele foi submetido a 6 voltamogramas cíclicos de $-0,2$ a $0,6\text{V}$, à 100 mV s^{-1} em solução de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl (ajustado com HCl $\text{pH} = 2$) para obtenção do filme de FeHCF. A **Tabela 3** apresenta um resumo das preparações dos diferentes materiais citados nesta seção.

Tabela 4 - Resumo da preparação dos materiais.

Material	Eletrodo	Composição do precursor	Parâmetros voltamétricos
GO	FTO	0,05 mol L ⁻¹ H ₂ SO ₄ 1,0 mg mL ⁻¹ GO	-----
rGO	GC	0,05 mol L ⁻¹ Na ₂ SO ₄ 1,0 mg mL ⁻¹ GO	10 ciclos -0,75 a -1,5 V 10 mV s ⁻¹
rGO/FeOx	GC	0,05 mol L ⁻¹ Na ₂ SO ₄ 1,0 mg mL ⁻¹ GO 1,0 mmol L ⁻¹ FeOx	10 ciclos -0,75 a -1,5 V 10 mV s ⁻¹
rGO/FeHCF	GV/rGO/FeOx	0,1 mol L ⁻¹ KCl 1,0 mmol L ⁻¹ K ₃ [Fe(CN) ₆]	6 ciclos -0,2 a 0,6 V 100 mV s ⁻¹
FeHCF	GC/ FeOx	0,1 mol L ⁻¹ KCl 1,0 mmol L ⁻¹ K ₃ [Fe(CN) ₆]	6 ciclos -0,2 a 0,6 V 100 mV s ⁻¹

GO – (do inglês, graphene oxide), **rGO** - (do inglês, reduced graphene oxide), **rGO/FeOx**– óxido de grafeno reduzido/óxido de ferro, **rGO/FeHCF** – óxido de grafeno reduzido/hexacianoferrato de ferro, **FeHCF** – hexacianoferrato de ferro (azul da Prússia), **GC** – glass carbon

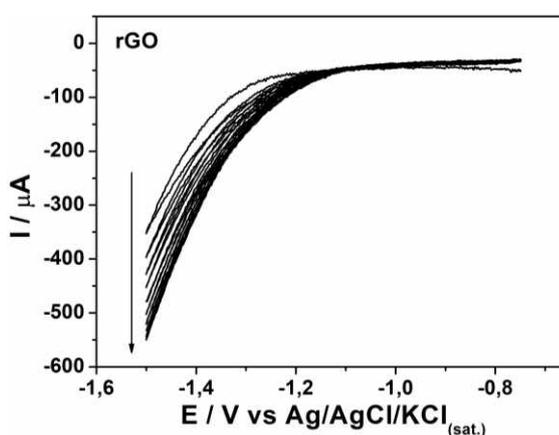
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados serão apresentados em três partes: a primeira referente à síntese dos materiais (rGO, rGO/Fe, Fe). A segunda parte corresponde as caracterizações estruturais, espectroscópicas, microscópica e elemental desses materiais. A terceira parte é referente ao estudo de determinação de 4AF usando o eletrodo de GC modificado com um filme de rGO/FeHCF acoplado a um sistema BIA com detecção amperométrica.

4.1 Síntese eletroquímica do rGO

A **Figura 11** mostra 10 voltamogramas cíclicos em uma dispersão (10mL) contendo $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ de OG em $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de Na_2SO_4 , numa velocidade de varredura de 10 mV s^{-1} . A concentração de OG usada neste trabalho foi semelhante à de um trabalho relatado na literatura [145]. A formação do rGO sobre a superfície do eletrodo de trabalho pode ser observado pelo aumento da corrente catódica em torno de $-1,11 \text{ V}$, ocasionado pela redução dos grupos funcionais presentes na estrutura do OG em potenciais negativos [146].

Figura 11 - CVs para a eletrodeposição de rGO em uma dispersão precursora de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ de OG em eletrólito de suporte contendo $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de Na_2SO_4 , sobre a superfície do GCE, utilizando velocidade de varredura 10 mV s^{-1} .

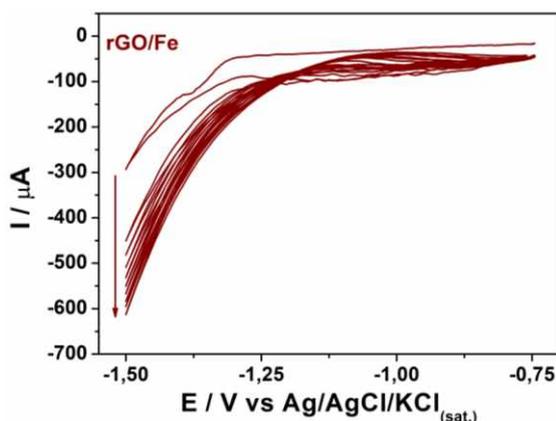


4.2 Síntese eletroquímica do rGO/Fe

Na **Figura 12** são apresentados os voltamogramas cíclicos da eletrorredução simultânea de uma solução precursora contendo $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ do OG e $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ do Fe_2SO_4 em eletrólito de suporte ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de Na_2SO_4). Podemos notar que os íons Fe^+ são reduzidos concomitantemente com as folhas de OG. O aumento na intensidade de

corrente a cada ciclagem estar relacionado com a deposição de material condutor (Fe) entre as folhas do OG na superfície do eletrodo de trabalho a cada varredura [147]

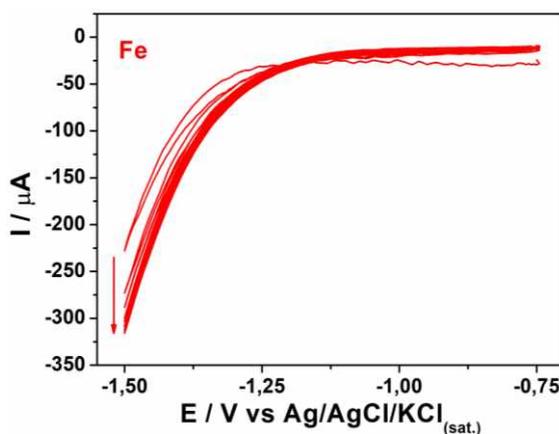
Figura 12 - CVs para a eletrodeposição de rGO/Fe em uma dispersão precursora de 1,0 mg mL⁻¹ de OG, 1,0 mmol L⁻¹ de FeSO₄, em eletrólito de suporte contendo 0,05 mol L⁻¹ de Na₂SO₄, sobre a superfície do GCE, utilizando velocidade de varredura 10 mV s⁻¹.



4.3 Síntese eletroquímica do Fe

A **Figura 13** mostra 10 voltamogramas cíclicos referente a síntese eletroquímica das nanopartículas de ferro. A síntese desse material ocorreu sem a presença do material de carbono em uma solução precursora 1,0 mmol L⁻¹ de FeSO₄ e 0,05 mol L⁻¹ de Na₂SO₄ (eletrólito de suporte). O aumento da corrente a cada ciclo estar associado a dissolução química dos íons Fe²⁺ e Fe³⁺ originados do óxido metálico de ferro [148].

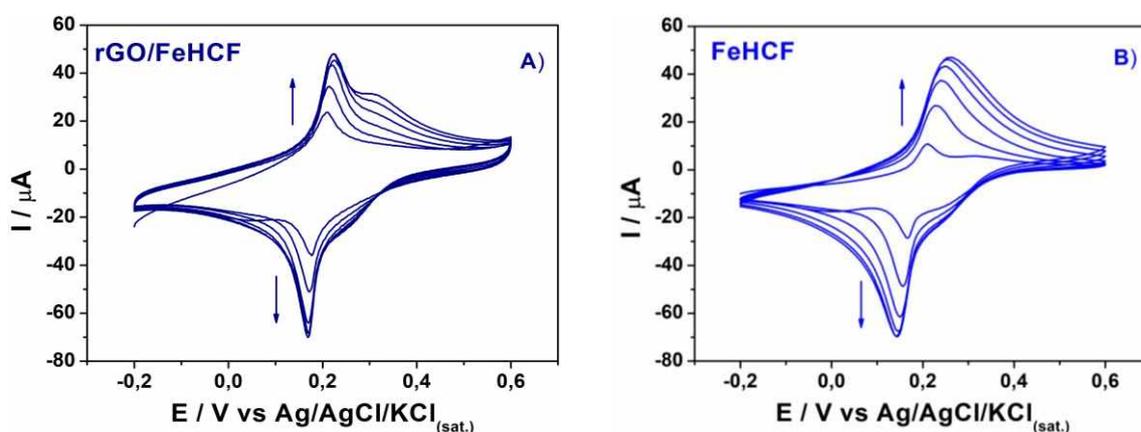
Figura 13 - CVs para a eletrodeposição de Fe em uma dispersão precursora de 1,0 mmol L⁻¹ de FeSO₄, em eletrólito de suporte contendo 0,05 mol L⁻¹ de Na₂SO₄, sobre a superfície do GCE, utilizando velocidade de varredura 10 mV s⁻¹



4.4 Modificação dos materiais (rGO/Fe, Fe)

Após a preparação dos filmes controle, eles foram submetidos à modificação para obtenção dos materiais rGO/FeHCF (**Fig. 14-a**) e FeHCF (**Fig. 14-b**). Essa modificação ocorreu através de 6 voltamogramas cíclicos seguidos numa janela de potencial de -0,2 a 0,6 V e velocidade de 100 mVs^{-1} , em uma solução contendo $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl (ajustado com HCl pH = 2).

Figura 14 - CVs mostrando a formação do rGO/FeHCF (a) e FeHCF (b) em $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Eletrólito de suporte: $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl (pH = 2, ajustado com HCl); 6 ciclos de -0,2 a 0,6 V, à 100 mV s^{-1} .

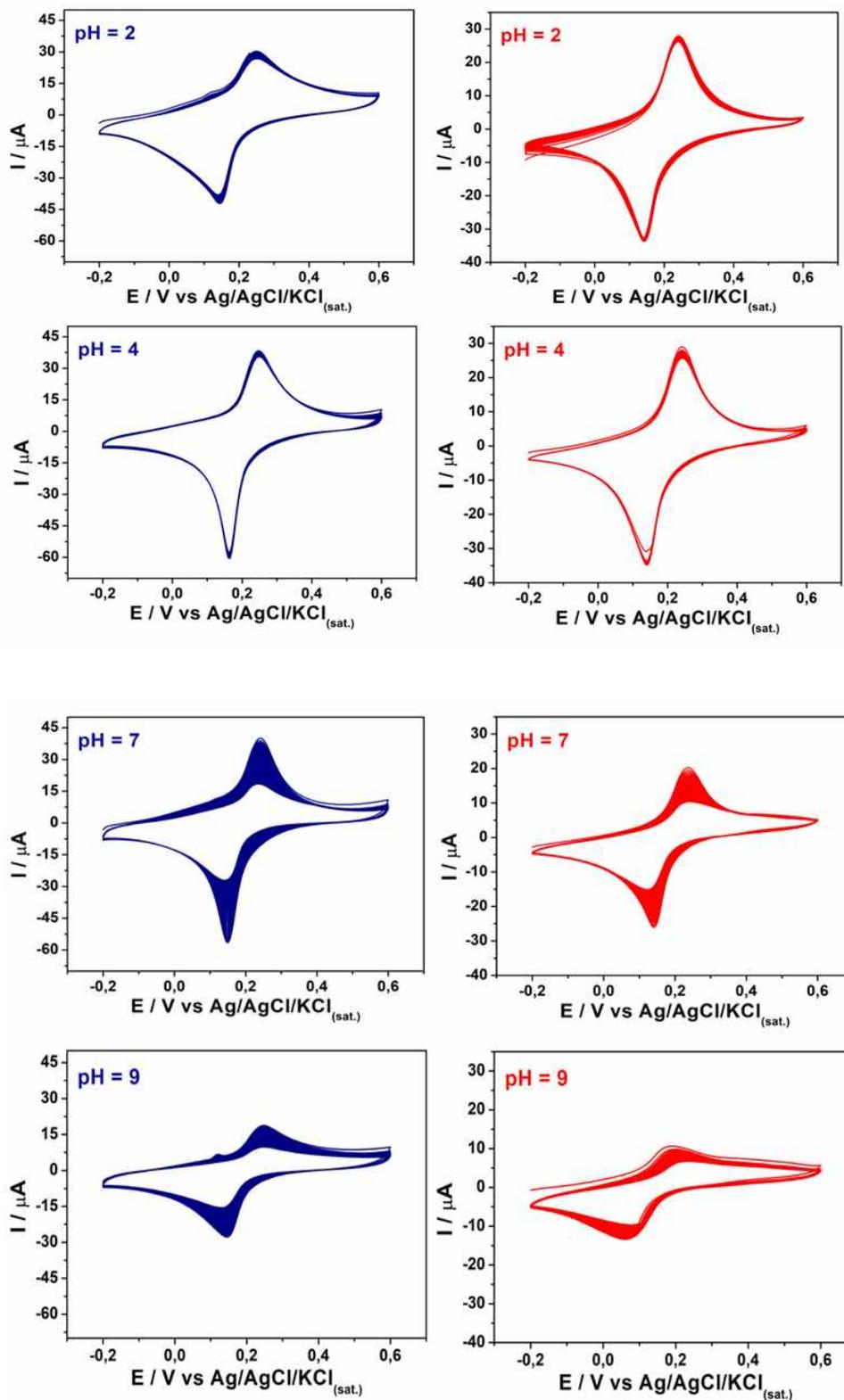


Nos CVs das duas figuras (**13a** e **13b**) é observado à presença de um par de picos redox em torno de +0,20/+0,16 V. Esse primeiro par de picos é referente ao processo de conversão do branco da Prússia (Fe(II)/Fe(II)) em azul da Prússia (AP) (Fe(II)/Fe(III)). Além disso, um aumento na intensidade de corrente anódica e catódica é observado a cada novo CV demonstrando a formação do filme de AP na superfície do eletrodo [149].

4.5 Estudo do pH sobre os eletrodos modificados rGO/FeHCF e FeHCF

Após a formação dos filmes sobre a superfície do eletrodo de GCE, a avaliação da estabilidade eletroquímica dos filmes foi feita. Esse estudo é um fator determinante para aplicação em estudos analíticos. A avaliação ocorreu medindo-se a intensidade de corrente durante 50 CVs sucessivos frente a 4 valores de pH (2, 4, 7 e 9), em uma solução contendo $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ de KCl (correções com HCl e KOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) a velocidade de 100 mV s^{-1} em um intervalo de potencial de -0,2 V a +0,6 V, com os eletrodos de rGO/FeHCF e FeHCF, como pode ser observado na **Figura 15** abaixo.

Figura 15 - Teste de estabilidade dos eletrodos modificados com rGO/FeHCF (linha azul) e FeHCF (linha vermelha) em soluções com diferentes pHs (2,0; 4,0; 7,0; 9,0) ajustado com HCl e NaOH. Eletrólito de suporte, 0,1 mol L⁻¹ de KCl, dados da CV (-0,2 a 0,6 V, à 100 mVs⁻¹).



De acordo com a **Figura 15**, em meio ácido (pH 2 e 4), a sensibilidade e estabilidade foram um pouco melhores. Esse resultado é de acordo com o observado em outros hexacianoferratos, devido que em meio ácido é favorecido a conversão das espécies de hexacianoferrato em íons de Fe^{III} que estão fortemente solvatados liberando pequenas quantidades de cianeto de hidrogênio [150].

Em relação aos (pHs 7 e 9), podemos observar um decréscimo na intensidade de corrente. A estabilidade do filme é reduzida devido a hidrólise do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ e consequente formação de $\text{Fe}(\text{OH})_3$ [151]. A **Figura 16** mostra a variação da intensidade de corrente relativa dos filmes em questão e a **Tabela 3** traz a perda dessa corrente no pico anódico para ambos os eletrodos modificados.

Figura 16 - Variação da intensidade da corrente relativa no decorrer de 50 voltamogramas cíclicos em 0,1 mmol L⁻¹ de KCl para rGO/FeHCF e FeHCF

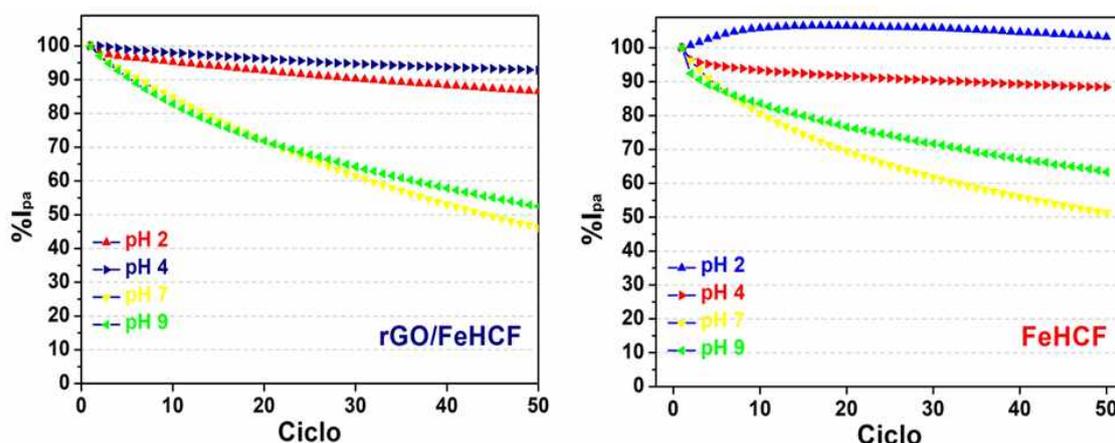


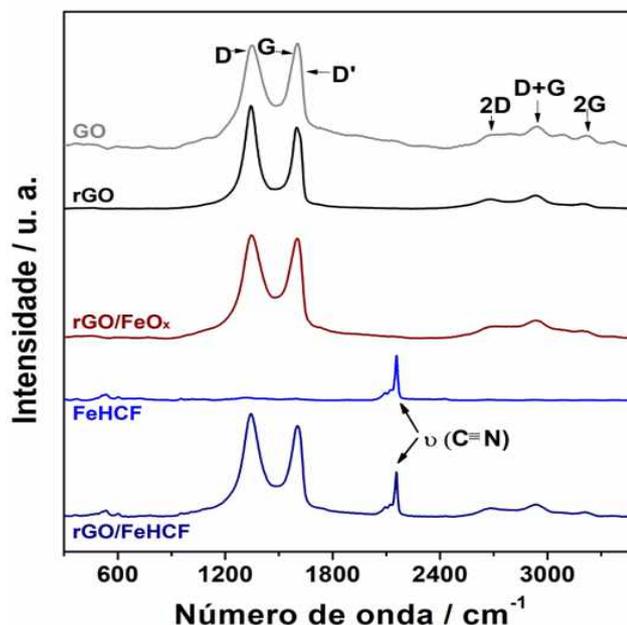
Tabela 5 - Variação da corrente relativa do pico de oxidação durante 50 CVs.

Material	Queda Ipa %			
	pH = 2	pH = 4	pH = 7	pH = 9
FeHCF	3,2	-11,6	-48,7	-36,7
rGO/FeHCF	-13,5	-7,2	-53,7	-47,5

4.6 Espectroscopia Raman

A **Figura 17** mostra os espectros e as bandas (D, G, D' e 2D) indicando a presença de material de carbono na estrutura dos filmes GO, rGO, rGO/FeOx e rGO/FeHCF

Figura 17 - Espectros Raman obtidos neste trabalho.



A banda D no filme de GO foi observada em 1350 cm^{-1} . Após redução desse material a rGO houve um deslocamento dessa banda para 1343 cm^{-1} . A diminuição no valor dessa banda é decorrente de uma menor quantidade de anéis aromáticos que são gerados por defeitos provenientes do processo de redução eletroquímica [152]. Já o deslocamento dessa banda para o valor de 1349 cm^{-1} para os filmes rGO/Fe e rGO/FeHCF é referente a transferência de carga entre as nanopartículas e o material de carbono [153].

O deslocamento da banda G observada em 1583 cm^{-1} no filme de GO para o valor de 1573 cm^{-1} após redução a rGO, se dar em virtude do encolhimento da espessura do plano carbonáceo fazendo com que aumente a interação interplanar. Isso ocorre devido a eliminação de grande parte dos grupos funcionais oxigenados presentes na estrutura do GO e consequente reestruturação da ligação sp^2 , entre os átomos de carbono após redução pelo método eletroquímico [154]. O aumento dessa banda nos filmes rGO/Fe e rGO/FeHCF é relacionado com a transferência de cargas entre as folhas do material de carbono e as nanopartículas metálicas [155].

A razão entre ID/IG permite nos dizer se uma amostra é mais defeituosa que a outra, ou seja, serve para estimar a desordem da estrutura cristalina dos materiais carbonáceos estudados. Essa razão pode ser feita tanto pela intensidade relativa quanto pela largura do pico, em que a primeira é relacionada com a distorção da rede, portanto associada a quantidade de defeitos e a segunda é relacionada aos anéis de carbono e as ligações sp^3 [152]. A **Tabela 7**, mostra as bandas discutidas e a razão entre as bandas ID e IG.

Tabela 6 - Resumo das bandas discutidas e a razão das entre as bandas ID e IG

Material	Banda D/cm ⁻¹	Banda G/cm ⁻¹	Razão ID/IG	$\nu(\text{C}\equiv\text{N})/\text{cm}^{-1}$
GO	1350	1583	2,36	-
rGO	1343	1573	2,88	-
rGO/FeO _x	1349	1593	3,39	-
FeHCF	-	-	-	2157
rGO/FeHCF	1349	1593	3,25	-

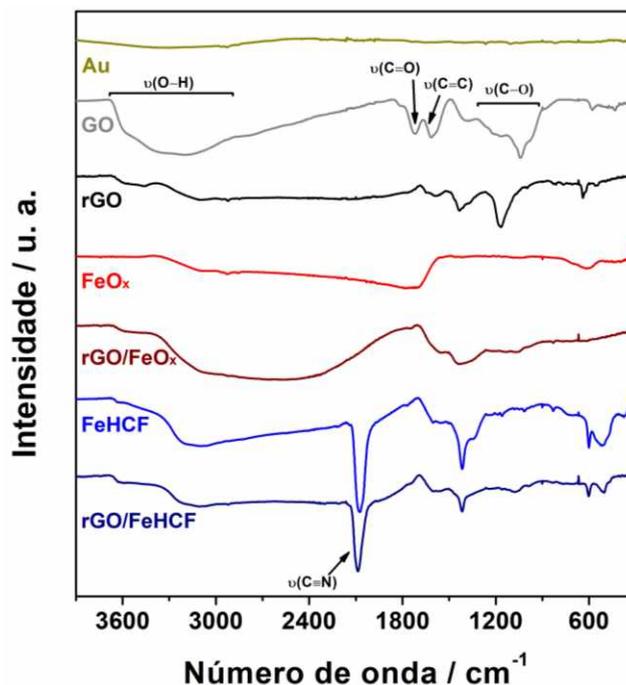
Uma banda com comprimento de onda em 2157 cm⁻¹ no filme rGO/FeHCF corresponde ao estiramento C≡N [156, 157]. Essa banda caracteriza a presença do PB no eletrodo modificado. Outras bandas de intensidade menor em torno de 600 – 350 cm⁻¹ e 500– 350 cm⁻¹ correspondem aos modos vibracionais Fe–C e Fe – C - N respectivamente [158] o que resulta em sucesso do processo na obtenção do nanocompósito.

4.7 *Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier*

A **Figura 18**, mostra os espectros obtidos dos materiais. Para o filme de GO, uma banda bastante intensa pode ser observada na região entre 2879 e 3675 cm⁻¹ e é atribuída as vibrações de estiramento do grupo OH. Nessa banda estariam superpostos grupos OH de álcoois, fenóis, ácidos carboxílicos e em grande parte água presente entre as folhas do material carbonáceo.

A presença de ácidos carboxílicos se dá pela observação de uma pequena banda em 1726 cm⁻¹ devido ao estiramento do grupo C=O. Uma banda em torno de 1637 cm⁻¹ corresponde a ligação C=C (domínio grafitico não oxidado). Já a banda presente em torno de 1043 cm⁻¹ caracteriza vibrações do grupo alcóxido C-O [159].

Figura 18 - Espectros de infravermelho com transformada de Fourier obtidos neste trabalho para os diferentes materiais estudados.



Ainda de acordo com a **Figura 18**, a intensidade das bandas dos espectros FT-IR do filme rGO é mitigado em comparação a intensidade das bandas do GO. Esse fato é consequência da oxidação dos grupos funcionais que estavam presentes na estrutura do GO, fazendo com que também fosse restaurada a rede π do material carbonáceo.

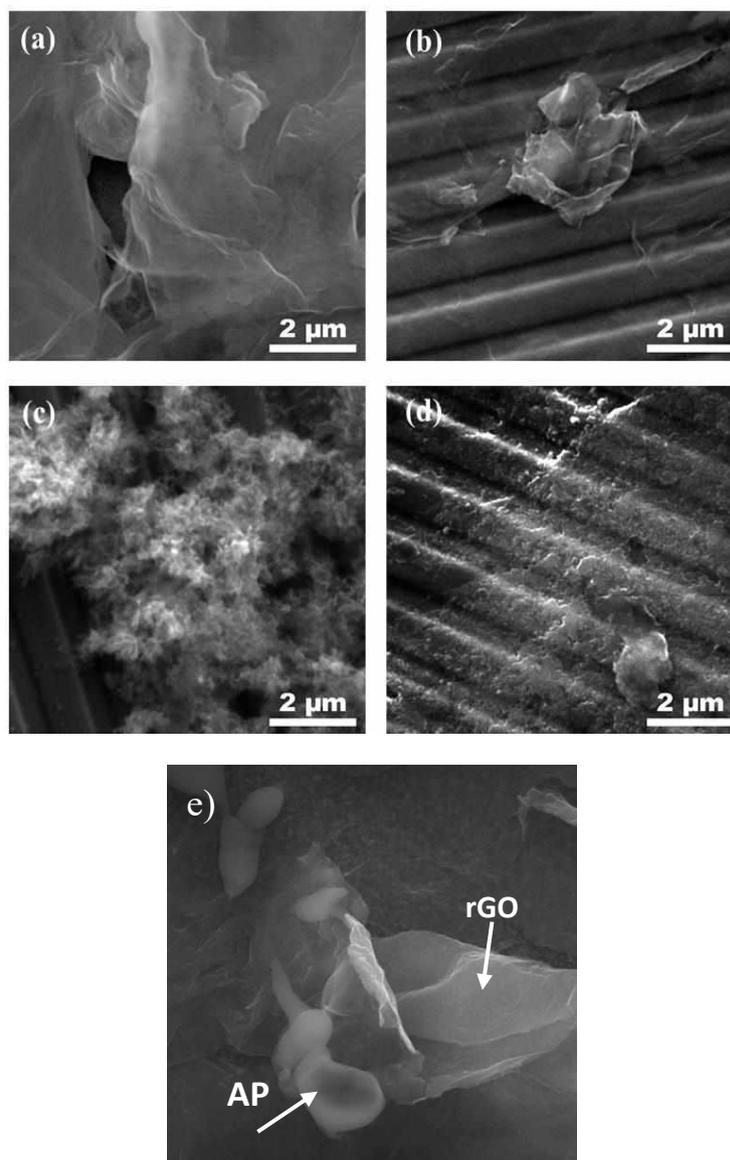
Uma banda de intensidade bastante forte pode ser observada em 2083 cm^{-1} nos espectros de infravermelho e é relacionada ao estiramento $\text{C}\equiv\text{N}$. A presença desse tipo de estiramento permite afirmar a formação do filme de PB. Outras bandas menores também podem ser observadas em torno de 610 e 497 cm^{-1} relacionadas à elongação da ligação Fe-N e as flexões das ligações Fe-C=N presentes no fragmento $\text{Fe}^{2+}\text{-CN-Fe}^{3+}$ reforçando claramente a formação do filme de PB [160, 161].

4.8 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A **Figura 19** mostra as imagens de MEV dos materiais utilizados neste trabalho. A morfologia do OG representada na **Figura 19-a**, apresenta folhas finas e enrugadas e com dobras na superfície ocasionadas pelo processo de esfoliação por ultrassom e interação entre os grupos funcionais oxigenados na estrutura do material. A **Figura 19-b** mostra folhas do rGO muito semelhante ao GO, mesmo com o processo de redução eletroquímica ainda restam grupos funcionais presentes na estrutura o que gera defeitos no material e leva também há um aumento na espessura das folhas [162, 163]

A formação do filme de PB, **Figura 19-c** mostra partículas de diversos tamanhos e formas, aglomeradas na superfície do eletrodo de ouro. A **Figura 19-d** mostra uma grande presença de nanopartículas do PB espalhadas por toda a extensão do rGO. Tanto a morfologia quanto o tamanho não são bem definidos, no entanto, a organização das nanopartículas do PB sobre a superfície do rGO e a interação entre eles pode diminuir a lixiviação do PB quando usado como sensor. As **Figuras 19-e e 19-f**, mostram as nanopartículas de PB sobre a superfície das nanofolhas de GO, onde foi utilizado o substrato de FTO (óxido de estanho dopado com flúor) para melhor visualização das nanopartículas de PB.

Figura 19 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura dos filmes de GO (a), rGO (b), FeHCF (c) e rGO/FeHCF (d). Filme de rGO/FeHCF sobre eletrodo de FTO (e) e (f).

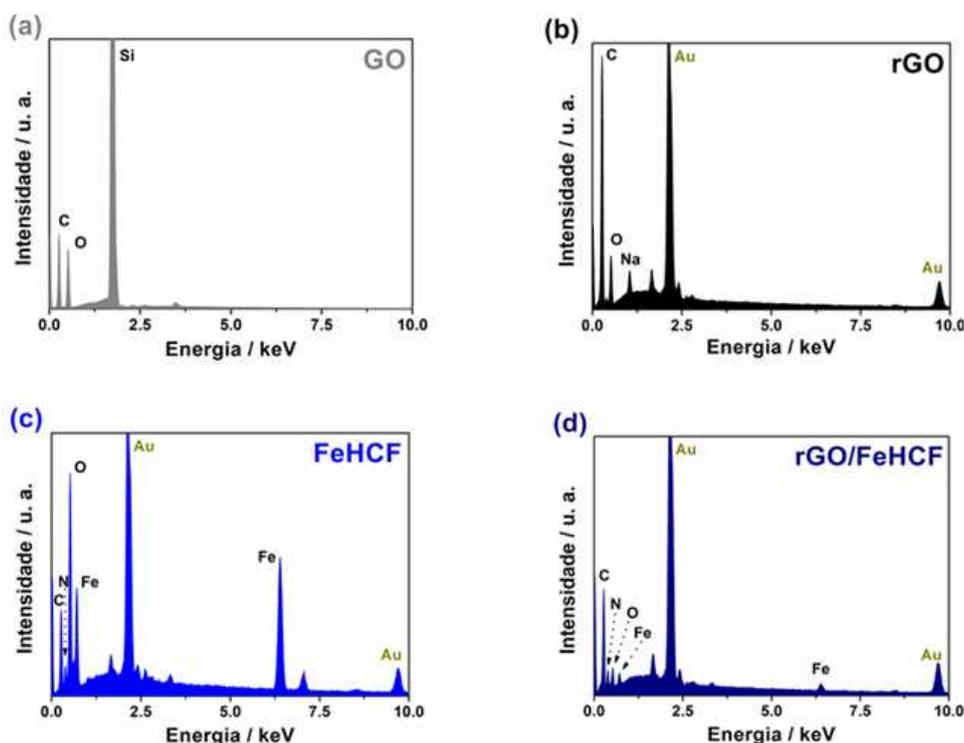


4.9 Espectroscopia de raio X por dispersão de energia (EDS)

A **Figura 20-a** mostra os picos dos elementos C (0,26 keV) e O (0,53 keV) caracterizando a presença do material carbonáceo na estrutura, um pico bastante intenso (1,73 keV) é relacionado a presença do silício (substrato) usado na análise, a **Figura 20-b** referente ao rGO além dos picos do elemento carbono (C) e do elemento (O) aparece um pico bastante intenso 2,13 keV que é referente ao elemento ouro (Au) usado como substrato na amostra analisada e também um outro pico 1,03 keV atribuído ao elemento sódio (Na) em consequência do eletrólito de suporte Na_2SO_4 usado em todas as preparações.

Além da análise qualitativa de cada amostra é interessante observar a diferença dos picos entre os espectros em relação aos elementos constituintes do material carbonáceo, uma vez que a razão C/O é maior para o espectro do rGO do que para o espectro GO demonstrando que houve redução eletroquímica de grupos oxigenados presentes na estrutura do GO. Além dos picos já citados anteriormente a presença de picos de ferro (Fe) nos espectros das **Figuras 20-c e 20-d** comprova a presença do AP junto com o material de carbono em que também é possível observar picos do elemento (C) nos espectros dos dois filmes

Figura 20 - Espectros de raio X por dispersão em energia dos filmes de GO (a), rGO (b), FeHCF (c) e rGO/FeHCF (d).

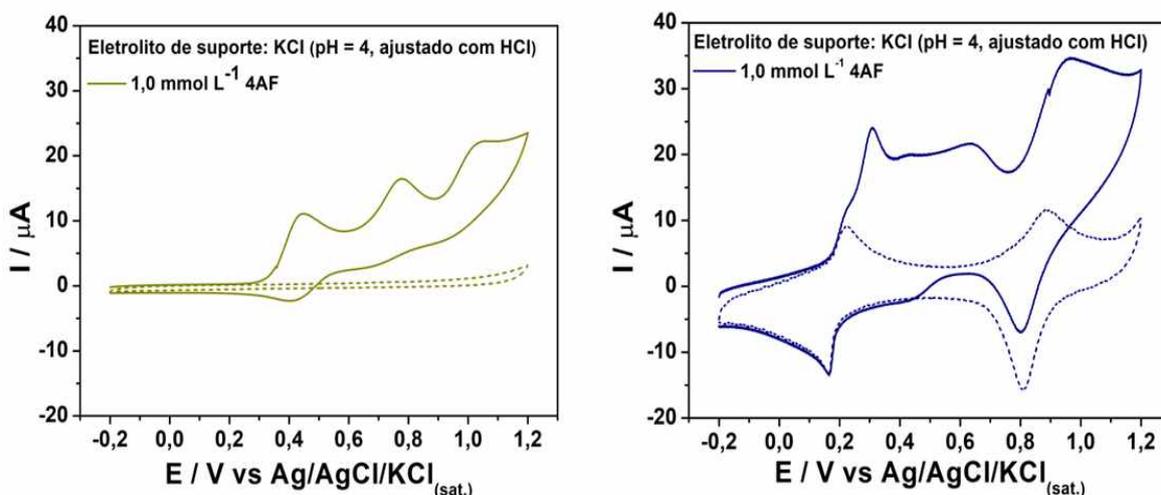


5.1 Estudo eletroquímico da 4-aminofenazona no eletrodo rGO/FeHCF

5.1.1 Comportamento voltamétrico

A determinação voltamétrica da 4-aminofenazona foi realizada no eletrodo modificado rGO/FeHCF, tendo em vista a boa estabilidade apresentada por este material, e foi inicialmente executada pela técnica de CV para verificar a região de potencial em que o analito apresenta atividade eletroquímica. Além do eletrodo modificado rGO/FeHCF foi usado o eletrodo de carbono vítreo GC para a mesma finalidade. A medida foi realizada em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl (pH = 4, ajustado com HCl) empregando-se uma janela de potencial de -0,2 V a 1,2 V e velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} na presença e ausência de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de 4AF. Os voltamogramas concernentes aos testes podem ser vistos nas **Figuras 21-a e 21-b**

Figura 21 - CVs obtidos com o eletrodo de GCE não modificado na ausência e presença de 4AF (A). CVs obtidos com o eletrodo de GCE modificado com o nanocompósito rGO/FeHCF na presença e ausência de 4AF (B). Eletrólito de suporte: $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl (pH = 4, ajusta com HCl); faixa de potencial: -0,2 a 1,2 V, velocidade de varredura, 100 mVs^{-1}



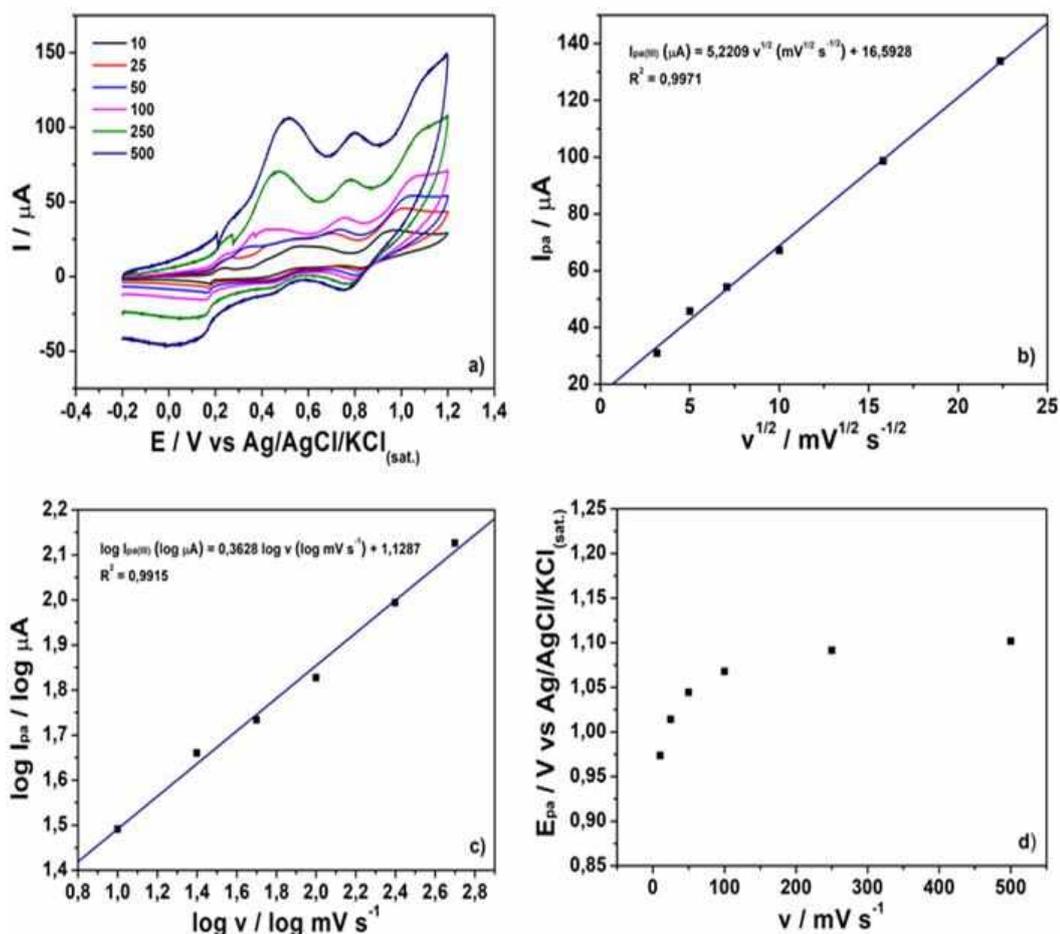
A **Figura 21-a** mostra os voltamogramas cíclicos referente ao eletrodo de GC na ausência e presença de 4AF. É possível observar que essa molécula apresenta três picos de oxidação (+0,44; +0,76 e +1,03 V). Para o eletrodo de GC modificado com rGO/FeHCF mostrado na **Figura 21-b** os potenciais de oxidação da 4AF foram observados em +0,30; +0,64 e +0,96 V. Em relação a intensidade de corrente, percebe-se um ligeiro aumento para o nanocompósito quando comparado ao eletrodo de GC. Além disso, os potenciais

de oxidação da 4AF são ligeiramente menores no eletrodo de GC modificado com rGO/FeHCF.

5.1.2 Efeito da velocidade de varredura na determinação da 4AF na superfície do eletrodo rGO/FeHCF

O estudo da variação da velocidade de varredura permite avaliar o controlo de transporte de massa que envolve a interação entre o analito e o nanocompósito. A **Figura 22-a** mostra os resultados referentes a esse comportamento para os seguintes valores de velocidade de varredura avaliados (10, 25, 50, 100, 250 e 500 mVs^{-1}) usando a técnica de CV.

Figura 22 - Teste de velocidade de varredura do eletrodo modificado com rGO/FeHCF frente à $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de 4AF (a). **Relação I_{pa} vs $v^{1/2}$** (b). **Relação $\log I_{pa}$ vs $\log v$** (c). **Relação E_{pa} vs v** (d). Eletrólito de suporte: $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl (ajustado com HCl, $\text{pH} = 4$); Velocidade de varredura de $-0,2$ a $1,2 \text{ V}$.



A **Figura 22-b**, mostra a corrente de pico anódica aumentando linearmente em função da raiz quadrada da velocidade de varredura. Esse tipo de comportamento, demonstra que o processo eletroquímico que ocorre é controlado por difusão na superfície do eletrodo e que corresponde a equação: $I_{pa} (\mu A) = 5,2209 v^{1/2} (mV^{1/2} s^{-1/2}) + 16,5928$ ($R = 0,9971$) [164].

Uma relação linear também foi observada entre $\log I_{pa}$ e $\log v$, correspondente a equação: $\log I_{pa} (\log \mu A) = 0,3628 \log v (\log mVs^{-1}) + 1,1287$ ($R = 0,9915$), **Figura 22-c**. O valor da inclinação de 0,36 é teoricamente comparável com o valor esperado de 0,5, o que reforça que a eletro-oxidação da 4AF é controlada por difusão [164]. A dependência do potencial de pico anódico (E_{pa}) em função do aumento da velocidade de varredura, como pode ser observado na **Figura 22-d** é um critério que demonstra que o sistema é irreversível [165].

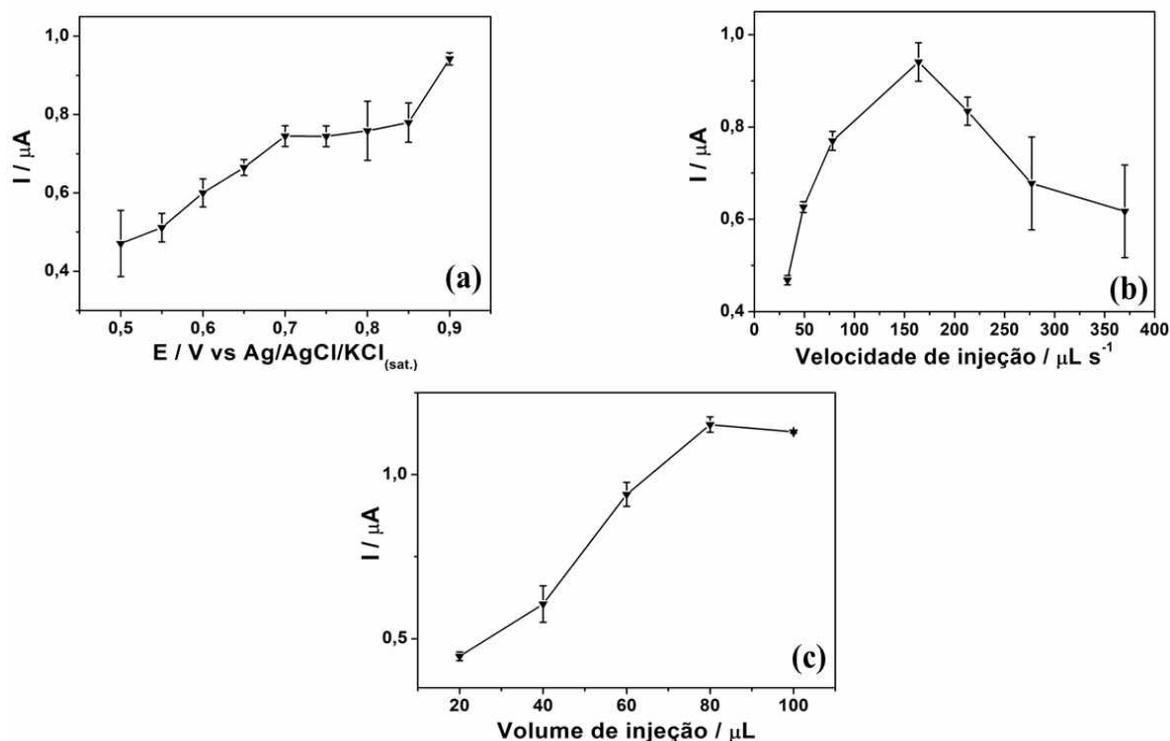
5.1.3 Determinação da 4AF por BIA-AD utilizando o eletrodo modificado rGO/FeHCF

A amperometria é uma técnica bastante conhecida e muito aplicada principalmente na área dos biossensores em especial na detecção de glicose [166]. A vantagem desse método é oferecer medidas sensíveis em maior frequência analítica quando comparando com sistemas estacionários [45, 46].

Para a determinação da 4AF foi utilizada a amperometria acoplada ao sistema BIA. O processo se iniciou com a otimização das variáveis que envolve a análise em questão. Os parâmetros analisados foram: potencial aplicado, volume de injeção e velocidade de injeção.

As injeções da solução padrão contendo 4AF foram realizadas em triplicata, sempre que um parâmetro era variado, os outros dois permaneciam constantes. A **Figura 23**, mostra os gráficos referentes a esses testes.

Figura 23 - Gráficos referentes à otimização das variáveis do sistema BIA para determinação de 4AF: (a) potencial aplicado (0,80 V) (b) velocidade de injeção ($164 \mu\text{L s}^{-1}$), (c) volume de injeção ($80 \mu\text{L}$). Eletrólito suporte: $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl (ajustado com HCl, $\text{pH} = 4$). $[4\text{AF}] = 2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$.



Os potenciais avaliados durante o procedimento foram de 0,50; 0,55; 0,60; 0,65; 0,70; 0,75; 0,80; 0,85; 0,90 V. Conforme mostrados na **Figura 23-a**. O potencial escolhido foi o de +0,80 V. As velocidades de injeção analisadas por meio de uma micropipeta eletrônica que apresenta velocidades pré-definidas foram de 33, 49, 78, 164, 213, 277, 370 $\mu\text{L s}^{-1}$. A velocidade escolhida nesse caso foi de $164 \mu\text{L s}^{-1}$ como mostrado na **Figura 23-b**. No entanto, nota-se que há uma queda na intensidade de corrente após essa velocidade, o que pode ser atribuído vários fatores ligados ao teste.

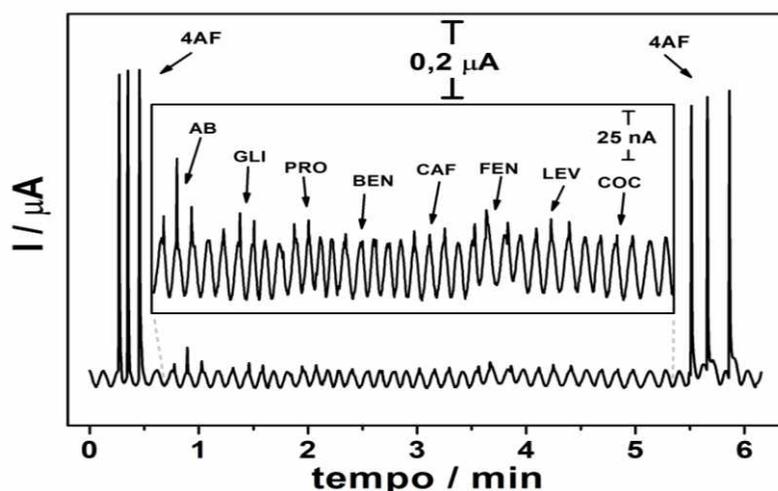
Definidos o melhor potencial e velocidade de injeção foi necessário estabelecer o melhor volume de injeção e os valores analisados foram de 20, 40, 60, 80, 100 μL , sendo que o volume de injeção escolhido foi de 80 μL . A escolha dessas variáveis foi em decorrência de todas elas apresentarem maior intensidade de pico. A **Tabela 7** mostra um resumo dos parâmetros obtidos para realização dos testes usando a técnica BIA-AD.

Tabela 7 - Variáveis otimizadas para análise de 4AF por BIA-AD. Teste de repetibilidade realizado por 6 injeções de baixa ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$) e 6 injeções de alta concentração ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl (ajustado com HCl, $\text{pH} = 4$).

Variável	Resultado obtido
Potencial aplicado (E) / V	+0,80
Velocidade de injeção / $\mu\text{L s}^{-1}$	164
Volume de injeção / μL	80

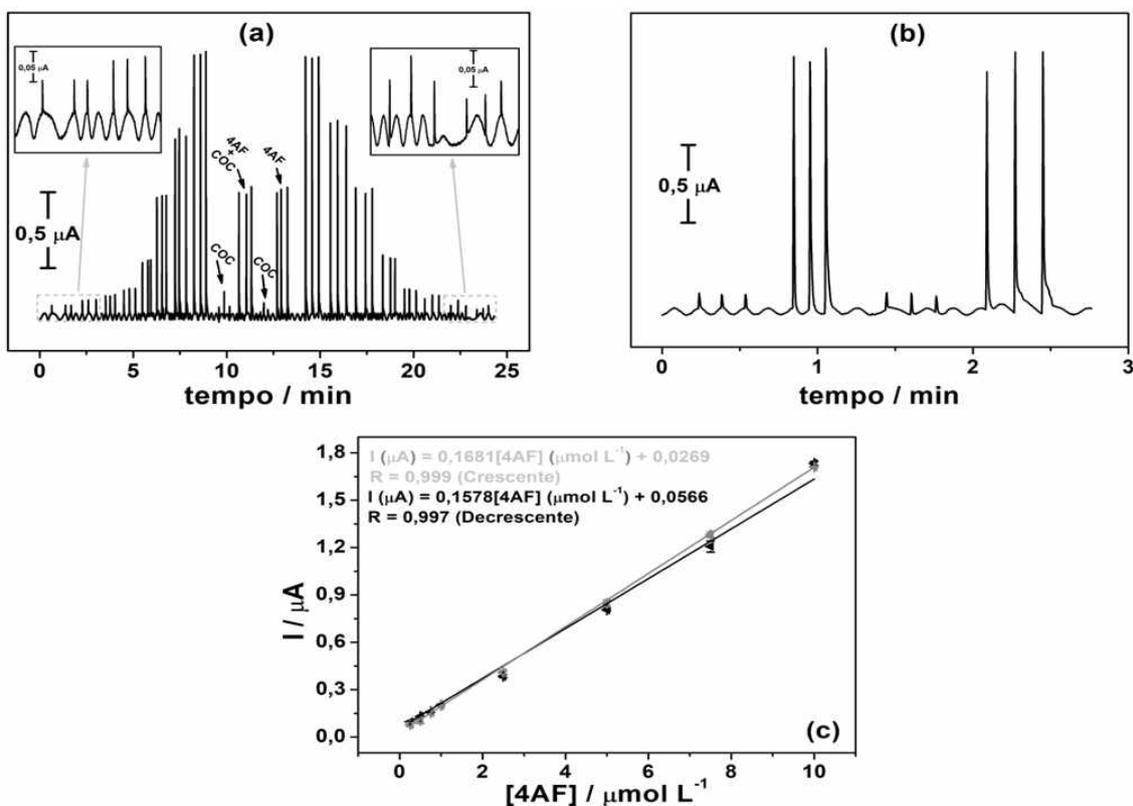
A determinação da 4AF pela técnica amperométrica em amostras de COCap foi executada por meio de injeções em triplicatas de concentrações conhecidas de padrão da 4AF. Antes, foi feita uma análise dos principais interferentes geralmente encontrados em drogas de abuso como a COC para avaliar o potencial de interferência. Os interferentes usados foram; lidocaína, benzocaína, cafeína, levamisol, ácido bórico, glicose, fenacetina e cocaína. Os resultados demonstraram que não houve variação significativa na intensidade de corrente da 4AF frente aos interferentes, além disso não foi observado resposta (3x) dos oito interferentes usualmente encontrados em COCap. O amperograma referente ao teste pode ser observado na **Figura 24** abaixo.

Figura 24 - Amperograma referente às injeções de interferentes comumente encontrados em amostras de cocaína apreendida juntamente com a solução padrão de $[4\text{AF}] = 2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$. Eletrólito de suporte $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl (ajustado com HCl, $\text{pH} = 4$); Potencial aplicado: $0,80 \text{ V}$; Velocidade de injeção: $164 \mu\text{L s}^{-1}$ e Volume de injeção: $80 \mu\text{L}$.



Após análise dos interferentes foram feitas novamente injeções de padrão conhecidas da 4AF. As curvas de calibração obtidas foram baseadas em concentrações crescente e decrescente do analito em estudo. Durante a construção das curvas foram injetadas a amostra de COCap. O teste de repetibilidade foi feito em triplicatas alternadas com aplicações de 6 injeções de baixa ($0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) e 6 injeções de alta concentração ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$). O amperograma correspondente as injeções da 4AF juntamente com a amostra COCap é mostrado na **Figura 25-a**. O teste de repetibilidade e as curvas de calibração crescente e decrescente nas **Figuras 25-b e 25-c** respectivamente.

Figura 25 - Amperograma referente às injeções de 4AF padrão e com amostras de COCap (a). Teste de repetibilidade realizado por 6 injeções de baixa ($0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) e 6 injeções de alta concentração ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) de 4AF (b). Curvas de calibração das injeções crescentes e decrescentes do padrão (c). Eletrólito de suporte: $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl (ajustado com HCl, $\text{pH} = 4$); Potencial aplicado: $0,80 \text{ V}$; Velocidade de injeção $164 \mu\text{L s}^{-1}$; Volume de injeção: $80 \mu\text{L}$. Concentrações usadas para obtenção da curva analítica: $0,25; 0,50; 0,75; 1; 2,5; 5,0; 7,5; 10 \mu\text{mol L}^{-1}$



É importante ressaltar que a amostra de COCap utilizada não foi periciada inicialmente. Para a realização do teste foi adicionado $10 \mu\text{mol}$ de 4AF na amostra de

COCap. A **Figura 25- a** mostra que a injeção da amostra apreendida não acarretou mudança significativa de sinal com e sem concentração conhecida de 4AF, sugerindo assim que a amostra de COCap não estava contaminada pelo analito. As equações de reta das curvas de calibração crescente e decrescente foram de $I (\mu A) = 0,1681 [4AF] (\mu mol L^{-1}) + 0,0269$ com correlação linear de $R = 0,999$ e $I (\mu A) = 0,1578 [4AF] (\mu mol L^{-1}) + 0,0566$ e correlação linear de $R = 0,997$, respectivamente para as injeções de 0,25 a 10 $\mu mol L^{-1}$.

O teste de repetibilidade foi estabelecido pela medida do desvio padrão de todas as injeções. Para análise dos parâmetros analíticos como limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ), bem como também a sensibilidade das medidas que corresponde ao coeficiente angular da reta, foram obtidas da partir de equações que são baseadas no desvio padrão do branco (DPb) e no coeficiente angular (a). A **Equação 1**, possibilita estimar o LOD:

$$LOD = \frac{3,3 \times DPb}{a} \quad \text{Equação 1}$$

Onde DPb é o desvio padrão absoluto do branco, e o a é o coeficiente angular da curva analítica (ou sensibilidade). De modo genérico, o LOQ pode ser calculado usando as mesmas variáveis acima, como pode ser observado na **Equação 2** [166]. A **Tabela 8**, mostra os parâmetros analíticos obtidos.

$$LOD = \frac{10 \times DPb}{a} \quad \text{Equação 2}$$

Tabela 8 - - Parâmetros analíticos obtidos da curva da detecção por BIA-AD de 4AF no eletrodo modificado com rGO/FeHCF.

Parâmetros	Resultados	
	Crescente	Decrescente
Faixa linear / $\mu mol L^{-1}$	0,25-10	0,25-10
Sensibilidade / $\mu A L \mu mol^{-1}$	0,168	0,157
LOD / $\mu mol L^{-1}$	0,02	0,02
LOQ / $\mu mol L^{-1}$	0,08	0,09
Repetibilidade / % (DPR)	< 6	

Para efeito de comparação referente a curva de calibração foi feito esse mesmo teste usando somente o eletrodo de GC. A resposta obtida foi uma melhor sensibilidade

frente ao nanocompósito, demonstrando, dessa forma, que o eletrodo de GC não modificado é também uma excelente alternativa na determinação da 4AF. Entretanto testes adicionais devem ser feitos em relação ao eletrodo modificado rGO/FeHCF para uma melhor verificação dos parâmetros analíticos, uma vez que este apresentou maior sinal de ruído em relação ao eletrodo de GC em virtude do mecanismo de agitação aplicado durante a realização do teste, o que pode ter interferido na obtenção dos dados LOD e LOQ. As **Figuras 26-a** mostra o amperograma com as injeções de 4AF utilizando o eletrodo de GC, enquanto a **Figura 26-b** mostra as curvas de calibração crescente e decrescente desse analito. Já a **Tabela 9**, mostra os dados analíticos obtidos para o eletrodo de GC. A **Tabela 10** traz uma comparação da quantificação da 4AF por outros métodos analíticos relatados na literatura.

Figura 26 – Amperograma referente às injeções de 4AF padrão usando eletrodo de GC (a). Curvas de calibração das injeções crescentes e decrescentes do padrão (b). Eletrólito suporte: 0,1 mol L⁻¹ de KCl (ajustado com HCl, pH= 4); Potencial aplicado: 0,8 V; Velocidade de injeção 164 μL s⁻¹; Volume de injeção: 80 μL. Concentrações usadas para obtenção da curva analítica: 0,50; 1; 2; 7,5; 10 μmol L⁻¹

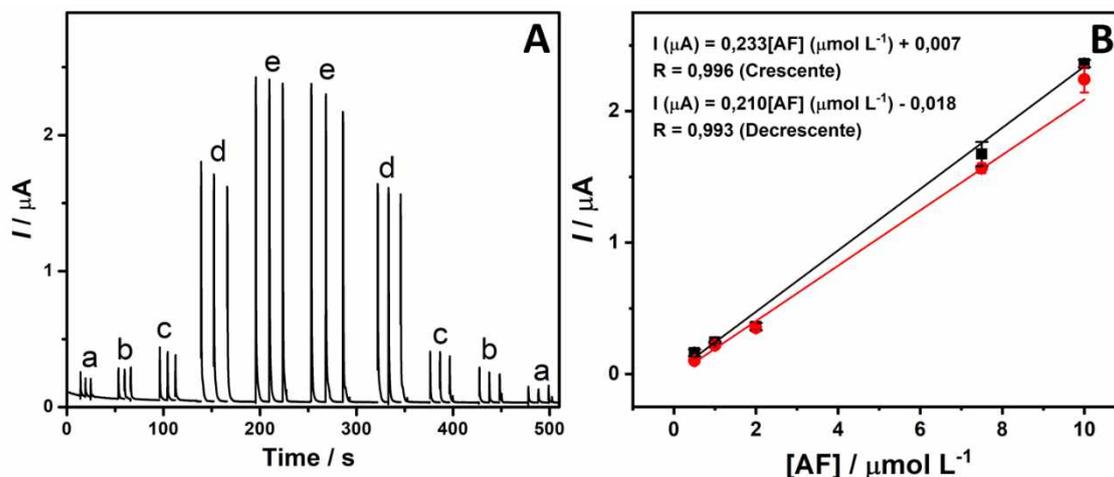


Tabela 9 – Parâmetros analíticos obtidos da curva da detecção por BIA-AD de 4AF no eletrodo de GC.

Parâmetros	Resultados	
	Crescente	Decrescente
Faixa linear / μmol L ⁻¹	0,50-10	0,25-10
Sensibilidade / μA L μmol ⁻¹	0,233	0,210
LD / μmol L ⁻¹	0,13	0,14
LQ / μmol L ⁻¹	0,43	0,47

Tabela 10 – Comparação da quantificação de 4AF por meio de outros métodos analíticos.

Método ou detector	Faixa linear/ mol L ⁻¹	LD/ μmol L ⁻¹	LQ/ μmol L ⁻¹	Referencias
CE-ED ^a	5x10 ⁻⁵ -1x10 ⁻²	0.12 ^f		167
Eletroforese ^b	4,32x10 ⁻³ -3,46x10 ⁻³	35 ^f		168
Eletroquímica/ATPS-Fe ₃ O ₄ -GC ^c	0,5x10 ⁻⁶ -1x10 ⁻⁴ e 1x10 ⁻⁴ -1,6x10 ⁻³	0,10		169
HPLC/ED ^d	2x10 ⁻⁵ -2,16x10 ⁻²	0.30 ^f		170
LC-MS/MS ^e	3,5x10 ⁻⁸ -3,5x10 ⁻⁵	0.035 ^f	0,013	29
HPLC/UV-vis	1,1x10 ⁻⁴ -6,5x10 ⁻⁴	-		171
BIA-AD	2,0x10 ⁻⁷ -1,0x10 ⁻⁵	0,02	0,08	Este trabalho

^a CE-ED – eletroforese capilar com detecção eletroquímica, ^b CCD – cromatografia em camada delgada, ^c Eletroquímica /ATPS-Fe₃O₄-GC – eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas de Fe₂O₄, modificadas com 3 – aminopropiltrióxissilano (ATPS-Fe₃O₄). ^d HPLC/ED – cromatografia líquida de alto desempenho com detecção eletroquímica (eletrodo de carbono vítreo disperso com partículas de α – alumina). ^e LC-MS/MS – cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa. ^f – valores convertidos em concentração (mol L⁻¹) usando peso molecular de 231,29 g/mol.

As caracterizações espectroscópicas e morfológicas demonstraram bons resultados na obtenção do eletrodo modificado rGO/FeHCF. Porém para a determinação da 4AF em uma amostra de cocaína, os resultados não foram satisfatórios, principalmente após a comparação por meio de uma curva analítica do rGO/FeHCF frente ao GCE, em que este último apresentou uma maior sensibilidade para o analito estudado.

6 CONCLUSÕES

A preparação/obtenção do nanocompósito rGO/FeHCF unicamente por via eletroquímica sobre o eletrodo de GC foi bem-sucedida. Caracterizações espectroscópicas (Raman e FTIR) e de imagens de microscopia eletrônica de varredura (SEM) revelaram partículas de BP bem distribuídas sobre e entre as folhas de rGO. A constituição elementar do filme produzido também foi confirmada por EDX.

O desempenho do eletrodo de GC sem e com modificação com o filme de rGO/FeHCF foi avaliado para a detecção de 4AF usando a técnica de voltametria cíclica. Em ambos os eletrodos, foi possível observar a presença de três picos de oxidação com correntes ligeiramente superiores para o eletrodo de GC modificado. O desempenho do eletrodo modificado também foi avaliado na determinação de 4AF em amostras de cocaína apreendidas usando a técnica BIA-AD. A determinação seletiva de 4AF foi possível na presença de alguns adulterantes que geralmente são encontrados em associação com a cocaína. No entanto, em estudos de comparação com o eletrodo de GC não modificado por BI-AD, uma sensibilidade ligeiramente superior foi obtida para o eletrodo de GC não modificado. Estes resultados mostraram que a modificação de eletrodos nem sempre é vantajosa.

REFERÊNCIAS

1. Rodrigues, N. V. S.; Cardoso, E. M.; Andrade, M. V. O.; Donnici, C. L.; Sena, M. M. Analysis of Seized Cocaine Samples by Using Chemometric Methods and FTIR Spectroscopy. *J. Braz. Chem. Soc.* **2013**, *24* (3), 507–517. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20130066>.
2. Bernardo, N. P.; Siqueira, M. E. P. B.; De Paiva, M. J. N.; Maia, P. P. Caffeine and Other Adulterants in Seizures of Street Cocaine in Brazil. *Int. J. Drug Policy* **2003**, *14* (4), 331–334. [http://dx.doi.org/10.1016%2FS0955-3959\(03\)00083-5](http://dx.doi.org/10.1016%2FS0955-3959(03)00083-5).
3. BARRETO, D. N., RIBEIRO, M. A. C., SUDO, J. T. C., RICHTER, E. M., MUNOZ, R. A., SILVA, S. G. High-throughput screening of cocaine, adulterants, and diluents in seized samples using capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. *Talanta*. V. 217, p.120987, 2020. DOI: [10.1016/j.talanta.2020.120987](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.120987)
4. COLE, Claire; JONES, Lisa; MCVEIGH *et al.* **Adulterants in illicit drugs: a review of empirical evidence**. *Drug Testing and Analysis*. Vol. 3, p. 89-96, 2010. <https://doi.org/10.1002/dta.220>.
5. BRUNT, T. M., RIGTER, S., HOEK, J., VOGELS, N., DIJK, P., NIESINK, R. J. M. An analysis of cocaine powder in the Netherlands: content and health hazards due to adulterants. *Society For The Study of Addiction*, v. 104, p. 798-805, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1360-0443.2009.02532.x>.
6. BOTELHO, E. D.; CUNHA, R. B.; CAMPOS, A. F. C.; MALDANER, A. O. **Chemical Profiling of Cocaine Seized by Brazilian Federal Police in 2009-2012: Major Components**. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 25, 4, p.611-118, 2014.
7. ALCÂNTARA, L.T.A. **Adulterantes encontrados em drogas ilícitas: uma abordagem forense**. *Acta de Ciências e Saúde*, 2, 5, 2016.
8. BALAYSSAC, Stéphane *et al.* **Characterization of heroin samples by H NMR and 2D DOSY H NMR**. *Forensic Science International*, 234, p.29-38, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2013.10.025>.
9. CARVALHO, D.G., MÍDIO, A.F. Quality of cocaine seized in 197 in the street-drug market of São Paulo. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. v. 39, p. 71-75, 2003. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322003000100007>.
10. MAGALHÃES, E. J., NASCENTES, C. C, PEREIRA, L. S. A., GUEDES, M. L. O., LORDEIRO, R. A., AULER, L. M. L. A., AUGUSTI, R., QUEIROZ, M. E. L. R. Evaluation of the composition of street cocaine seized in two regions of Brazil. *Science and Justice*, v. 53, p. 425-432, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2013.05.003>.
11. LAPACHINSKE, S.F.; OKAI, G.G.; SANTOS, A.; BAIROS, A.V.; YONAMINE, M. Analysis of cocaine and its adulterants in drugs for international

trafficking seized by the Brazilian Federal Police. *Forensic Sci Int.* v. 247, p. 48–53, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2014.11.028>.

12. ROLDAN, C.J. Phenytoin toxicity from cocaine adulteration. *West J Emerg Med.* v.15, n.2, p.127-130, 2014. <https://doi.org/10.5811%2Fwestjem.2013.12.20010>

13. RIDDER, W.P.; KLIMEK, M.; RUPREHT, J. Physostigmine for the immediate treatment of a patient with the central anticholinergic syndrome induced by cocaine cut with atropine. *Ned Tijdschr Geneeskd.* v.149, n.30, p.1701-1703, 2005. <https://doi.org/10.1159/000318084>

14. Moore, J. M.; Casale, J. F.; *J. Chromatogr. A.* **1994**, 674, 165. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(94\)85224-3](https://doi.org/10.1016/0021-9673(94)85224-3)

15. Noggle, E.T.; Clark, C.R.; Liquid chromatographic identification of cis – and transcinnamoylcocaine in illicit cocaine. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* V.65, p. 756, 1982. <http://dx.doi.org/10.1093/jaoac/65.3.756>

16. Krauss, S. T.; Remcho, T. P.; Lipes, S. M.; Aranda, R.; Maynard, H. P.; Shukla, N.; Li, J.; Tontarski, R. E.; Landers, J. P. Objective Method for Presumptive Field-Testing of Illicit Drug Possession Using Centrifugal Microdevices and Smartphone Analysis. *Anal. Chem.* **2016**, 88 (17), 8689–8697. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b01982>.

17. VELHO, J. A.; GEISER G. C.; ESPINDULA A.; **Ciências Forenses: uma introdução às principais áreas da criminalística moderna.** Campinas – SP; Editora Millenium, 2012.

18. MOTA, L.; DI VITTA, P. B.; **Química Forense: utilizando métodos analíticos em favor do poder judiciário,** Revista Oswaldo Cruz, 2016.

19. Scott Jr., L. J. *Microgran* **1973**, 6, 179.

20. Tsumura, Y.; Mitome, T.; Kimoto, S.; *Forensic Sci. Int.* **2005**, 155, 158. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.11.011>.

21. Janicka M., Kot-Wasik A., Namiesnik J., Analytical procedures for determination of cocaine and its metabolites in biological samples, *TrAC Trends in Anal. Chem.*, v. 29, p. 209, 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2009.12.005>

22. Fernández, P.; Aldonza, M.; Bouzas, A.; Lema M.; Bermejo, A. M.; Tabernero, M. J.; GC-FID determination of cocaine and its metabolite in human bile and vitreous humor, *J. App. Toxic.* v. 26, p. 253-257, 2006. <https://doi.org/10.1002/jat.1130>

23. Clauwaert, K. M., Bocxlaer, J. F. V.; Lambert, W. E.; Leenheer, A.P.D.; Segmental analysis for cocaine and metabolites by HPLC in hair of suspected drug overdose cases, *Forensic Sci. Int.* v.110, p. 157, 2000. [https://doi.org/10.1016/s0379-0738\(00\)00162-6](https://doi.org/10.1016/s0379-0738(00)00162-6)

24. LEVY, M. Hypersensitivity to pyrazolones. *Thorax*, v. 55, n. 2, p. 72–74, 2000. https://doi.org/10.1136%2Fthorax.55.suppl_2.S72
25. Cai MQ, Feng L, Zhang LQ. Transformation of aminopyrine in the presence of free available chlorine: Kinetics, products, and reaction pathways. *Chemosphere*. 2017 Mar 1; 171:625-34. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.033>
26. Worboys M, Elizabeth T. Fenilbutazona: uma droga em duas espécies, **História e Filosofia das Ciências da Vida**, 2018;40(2) :P-3
27. ARIZA, A. et al. Pyrazolones metabolites are relevant for identifying selective anaphylaxis to metamizole. *Scientific Reports*, v. 6, p. 1–9, 2016. <https://doi.org/10.1038/srep23845>
28. [Huang F](#), Liu M, Xie M, Liu W, Sun L. A combined study on the skeletal vibration of aminopyrine by terahertz time-domain spectroscopy and DFT simulation. *Optik*. 2020 Apr 1; 208:163913
29. LIN, D. et al. Determination of aminopyrine in human plasma by LC-MS-MS. *Chromatographia*, v. 71, n. 9–10, p. 927–931, 2010. <https://doi.org/10.1365/s10337-010-1558-1>
30. WU, H.; KHAN, M.. THz spectroscopy: An emerging technology for pharmaceutical development and pharmaceutical Process Analytical Technology (PAT) applications. *Journal of Molecular Structure*, v. 1020, p. 112–120, 2012. <https://dx.doi.org/10.1016/j.molstruc.2012.04.019>.
31. STRACHAN, C.J.; TADAY, P.F.; NEWNHAM, D.A.; GORDON, K.C.; ZEITLER, J.A.; PEPPER, M.; RADES, T. Using terahertz pulsed spectroscopy to quantify pharmaceutical polymorphism and crystallinity. *Journal of pharmaceutical sciences*, v. 94, n. 4, p. 837–46, abr. 2005. <https://doi.org/10.1002/jps.20281>.
32. National Center for Biotechnology Information. "PubChem Compound Summary for CID 6009, Aminopyrine" PubChem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Aminopyrine>. Accessed 24 September, 2020.
33. Shesser, R., R. Jotte, and J. Olshaker, *The contribution of impurities to the acute morbidity of illegal drug-use*. *American Journal Of Emergency Medicine*, 1991. **9**(4): p. 336-342. [https://doi.org/10.1016/0735-6757\(91\)90053-m](https://doi.org/10.1016/0735-6757(91)90053-m)
34. MALDANER, A.O. et al. Chemical Profiling of Street Cocaine from Different Brazilian Regions. *Journal Of The Brazilian Chemical Society*, [s.l.], v. 27, n. 4, p.719-726, 2015. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20150321>
35. A.G. Agundez, C. Martinez, R. Martin, J. Benitez, Determination of aminopyrine, dipyrone and its metabolites in urine by high-performance liquid-chromatography, *Ther. Drug Monit.* 16 (1994) 316–322. <https://doi.org/10.1097/00007691-199406000-00014>

36. D. Lin, Y. Zhang, X. Wang, Z. Zhang, J. Zhu, F. Ye, Y. Ye, X. Wang, Determination of aminopyrine in human plasma by LC–MS–MS, *Chromatographia* 71 (2010) 927–931
37. W.H. Zhou, J. Liu, E.K. Wang, Determination of aminopyrine and its metabolite by capillary electrophoresis electrochemical detection, *J. Chromatogr. A* 715 (1995) 355–360.
38. Analytical Chemistry, J. WANG, ed Wiley-VCH- terceira edição, pg 29 2006
39. OLDHAM KB, MYLAND JC (1994) *Fundamental of Electrochemical Science*. Academic Press, London, pg 424.
40. *Eletroanalitical Methods*, F. SCHOLZ, ed Springer, 2 ed 2009
41. SEGATTO, M.S. Desenvolvimento da plataforma de grafite funcionalizada com poli(ácido 4-hidroxifenilacético) sobre óxido de grafeno reduzido-nanopartículas de ouro, para detecção do hormônio triiodotironina. 2017. Dissertação de Mestrado. Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia
42. Bard, Allen J.; Larry R. Faulkner (2000-12-18). *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications* (2 ed.). Wiley.
43. BOND AM, SCHOLZ F (1990) *Electroanalytical Methods*, 2 edição, Springer.
44. BRETT, A. M. O.; BRETT, C. M. A. **Eletroquímica: princípios, métodos e aplicações**. Oxford: Oxford University Press, 1996.
45. ROCHA, D.P. *et al.* Batch-Injection Analysis Better Than Ever: New Materials for Improved Electrochemical Detection and On-Site Applications, **Electroanalysis**, p. 1–15, 2018. DOI:10.1002/elan.201800042. <https://doi.org/10.1002/elan.201800042>.
46. ROCHA, D.P. *et al.* Chemically versus electrochemically reduced graphene oxide: Improved amperometric and voltammetric sensors of phenolic compounds on higher roughness surfaces, **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 254, p. 701–708, 2018. DOI:10.1016/j.snb.2017.07.070.
47. TORMIN, T.F. *et al.* Combination of screen-printed electrodes and batch injection analysis: A simple, robust, high-throughput, and portable electrochemical system, **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 202, p. 93–98, 2014. DOI:10.1016/j.snb.2014.04.096.
48. DIAS, A.A. *et al.* Paper-based enzymatic reactors for batch injection analysis of glucose on 3D printed cell coupled with amperometric detection, **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 226, p. 196–203, 2016. DOI:10.1016/j.snb.2015.11.040.
49. CARDOSO, R.M. *et al.* 3D printing for electroanalysis: From multiuse electrochemical cells to sensors, **Analytica Chimica Acta**, 2018. DOI:10.1016/j.aca.2018.06.021

50. WANG, J.; TAHA, Z. Batch injection analysis, **Analytical Chemistry**, v. 63, p. 1053–1056, 1991. DOI:10.1021/ac00010a025
51. PEREIRA, F. P.; da SILVA, W. P.; MUÑOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M. A simple and fast batch injection analysis method for simultaneous determination of phenazopyridine, sulfamethoxazole, and trimethoprim on boron-doped diamond electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 766, p. 87-93, 2016.
52. GONG, J., Z. GUAN, AND D. SONG, Biosensor based on acetylcholinesterase immobilized onto layered double hydroxides for flow injection/amperometric detection of organophosphate pesticides. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013. 39(1): p. 320-323. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.07.026>
53. MOSES, P. R.; WIER, L.; MURRAY, R. W. Chemically Modified Tin Oxide Electrode. **Analytical Chemistry**, v. 47, n. 12, p. 1882–1886, 1975.
54. POURNARA, A. D.; TARLAS, G. D.; PAPAEFSTATHIOU, G. S.; MANOS, M. J. Chemically modified electrodes with MOFs for the determination of inorganic and organic analytes via voltammetric techniques: a critical review. **Inorganic Chemistry Frontiers**, v. 6, n. 12, p. 3440–3455, 2019.
55. BAIG, N.; SAJID, M.; SALEH, T. A. Recent trends in nanomaterial-modified electrodes for electroanalytical applications. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 111, p. 47–61, 2019.
56. DE FÁTIMA BRITO SOUZA, M. Chemically modified electrodes applied to electroanalysis: A brief presentation. **Química Nova**, v. 20, n. 2, p. 191–195, 1997. <https://doi.org/10.1590/S0100-40421997000200011>.
57. LANE, Ross F.; HUBBARD, Arthur T. Electrochemistry of Chemisorbed Molecules. I. Reactants Connected to Electrodes through Olefinic Substituents. *The journal of physical chemistry*, v. 77, ed. 11, p. 1401-1410, 1 maio 1973. <https://doi.org/10.1021/j100630a018>
58. LEAL, G.F.; CALIXTO, C.M.F.; SANTOS, S.X.; CAVALHEIRO, E.T.G. Determinação de L-cisteína utilizando eletrodo composto à base de grafite /poliuretana modificado com hexacianoferrato de cobre (II). Instituto de Química de São Carlos, USP, SP.
59. DEKANSKI, A.; STEVANOVIĆ, J.; STEVANOVIĆ, R.; NIKOLIĆ, B. Ž.; JOVANOVIĆ, V. M. Glassy carbon electrodes: I. Characterization and electrochemical activation. **Carbon**, v. 39, n. 8, p. 1195–1205, 2001. [http://dx.doi.org/10.1016/S0008-6223\(00\)00228-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0008-6223(00)00228-1)
60. BOUJAKHROUT, A. et al. Decorating graphene oxide/nanogold with dextran-based polymer brushes for the construction of ultrasensitive electrochemical enzyme biosensors. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 3, n. 17, p. 3518-3524, 2015. <https://doi.org/10.1039/C5TB00451A>

61. HOU, W.; WANG, E. "Flow-injection amperometric detection of hydrazine by electrocatalytic oxidation at a Prussian Blue film modified electrode. **Analyt. Chem. Acta**, v. 257, p. 275, 1992. <https://doi.org/10.1016/0003-2670%2892%2985180-E>
62. SOUZA, M. D. F. B. Eletrodos quimicamente modificados aplicados à eletroanálise: uma breve abordagem. **Química nova**, v. 20, n. 2, p. 191-195, 1997. <https://doi.org/10.1590/S0100-40421997000200011>
63. MUHLBAUER, R. L.; GERHARDT, R. A. A review on the synthesis of carbon nanotube thin films. In: **Carbon Nanotubes: Synthesis and Properties**. p. 107–155, 2012.
64. Emr, S. A.; Yacynych, A. M.; *Electroanalysis* **1995**, 7, 913. <https://doi.org/10.1002/elan.1140071002>
65. PEREIRA, A C.; SANTOS, A. S.; KUBOTA L. T. Tendencias em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. *Química Nova*, v. 25, p. 1012-1021, 2002. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000600019>
66. Persson, B.; Lan, H. L.; Gorton, L.; Okamoto, Y.; Hale, P. D.; Boguslavsky, L.; Skotheim, T.; *Biosens. Bioelectron.* 1993, 8, 81. [https://doi.org/10.1016/0956-5663\(93\)80056-U](https://doi.org/10.1016/0956-5663(93)80056-U)
67. Alvarez-Icasa, M.; Bilitewski, U.; *Anal. Chem.* **1993**, 65, 525 <https://doi.org/10.1021/ac00059a717>
68. MUHLBAUER, R. L.; JOSHI, S. M.; GERHARDT, R. A. The effect of substrate pore size on the network interconnectivity and electrical properties of dropcasted multiwalled carbon nanotube thin films. **Journal of Materials Research**, v. 28, n. 12, p. 1617–1624, 2013
69. Alegret, S.; *Analyst* **1996**, 121, 1751 <https://doi.org/10.1039/AN9962101751>
70. Martorell, D.; Céspedes, F.; Martínez-Fàbregas, E.; Alegret, S.; *Anal. Chim. Acta* **1994**, 290, 343. [https://doi.org/10.1016/0003-2670\(94\)80121-5](https://doi.org/10.1016/0003-2670(94)80121-5)
71. Céspedes, F.; Martínez-Fàbregas, E.; Alegret, S.; *Anal. Chim. Acta*, **1993**, 284, 21. [https://doi.org/10.1016/0003-2670\(93\)80003-4](https://doi.org/10.1016/0003-2670(93)80003-4)
72. FITZER, E.; SCHAFER, W. The effect of crosslinking on the formation of glasslike carbons from thermosetting resin. *Carbon*. V. 8, p. 353-364, 1970. FITZER, E.; SCHAFER, W. The effect of crosslinking on the formation of glasslike carbons from thermosetting resin. *Carbon*. V. 8, p. 353-364, 1970. [https://doi.org/10.1016/0008-6223\(70\)90075-8](https://doi.org/10.1016/0008-6223(70)90075-8).
73. LEWIS, J. C.; REDFERN, B.; COWLAND, F.C. Vitreous Carbon as a crucible material for semiconductors. **Solid State Electronics**, v. 6, p. 251-254, 1963.
74. YAMADA, S.; SATO, H. Some physical properties of glassy carbon. **Nature**. N. 4812, P. 261-262, 1962.

75. JENKINS, G. M.; KAWAMURA, K. Structure of glassy carbon. *Nature*. v. 231, p. 175-176, 1971. <https://doi.org/10.1038/231175a0>.
76. JENKINS, G. M.; KAWAMURA, K. **Polymeric carbons**: carbon fibre, glass and char. Cambridge: Cambridge University Press, 1976. 178 p.
77. FERRARI, P. E.; REZENDE, M. C. Carbono Polimérico: Processamento e Aplicações **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. P. 22-30, 1998. <https://doi.org/10.1590/S0104-14281998000400005>.
78. ZITTEL, H. E.; MILLER, F. J. A glassy – carbon electrode for voltammetry. *Analytical Chemistry*. v. 37, n. 2, p. 200-203, 1965. <https://doi.org/10.1021/ac60205a020>.
79. HOOGLIET, J.C.; VAN OS, P. J. H. J.; MARK, E. J.; BENNEKOM, W. P. Modification of glassy carbon electrode surfaces with mediators and bridge molecules. **Biosensor & bioelectronics**. V. 6, p. 413-423, 1991.
80. PEDANO, M. L.; RIVAS, G. A. Immobilization of DNA on glassy carbon electrodes for the development of affinity biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**. V. 18, p. 269-277, 2003. [https://doi.org/10.1016/s0956-5663\(02\)00176-8](https://doi.org/10.1016/s0956-5663(02)00176-8).
81. JENKINS, G. M.; GRIGSON, J. The fabrication of Artifacts out of glassy carbon and carbon – fiber reinforced carbon for biomedical applications. *Journal of Biomedical Materials Research*. V. 13, p. 371-394, 1979. <https://doi.org/10.1002/jbm.820130304>.
82. A.K. Geim, K.S. Novoselov, The rise of graphene, *Nat. Mater.* 6 (2007) 183–191. <https://doi.org/10.1038/nmat1849>
83. K. S. Novoselov, A. K. Geim, S. V. Morozov, D. Jiang, Y. Zhang, S. V. Dubonos, I. V. Grigorieva and A. A. Firsov, *Science*, 306, 666 (2004). <https://doi.org/10.1126/science.1102896>
84. P. R. Wallace, *Physical Review*, 71, 622 (1947). DOI: <https://doi.org/10.1103/PhysRev.71.622>
85. N. D. Mermin, *Physical Review*, 176, 250 (1968). DOI: <https://doi.org/10.1103/PhysRev.176.250>
86. M. J Allen, V. C. Tung and R. B. Kaner, *Chem. Rev.*, 2010, 110. <https://doi.org/10.1021/cr900070d>
87. M. Pumera; *Graphene-based nanomaterials and their electrochemistry*; *Chemical Society Reviews*, 39 (2010) 4146–4157. <https://doi.org/10.1039/C002690P>
88. M. Pumera, *Graphene in biosensing*; *Materials Today*, 14, 7-8 (2011) 308–315. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(11\)70160-2](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(11)70160-2)

89. K. S. Novoselov, V. I. Fal'ko, L. Colombo, P. R. Gellert, M. G. Schwab, K. Kim; *A roadmap for graphene*; Nature, 490 (2012) 192–200. <https://doi.org/10.1038/nature11458>
90. F. Schwierz; *Graphene transistors*; Nature Nanotechnology, 5 (2010) 487–496. <https://doi.org/10.1038/nnano.2010.89>
91. P. Avouris, *Graphene: Electronic and Photonic Properties and Devices*; Nano Letters, 10 (2010) 4285–4294 <https://doi.org/10.1021/nl102824h>
92. D. R. Cooper, B. D'Anjou, N. Ghattamaneni, B. Harack, M. Hilke, A. Horth, N. Majlis, M. Massicotte, L. Vandsburger, E. Whiteway, V. Yu; *Experimental review of graphene*; ISRN Condensed Matter Physics, 2012 (2012) Article ID 501686, 56 pages. <https://doi.org/10.5402/2012/501686>
93. Gilje, S.; Han, S.; Wang, M.; Wang, K. L.; Kaner, R. B.; *Nano. Lett.* **2007**, *7*, 3394. <https://doi.org/10.1021/nl0717715>
94. K. S. Novoselov, A. K. Geim, S. V. Morozov, D. Jiang, Y. Zhang, S. V. Dubonos, I. V. Grigorieva, A. A. Firsov; *Electric Field effect in Atomically Thin Carbon Films*; Science, 306 (2004) 666–669 <https://doi.org/10.1126/science.1102896>
95. NASCIMENTO, Jefferson P. et al. Esfoliação do Grafite Natural em N-metilpirrolidona e Clorofórmio para Obtenção de Grafenos. In: 35ª REUNIÃO ANUAL SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 35., 2012, Águas de Lindóia. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). Belo Horizonte, Mg, Rio de Janeiro, RJ e Itapeperica, Mg: Sociedade Brasileira de Química (SBQ), 2012. p. 1 - 1.
96. SOUSA, N. C. O. **Esfoliação Eletroquímica de Grafite Natural com Eletrólito Multifuncional para Obtenção de Estruturas de Grafeno**. 85 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais e Nanotecnologia) – Escola de Engenharia, Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo, 2018.
97. HU, K.; KULKARNI, D.D.; CHOI, I.; TSUKRUK, V.V. Graphene-polymer nanocomposites for structural and functional applications. **Progress in Polymer Science**, v. 39, n. 11, p. 1934- 1972, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2014.03.001>
98. KONG, F. Y.; LI, X. R.; ZHAO, W. W.; XU, J. J. & CHEN, H. Y. Graphene oxide–thionine–Au nanostructure composites: preparation and applications in non-enzymatic glucose sensing. **Electrochemistry Communications**, v. 14, n. 1, p. 59-62, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016%2Fj.elecom.2011.11.004>
99. W. S. Hummers Jr., R. E. Offeman; *Preparation of Graphitic Oxide*; Journal of the American Chemical Society, 80 (1958) 1339–1339. <https://doi.org/10.1021/ja01539a017>
100. A. M. Dimiev, J. M. Tour; *Mechanism of Graphene Oxide Formation*; ACS Nano, 8, 3 (2014) 3060–3068. <https://doi.org/10.1021/nm500606a>

101. X. Huang, F. Boey, H. Zhang; *A Brief Review on Graphene-Nanoparticle Composites*; *Cosmos*, 6, 2 (2010) 159–166.
<https://doi.org/10.1142/S0219607710000607>
102. Klinowski, J.; He, H.; Forster, M.; Lerf, A. A new structural model for graphite oxide. *Chemical Physics Letters* 1998, 287, 53. [CrossRef]
[https://doi.org/10.1016/S0009-2614\(98\)00144-4](https://doi.org/10.1016/S0009-2614(98)00144-4)
103. D. Chen, H. Feng, J. Li; *Graphene Oxide: Preparation, Functionalization, and Electrochemical Applications*; *Chemical Reviews*, 112 (2012) 6027–6053.
<https://doi.org/10.1021/cr300115g>
104. JOSHI, R. K. et al. Precise and Ultrafast Molecular Sieving Through Graphene Oxide Membranes. *Science*, v. 343, n. 6172, p. 752-754, 14 fev. 2014
<https://doi.org/10.1126/science.1245711>
105. O'HEREN, S. C. et al. Selective Ionic Transport through Tunable Subnanometer Pores in Single-Layer Graphene Membranes. *Nano Letters*, v. 14 n. 3, p. 1234-1241, fev. 2014 <https://doi.org/10.1021/nl404118f>
106. SILVA, J. J. A. DA. **Microscopia de força elétrica em amostra de óxido de grafeno**. Thesis – Ceará: UFC, 2013.
107. HA, S. H.; JEONG, Y. S.; LEE, Y. J. Free Standing Reduced Graphene Oxide Film Cathodes for Lithium Ion Batteries. *ACS Applied Materials & Interfaces*, v. 5, n. 23, p. 12295-12303, nov. 2013. <https://doi.org/10.1021/am4044147>
108. S. Pei, H.-M. Cheng; *The reduction of graphene oxide*; *Carbon*, 50 (2012) 3210–3228. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2011.11.010>
109. LI, Z. et al. Super structured Assembly of Nanocarbons: Fullerenes, Nanotubes, and Graphene. *Chemical Reviews*, [s.l.], v. 115, no 15, p. 7046 – 7117, 2015. ISSN: 0009-2665, <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00102>
110. Yuan, W.; SHI, G. Graphene-based gas sensors. *Journal of Materials Chemistry A*, [s.l.], v. 1, no 35, p. 10078, 2013. ISSN: 2050-7488, <https://doi.org/10.1039/C3TA11774J>
111. Y. Li, W. Gao, L. Ci, C. Wang, P. M. Ajayan; *Catalytic performance of Pt nanoparticles on reduced graphene oxide for methanol electro-oxidation*; *Carbon*, 48 (2010) 1124–1130. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2009.11.034>
112. J. Yang, S. Gunasekaran; *Electrochemically reduced graphene oxide sheets for use in high performance supercapacitors*; *Carbon*, 51 (2013) 36–44
<https://doi.org/10.1016/j.carbon.2012.08.003>
113. C. Wang J. Du, H. Wang, C. Zou, F. Jiang, P. Yang, Y. Du, A facile electrochemical sensor based on reduced graphene oxide and Au nanoplates modified glassy carbon electrode for simultaneous detection of ascorbic acid, dopamine and uric

acid Author: Sensors Actuators B. Chem. (2014).
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.07.077>

114. L. Chen Y. Tang, K. Wang, C. Liu, S. Luo, *Electrochemistry Communications* Direct electrodeposition of reduced graphene oxide on glassy carbon electrode and its electrochemical application, *Electrochem. Commun.* 13 (2011) 133–137.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.elecom.2010.11.033>

115. J. Luiz, M.A. Beluomini, G. Cristina, N.R. Stradiotto, Determination of amino acids in sugarcane vinasse by ion chromatographic using nickel nanoparticles on reduced graphene oxide modified electrode, *Microchem. J.* (2017).
<https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.07.007>

116. L. Cao, Y. Liu, B. Zhang, L. Lu, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2010**, 2, 2339–2346. <https://doi.org/10.1021/am100372m>

117. Y. Jianga, X. Zhanga, C. Shana, S. Huab, Q. Zhanga, X. Baib, L. Danb, L. Niu, *Talanta*, **2011**, 85, 76–81

118. BUSER, H. J.; SCHWARZENBACH, D.; et al. The Crystal Structure of Prussian Blue: $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$. *Inorganic Chemistry*, v. 16, n. 11, p. 2704–2710, 1977. <https://doi.org/10.1021/ic50177a008>

119. *Miscellanea Berolinensia ad Incrementium Scientiarum*, Berlin. p. 377, (1710).

120. Woodward, J. Praeparatio Caerulei Prussiaci Ex Germania Missa ad Johannem Woodward. *Philos. Trans.* **33**, 15–17 (1724). <https://doi.org/10.1098/rstl.1724.0005>

121. Brown, J. Observations, and experiments upon the foregoing preparation. *Philos. Trans. R. Soc. London* **33**, 17–24 (1724).

122. KEGGIN, J. F.; MILLES, F. D. Structure and Formulae of the Prussian blues and Related Compounds. *Nature*, v. 137, p. 577 – 578, 1936
<https://doi.org/10.1038/137577a0>

123. KARYAKIN, A. A. Prussian Blue and Its Analogues: Electrochemistry and Analytical Applications. *Electroanalysis*, v. 13, n. 10, p. 813 – 819, 2001.
[https://doi.org/10.1002/1521-4109\(200106\)13:10%3C813::AID-ELAN813%3E3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/1521-4109(200106)13:10%3C813::AID-ELAN813%3E3.0.CO;2-Z)

124. HERREN, F. *et al.* Neutron Diffraction Study of Prussian Blue, $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$. Location of Water Molecules and Long-Range Magnetic Order. *Inorganic Chemistry*, Washington, v. 19, n. 4, p. 956–959, 1980.
<https://doi.org/10.1021/ic50206a032>

125. NEFF, V. D. Electrochemical Oxidation and Reduction of Thin Films of Prussian Blue. *Journal of the Electrochemical Society*, v. 125, n. 6, p. 886 – 887, 1978. https://ui.adsabs.harvard.edu/link_gateway/1978JEIS..125..886N/doi:10.1149/1.2131575

126. Hegner, FS, Galán-Mascarós, JR, & López, N. (2016). A Database of the Structural and Electronic Properties of Prussian Blue, Prussian White, and Berlin Green Compounds through Density Functional Theory
<https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.6b02200>
127. K. Itaya, T. Ataka, S. Toshimaf, *J Am Chem Soc.* **1982**, 4767–4772.
<https://doi.org/10.1021/ja00382a006>
128. Ricci, F. e Palleschi, G. *Biosens. Bioelectron.* 21 (2005) 389.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2004.12.001>
129. RUBIN, H.-D.; HUMPHREY, B.D.; et al. Role of surface reactions in the stabilization of n-CdS-based photoelectrochemical cells. *Nature*, v. 308, p. 339–341, 1984. <https://doi.org/10.1038/308339a0>
130. VIDAL, J.C.; ESPUELAS, J.; et al. Amperometric cholesterol biosensors based on the electropolymerization of pyrrole and the electrocatalytic effect of Prussian-Blue layers helped with self-assembled monolayers. *Talanta*, v. 64, n. 3, p. 655–664, 2004.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2004.03.038>
131. MOKRUSHINA, A. V; HEIM, M.; et al. Enhanced hydrogen peroxide sensing based on Prussian Blue modified macroporous microelectrodes. *Electrochemistry Communications*, v. 29, p. 78–80, 2013.
<http://dx.doi.org/10.1016%2Fj.elecom.2013.01.004>
132. A. Karyakin, A., E. E. Karyakina, *Sensors Actuators B Chem.*, **1999**, 57, 268–273.
133. KARYAKIN, A.; KARYAKINA. E.; GORTON, L. On the mechanism of H₂O₂ reduction at Prussian Blue modified electrodes. *Electrochemistry Communications*, v. 1, p. 78 – 82, 1999. [http://dx.doi.org/10.1016/S1388-2481\(99\)00010-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1388-2481(99)00010-7)
134. OLIVEIRA, M. F.; MORTIMER B, R. J.; STRADIOTTOC, N. R. Voltammetric determination of persulfate anions using an electrode modified with a Prussian blue film. *Microchemical Journal*, v. 64, p. 155 – 159, 2000.
[https://doi.org/10.1016/S0026-265X\(99\)00023-5](https://doi.org/10.1016/S0026-265X(99)00023-5)
135. VILAS-BOAS, M.; FREIRE, C.; CASTRO, B.; HILLMAN, A. R. Electrochemical characterization of a novel salen-type modified electrode. *Journal of Physical Chemistry B*, v. 102, n. 43, p. 8533 – 8540, 1998.
<https://doi.org/10.1021/jp982160r>
136. HOU, W.; WANG, E. “Flow-injection amperometric detection of hydrazine by electrocatalytic oxidation at Prussian Blue film modified electrode. *Analyt. Chem Acta*, v. 257, p. 275, 1992. [https://doi.org/10.1016/0003-2670\(92\)85180-E](https://doi.org/10.1016/0003-2670(92)85180-E)
137. WANG, S. *et al.* Prussian blue mediated amplification combined with signal enhancement of ordered mesoporous carbon for ultrasensitive and specific quantification of metolcarb by a three-dimensional molecularly imprinted

electrochemical sensor, **Biosensors and Bioelectronics**, v. 64, p. 247–254, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.09.009>

138. CAO, L. *et al.* In situ controllable growth of Prussian blue nanocubes on reduced graphene oxide: Facile synthesis and their application as enhanced nanoelectrocatalyst for H₂O₂ reduction, **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 2, p. 2339–2346, 2010. DOI:10.1021/am100372m

139. BENCHIROUF, A.; MÜLLER, C.; KANOUN, O. Electromechanical Behavior of Chemically Reduced Graphene Oxide and Multi-walled Carbon Nanotube Hybrid Material, **Nanoscale Research Letters**, v. 11, p. 1–7, 2016. DOI:10.1186/s11671-015-1216-5.

140. SKOOG, A. .; HOLLER, J. . Princípios de análise instrumental. *Porto Alegre:Bookman*, 2001.

141. BOZOLLA JJ. RUSSEL LD. *Electron Microscopy: principles and techniques for biologists*. 2° ed. Sudbury: MA Jones and Bartlett, 1999.

142. BOYDE A. *Pros and cons of critical point drying and freeze drying for SEM*. Scan Electr Microsc,; v. 2, p. 303, 1978.

143. Murrieta-Pazos, I., Gaiani, C., Galet, L. & Scher, J. (2012). Composition gradient from surface to core in dairy powders: Agglomeration effect. *Food Hydrocolloids*, 26, 149–158. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.05.003>

144. Murrieta-Pazos, I., Galet, L., Rolland, C., Scher, J., & Gaiani, C. (2013). Interest of energy dispersive X-ray microanalysis to characterize the surface composition of milk powder particles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 111, 242–251. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.05.025>

145. NOSSOL, E., NOSSOL, A. B., GUO, S. X., ZHANG, J., FANG, X. Y., ZARBIN, A. J., & BOND, A. M. . Synthesis, characterization and morphology of reduced graphene oxide–metal–TCNQ nanocomposites. *Journal of Materials Chemistry C*, v. 2, n. 5, p. 870-878, 2014.

146. TOH, S. Y. *et al.* Graphene production via electrochemical reduction of graphene oxide: Synthesis and characterisation. *Chemical Engineering Journal*, v. 251, p. 422-434. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2014.04.004>

147. CHEN, L. *et al.* Direct electrodeposition of reduced graphene oxide on glassy carbon electrode and its electrochemical application. *Electrochemistry Communications*, v. 13, n. 2, p. 133-137, 2011. <http://doi.org/10.1016/j.elecom.2010.11.033>

148. BAZRAFSHAN, H.; TESIEH, Z. A.; DARBINIA, S.; TOUBA, R. S.; MANGHABATI, H.; NASERNEJAD, B. Synthesis of novel α - Fe₂O₃ nanorods without surfactant and its electrochemical performance. **Powder Technology**, v. 308, p. 266-272, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2016.12.015>

149. NOSSOL, E., ZARBIN, A. J. G., A Simple and Innovative Route to Prepare a Novel Carbon Nanotube/Prussian Blue Electrode and its Utilization as a Highly Sensitive H₂O₂ Amperometric Sensor. **Advanced Functional Materials**, v. 19, p.3980-3986, 2009. <https://doi.org/10.1002/adfm.200901478>
150. MATTOS, I. L.; GORTON, L. Filmes de metal-hexacianoferrato: Uma ferramenta em química analítica. **Química Nova**, v. 24, n. 2, p. 200 -205, 2001.
151. ZHANG, D.; WANG, K.; SUN, D.; XIA.; CHEN, H. Potentiodynamic deposition of Prussian Blue from a solution containing single component of ferricyanide and its mechanism investigation. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 7, p. 561, 2003 <http://dx.doi.org/10.1007%2Fs10008-003-0420-x>
152. FERRARI, A. C.; ROBERTSON, J. Interpretation of Raman spectra of disordered and amorphous carbon. *Physical Review B*, v. 61, n. 20, p. 14095- 14107, 2000. <http://doi.org/10.1103/PhysRevB.61.14095>
153. SHARMA, R. et al. ZnO anchored graphene hydrophobic nanocomposite based bulk heterojunction solar cells showing enhanced short-circuit current. *Journal of Materials Chemistry C*, v. 2, n. 38, p. 8142-8151, 2014. <http://doi.org/10.1039/C4TC01056F>
154. GANGWAR, P.; SINGH, S.; KHARE, N. Study of optical properties of graphene oxide and its derivatives using spectroscopic ellipsometry. *Applied Physics A*, v. 124, n. 9, p. 620, 2018. <http://doi.org/10.1007/s00339-018-1999-1>
155. SRIVASTAVA, M. et al. Preparation and characterization of self-assembled layer by layer NiCo₂O₄–reduced graphene oxide nanocomposite with improved electrocatalytic properties. *Journal of Alloys and Compounds*, v. 590, p. 266-276, 2014. <http://doi.org/10.1016/j.jallcom.2013.12.111>
156. L. Samain, F. Grandjean, G. J. Long, P. Martinetto, P. Bordet, D. Strivay. *J. Phys. Chem. C*, **2013**, 117, 9693–9712. <https://doi.org/10.1021/jp3111327>
157. R. R. Ernst, *J. Raman Spectrosc.*, **2009**, 41, 275-287. <https://doi.org/10.1002/jrs.2443>
158. MAŽEIKIEN, R.; NIAURA, G.; MALINAUSKAS, A. Electrocatalytic reduction of hydrogen peroxide at Prussian blue modified electrode: An in situ Raman spectroelectrochemical study, **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 660, p. 140–146, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2011.06.022>
159. MATHKAR, A. et al. "Controlled, stepwise reduction and band gap manipulation of graphene oxide", *Journal of Physical Chemistry Letters* v. 3, pp. 986–991, 2012. <https://doi.org/10.1021/jz300096t>
160. JANG, S-C.; HALDORAYS, Y.; LEE, G-W.; HWANG, S-K.; HAN, Y-K.; ROH, C.; HUH, Y. S. Porous three-dimensional graphene foam/Prussian blue composite for efficient removal of radioactive ¹³⁷Cs. **Scientific Reports**, v. 5, n. 17510, 2015. <https://doi.org/10.1038/srep17510>

161. LI, X-D.; LIANG, X-L.; MA, F.; JIANG, L-J.; YANG, Y-B.; FENG, S-S.; FU, G-L.; YUE, X-L.; DAI, Z-F. Chitosan stabilized Prussian blue nanoparticles for photothermally enhanced gene delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 123, p. 629 – 638, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.10.001>
162. J. I. Paredes, S. Villar-Rodil, A. Martínez-Alonso, J. M. D. Tascón, *Langmuir* **2008**, *24*, 10560–10564. <https://doi.org/10.1021/la801744a>
163. I. K. Moon, J. Lee, R. S. Ruoff, H. Lee, *Nat. Commun.*, **2010**, *1*, 1-6. <https://doi.org/10.1038/ncomms1067>
164. Gosser, D. K. *Cyclic Voltammetry: Simulation and Analysis of Reaction Mechanisms*; VCH: New York, 1993; p 43. <https://doi.org/10.1002/elan.1140070324>
165. ZANELLO, P.; NERVI, C.; DE BIANI, F. F. **Inorganic electrochemistry: theory, practice and application**. Royal Society of Chemistry, 2011.
166. GUIDELINE, I. H. T. **Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1)**. 2005.
167. W.H. Zhou, J. Liu, E.K. Wang, Determination of aminopyrine and its metabolite by capillary electrophoresis electrochemical detection, *J. Chromatogr. A* **715** (1995) 355–360. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(95\)00600-R](https://doi.org/10.1016/0021-9673(95)00600-R)
168. J. Zhao, Z. Chen, X. Li, J. Pan, A novel microchip based on indium tin oxide coated glass for contactless conductivity detection, *Talanta* **85** (2011) 2614–2619. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.08.029>
169. H. Yin, Y. Zhou, T. Liu, T. Tang, S. Ai, L. Zhu, Determination aminopyrine in pharmaceutical formulations based on APTS-Fe₃O₄ nanoparticles modified glassy carbon electrode, *J. Solid State Electrochem.* **16** (2012) 731–738. <http://dx.doi.org/10.1007/s10008-011-1418-4>.
170. Li H, Wang E (1995) *Electroanalysis* **7**:280–282. <https://doi.org/10.1002/elan.1140070315>
171. E. Kalmar, B. Kormanyos, G. Szakonyi, G. Dombi, Validated HPLC determination of 4-dimethylaminoantipyrine in different suppository bases, *Indian J. Pharm. Sci.* **76** (2014) 31–37. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc4007253/>.