

Uporaba polielektrolita u razvoju elektrokemijskih senzora metodom "sloj na sloj"

Ripić, Ivana

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:767890>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-07**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

UPORABA POLIELEKTROLITA U RAZVOJU
ELEKTROKEMIJSKIH SENZORA METODOM
"SLOJ NA SLOJ"

ZAVRŠNI RAD

IVANA RIPIĆ

Matični broj: 377

Split, rujan 2020.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE

UPORABA POLIELEKTROLITA U RAZVOJU
ELEKTROKEMIJSKIH SENZORA METODOM
"SLOJ NA SLOJ"

ZAVRŠNI RAD

IVANA RIPIĆ
Matični broj: 377

Split, rujan 2020.

**UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
UNDERGRADUATE STUDY IN CHEMISTRY**

**POLYELECTROLYTES ASSEMBLY FOR
ELECTROCHEMICAL SENSING APPLICATION BY
LAYER-BY-LAYER METHOD**

BACHELOR THESIS

IVANA RIPIĆ

Parent number: 377

Split, September 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu
Preddiplomski studij kemije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

Tema rada je prihvaćena na 28. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta

Mentor: izv. prof. dr. sc. Marijo Buzuk

Pomoć pri izradi: /

UPORABA POLIELEKTROLITA U RAZVOJU ELEKTROKEMIJSKIH SENZORA METODOM "SLOJ NA SLOJ"

IVANA RIPIĆ, 377

Sažetak:

Razvoj osjetilnih premaza, važnih elemenata senzora koji ujedinjuju funkcionalnost, jednostavnost, kemijsku i fizičku stabilnost, ima veliku ulogu u napretku elektrokemijskih senzorskih sustava. Zbog svoje raznolikosti i jednostavnosti korištenja, polielektroliti su vrlo čest odabir u izradi elektrokemijskih osjetilnih slojeva. Polielektroliti se u strukturama elektrokemijskih senzora najčešće koriste za zarobljavanje (ugradnja, imobilizacija) raznih materijala u osjetilne slojeve. Ti materijali često mogu povećati osjetljivost, selektivnost te mogu služiti kao medijatori prijenosa elektrona između analita i pretvornika. Analitička izvedba se može značajno poboljšati sinergističkim učinkom materijala (osjetilni materijal, pretvornik, medijator) prisutnih u senzorskim strukturama. Strukture navedenih senzora se mogu postići primjenom raznih metoda (nakapavanje, umakanje), a jedna od najčešće korištenih metoda je metoda "sloj na sloj". Ovaj rad prikazuje primjenu navedene metode u razvoju raznih višeslojnih filmova i ulogu polielektrolita u tim strukturama.

Ključne riječi: polielektroliti, elektrokemijski senzori, sloj na sloj

Rad sadrži: 41 stranicu, 9 slika, 4 tablice, 50 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav povjerenstva za obranu:

1. Doc. dr. sc. Maša Buljac – predsjednik
2. Doc. dr. sc. Nives Vladislavić – član
3. Izv. prof. dr. sc. Marijo Buzuk – član-mentor

Datum obrane: 23.9.2020.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 33

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split

Faculty of Chemistry and Technology Split

Undergraduate Study in Chemistry

Scientific area: Natural sciences

Scientific field: Chemistry

Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 28

Mentor: Marijo Buzuk – PhD, associate prof.

Technical assistance: /

**POLYELECTROLYTES ASSEMBLY FOR ELECTROCHEMICAL SENSING APPLICATION BY
LAYER-BY-LAYER METHOD**

Ivana Ripić, 377

Abstract:

The development of sensing coatings, as important sensor elements that integrate functionality, simplicity, chemical stability, and physical stability, has been shown to play a major role in electrochemical sensing system development trends. Because of its versatility and scalability, polyelectrolytes are often used in development of electrochemical sensing layers. Polyelectrolytes are mainly used in electrochemical sensor architectures for entrapping (incorporation, immobilization, etc.) various materials into sensing layers. These materials can often increase sensitivity, selectivity and be used as mediators of electron transfer between an analyte and transducer. Analytical performance can be significantly improved by the synergistic effect of materials (sensing material, transducer, and mediator) present in these structures. Structures of said sensors can be achieved using different methods (drop-casting, dip-coating), and one of the most commonly used method is the layer-by-layer method. This work presents the application of this method in the development of various multilayer films and the role of polyelectrolytes in these structures.

Key words: polyelectrolytes, electrochemical sensors, layer-by-layer

Thesis contains: 41 pages, 9 figures, 4 tables, 50 references

Original in: Croatian

Defence committee:

- | | |
|---|--------------|
| 1. Maša Buljac – PhD, assistant prof. | chair person |
| 2. Nives Vladislavić – PhD, assistant prof. | member |
| 3. Marijo Buzuk – PhD, associate prof. | supervisor |

Defence date: September 23rd, 2020.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 33

Završni rad je izrađen u Zavodu za opću i anorgansku kemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Marija Buzuka, u razdoblju od srpnja do rujna 2020. godine.

Zahvaljujem se svojoj obitelji i prijateljima na podršci i savjetima tijekom studiranja.

Također se zahvaljujem svim profesorima koje sam susrela prilikom studiranja na prenesenom znanju.

I na kraju se želim zahvaliti svom mentoru, izv.prof. dr. sc. Mariju Buzuku na stručnim savjetima i smjernicama prilikom izrade ovog završnog rada.

ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

1. Upoznavanje s konceptom i podjelom polielektrolita
2. Uvid u kemijska i fizikalna svojstva polielektrolita
3. Uporaba polielektrolita u razvoju modificiranih elektroda
4. Pregled recentne literature o uporabi polielektrolita u sloj na sloj metodi kod razvoja elektrokemijskih senzorskih sustava

SAŽETAK

Razvoj osjetilnih premaza, važnih elemenata senzora koji ujedanju funkcionalnost, jednostavnost, kemijsku i fizičku stabilnost, ima veliku uloga u napretku elektrokemijskih senzorskih sustava. Zbog svoje raznolikosti i jednostavnosti korištenja polielektroliti su vrlo čest odabir u izradi elektrokemijskih osjetilnih slojeva. Polielektroliti se u strukturama elektrokemijskih senzora najčešće koriste za zarobljavanje (ugradnja, imobilizacija) raznih materijala u osjetilne slojeve. Ti materijali često mogu povećati osjetljivost, selektivnost te mogu služiti kao medijatori prijenosa elektrona između analita i pretvornika. Analitička izvedba se može značajno poboljšati sinergističkim učinkom materijala (osjetilni materijal, pretvornik, medijator) prisutnih u senzorskim strukturama. Strukture navedenih senzora se mogu postići primjenom raznih metoda (nakapavanje, umakanje), a jedna od najčešće korištenih metoda je metoda "sloj na sloj". Ovaj rad prikazuje primjenu navedene metode u razvoju raznih višeslojnih filmova i ulogu polielektrolita u tim strukturama.

Ključne riječi: polielektroliti, elektrokemijski senzori, sloj na sloj

SUMMARY

The development of sensing coatings, as important sensor elements that integrate functionality, simplicity, chemical stability, and physical stability, has been shown to play a major role in electrochemical sensing system development trends. Because of its versatility and scalability, polyelectrolytes are often used in development of electrochemical sensing layers. Polyelectrolytes are mainly used in electrochemical sensor architectures for entrapping (incorporation, immobilization, etc.) various materials into sensing layers. These materials can often increase sensitivity, selectivity and be used as mediators of electron transfer between an analyte and transducer. Analytical performance can be significantly improved by the synergistic effect of materials (sensing material, transducer, and mediator) present in these structures. Structures of said sensors can be achieved using different methods (drop-casting, dip-coating), and one of the most commonly used method is the layer-by-layer method. This work presents the application of this method in the development of various multilayer films and the role of polyelectrolytes in these structures.

Key words: polyelectrolytes, electrochemical sensors, layer-by-layer

SADRŽAJ

Uvod	1
1. Polielektroliti	2
1.1. Klasifikacija PE	2
1.2. Kompleksi polielektrolita	2
2. Metoda sloj na sloj u razvoju i konstrukciji senzora	4
2.1. Višeslojni film koji se sastoji od dvije komponente (sloja).....	4
2.1.1. Osjetilni element sastavljen od 2 naizmjenična sloja: PE i osjetilne (S) /medijatorske (M) /pretvorničke (T) komponente	4
2.1.1.1. Redoks medijatori (složene tvari/spojevi) kao sloj	9
2.1.1.2. Nanočestice metala ili metalnih oksida kao sloj	9
2.1.1.3. Nanočestice na bazi ugljika kao sloja	9
2.1.1.4. DNA kao sloj.....	10
2.1.1.5. Enzimi kao sloj.....	11
2.1.2. S/M/T materijal zarobljen s PE koji služi kao samostalan sloj u višeslojnom filmu sastavljenom od 2 naizmjenična sloja	12
2.1.2.1. Me ili MeO nanočestice-PE kao sloj	12
2.1.2.2. Nanočestice bazirane na ugljiku-PE kao sloju	12
2.2. Višeslojni film koji se sastoji od više od dvije komponente (sloja)	13
2.2.1. Višeslojni film od 3 ili više ponavljajućih slojeva.....	17
2.2.1.1. Redoks medijatori kao sloj	17
2.2.1.2. DNA kao sloj.....	17
2.2.1.3. Enzim kao sloj.....	17
2.2.2. Višeslojni film od 2 ili više različitih višesloja.....	18
2.2.2.1. Me ili MeO nanočestice kao sloj.....	18
2.2.2.2. Nanomaterijali bazirani na ugljiku kao sloj	18
2.2.2.3. Enzim kao sloj.....	18

2.3. Višeslojni film kao supstrat za depoziciju osjetilnog sloja.....	19
2.3.1. Redoks medijatori u prekursorim višeslojnim filmovima.....	24
2.3.2. Me ili MeO nanočestice u prekursorim višeslojnim filmovima	24
2.3.3. DNA u prekursorim višeslojnim filmovima	25
2.3.4. Nemodificirani PE u prekursorim višeslojnim filmovima.....	26
2.4. LbL metoda u razvoju kompozitnih nanočestica.....	26
2.4.1. Složene nanočestice (nanosfere, čestice šuplje ljuske, sonde).....	26
2.4.2. LbL metoda u drugim strukturama senzora	29
3. Zaključak.....	31
Popis kratica	32
4. Literatura	36

Uvod

Polielektroliti (PE) su polimeri koji u svojoj strukturi sadržavaju brojne ionske skupine koje disociraju u vodenim otopinama [1, 2]. Prisutnost pozitivno ili negativno nabijenih skupina omogućava im interakciju kako sa drugim polielektrolitima (polielektrolitni kompleksi) tako i sa različitim nabijenim vrstama [2]. Zbog svoje dvojne prirode imaju veliku primjenu. Optički senzori [3], sustavi za dostavu lijekova u organizmu [4], membrane gorivih ćelija [5], implantati [6], elektrokemijski senzori [7] samo su neke od njih. U navedenim primjerima PE se nalaze u obliku tankog funkcionalnog filma nanesenog na odgovarajući supstrat. Razvijene su brojne metode depozicije slojeva polielektrolita, a od kojih se metoda sloj na sloj (eng. layer-by-layer) ističe zbog svoje jednostavnosti i prilagodljivosti. Sloj na sloj (LbL) metoda temelji se na adsorpciji suprotno nabijenih vrsta (najčešće polielektrolita) na željenoj površini [8]. Jedna od glavnih karakteristika ove metode je što se struktura nastalih filmova može kontrolirati na nano-razini. Mogućnost kontrole strukture filmova, a samim time i debljine nastalih slojeva posebno je važna kod konstrukcije elektrokemijskih senzora jer oni zahtijevaju što tanji film kako bi elektroni morali prijeći što kraći put [9]. Prilagodljivost LbL metode očituje se u tome što se uz polielektrolite u filmove mogu ugraditi bilo koje nabijene vrste kao što su proteini tj. enzimi, DNA, metalni oksidi, nanočestice [10].

U ovom radu, prikazati će se uloga polielektrolita u pripravi elektrokemijskih senzora za određivanje raznih analita kao što su DNA, glukoza, urea, pesticidi, vodikov peroksid itd. Također će se prikazati moguće strukture LbL filmova te načini imobilizacije raznih senzornih materijala (pr. enzimi, DNA, nanočestice metala ili metalnih oksida, proteini).

1. Polielektroliti

Polielektroliti (PE) su makromolekule s ponavljajućim jedinicama koje disociraju u polarnom mediju te pritom daju pozitivno ili negativno nabijene lance [11]. Posjeduju svojstva i polimera i elektrolita. Zahvaljujući svojoj elektrolitskoj prirodi disociraju u vodenim otopinama pri čemu imaju naboj ovisno o pH vrijednosti te su vodljivi. S druge strane, kao i polimeri, imaju viskozne otopine (viskoznost ovisi o molekulskoj masi i koncentraciji PE) [12]. Ovisno o ionskoj jakosti otopine, PE mogu imati različiti oblik. U otopinama s malom ionskom jakosti PE teže ispruženoj formi, dok se u otopinama s velikom ionskom jakosti skupljaju [11].

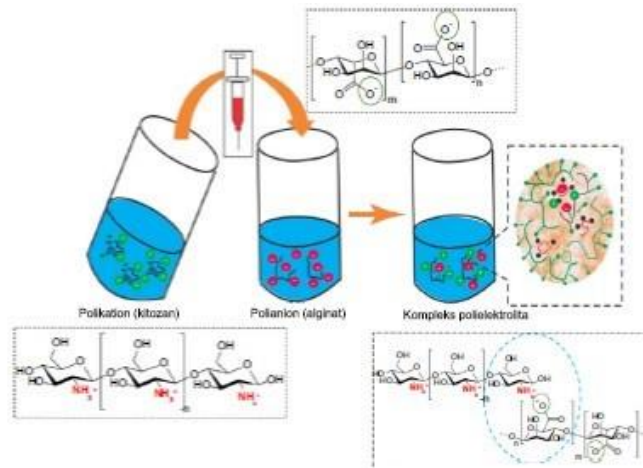
1.1. Klasifikacija PE

PE se mogu klasificirati s obzirom na porijeklo, naboj, stupanj ionizacije, oblik, kompoziciju. S obzirom na porijeklo dijele se na prirodne (nukleinske kiseline, proteini), poluprirodne (ksantan guma) i sintetske (poli(akrilna kiselina)). Nadalje, ovisno o naboju PE se dijele na polikatione, polianione ili, ako su prisutni i pozitivni i negativni naboji, poliamfolite. Kao i svi elektroliti, obzirom na stupanj ionizacije odnosno ovisi li njihova disocijacija o pH vrijednosti dijele se na slabe i jake. Slabi PE imaju konstantu disocijacije (pK) između 0-14 što znači da stupanj njihove disocijacije ovisi o pH. Jaki PE imaju pK manji od 0 i veći od 14 te stoga njihov stupanj disocijacije ne ovisi o pH. Ovisno o obliku PE se dijele na sferične (proteini) i čvrste štapičaste (poli(p-fenilen)). I u konačnici, s obzirom na njihovu kompoziciju dijele se na homopolimere i kopolimere. Homopolimerni PE su oni koji sadrže samo jednu vrstu ponavljajućih jedinica ili iona, dok se kod kopolimernih PE izmjenjuju jedinice ili pak ioni [2, 11].

1.2. Kompleksi polielektrolita

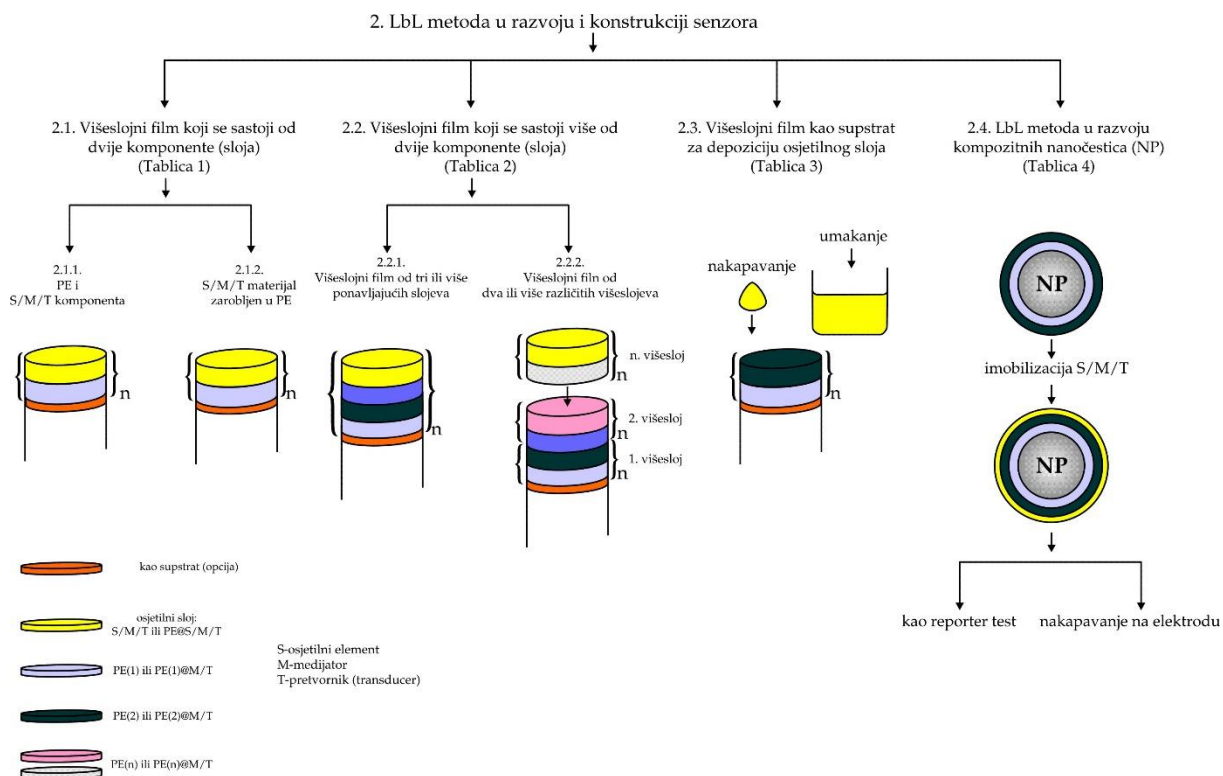
Kompleksi polielektrolita (PEC) nastaju miješanjem suprotno nabijenih polielektrolita u otopini (slika 1). Kompleksi nastaju kao posljedica elektrostatskih privlačenja među PE [13]. Osim elektrostatskih privlačenja, prisutne su i druge intermolekulske sile kao što su vodikove veze, van der Waalove sile, hidrofobne i dipolne interakcije [11]. Formiranje kompleksa i njihova stabilnost ovisi o mnogim čimbenicima kao što su: gustoća naboja, jačina i položaj ionskih mjesta, sterički faktori, krutost PE kostura, koncentracija i molekulska masa polielektrolita, stehiometrija te temperatura, ionska jakost i pH samog medija [11, 13]. Kao i kod svih polimera, prisustvo odgovarajućeg otapala (najčešće voda) uzrokuje bubrenje (engl. swelling) PEC što dovodi do promjene njihovih svojstava (povećanje propusnosti). Bubrenje kompleksa može dovesti do njihovih otapanja što se može spriječiti s fizikalnim ili

kemijskim unakrsnim vezama (eng. cross links) [14]. Količina otapala koju kompleks može upiti se kontrolira udaljenošću između unakrsnih veza [15]. Ovakvi polimeri ili PEC nazivaju se superapsorbirajućim polimerima ili hidrogelovima jer upijaju otapalo umjesto da se otapaju u njemu [14].



Slika 1 - Shematski prikaz formiranja kompleksa polielektrolita (PEC) [11]

2. Metoda sloj na sloj u razvoju i konstrukciji senzora



Slika 2 - Shematski prikaz mogućih struktura višeslojnih filmova nastalih primjenom sloj na sloj metode. [14]

2.1. Višeslojni film koji se sastoji od dvije komponente (sloja)

2.1.1. Osjetilni element sastavljen od 2 naizmjenična sloja: PE i osjetilne (S) /medijatorske (M) /pretvorničke (T) komponente

Višeslojni filmovi pripremaju se naizmjeničnim nanošenjem slojeva, a nastali filmovi služe kao osjetilni dio senzora. U ovom primjeru slojevi se sastoje od polielektrolita i S/M/T materijala. Najjednostavniji način za konstrukciju ovakvih slojeva je zarobljavanje S/M/T materijala između 2 sloja polielektrolita pritom pazeći da je S/M/T materijal suprotnog naboja od polielektrolita [14].

U tablici 1. dan je prikaz različitih struktura elektrokemijskih senzora koji su sastavljeni od višeslojnih filmova koji se sastoje od 2 samostalna sloja.

Tablica 1. Prikaz elektrokemijskih senzora sastavljenih od višeslojnih LbL filmova sa 2 sloja. Tablica je napravljena i modificirana po uzoru na [14]

2.1. Višeslojni filmovi sastavljeni od 2 sloja								
2.1.1. PE i S/M/T materijal								
2.1.1.1.Redoks medijatori (anorganski kompleksi) kao sloj								
PE	Senzorski element	Metoda modifikacije	Elektroda/ supstrat	Modifikacijski put	Konstrukcija senzora	Analit	Analitička metoda	Ref.
SiPy(+) Cl(-)	Tetrasulfo-ftalocijanin NiTsPc	LbL	ITO	LbL: SiPy(+)-NiTsPc(-)	ITO/LbL: SiPy-NiTsPc	dopamin	SWV	[16]
PEI(+)	Fosfotungistična kiselina H ₃ PW ₁₂ O ₄₀	LbL	ITO	LbL:PEI(+)-PTA(-)	ITO/LbL: PEI-PTA	Askorbinska kiselina i vodikov peroksid	CV	[17]
2.1.1.2. Me ili MeO nanočestice kao sloj								
PDDA(+)	IrO _x NPs	LbL	ITO	LbL printajući: PDDA(+)-IrO _x NPs(-)	ITO/LbL: PDDA-IrO _x NPs	pH	POT	[18]

Poliviologen PV(+)	AuNPs	LbL	Au	Au modif. s 2- merkaptotansulfonatom (MESA)(-); potom LbL: PV(+)-AuNPs(-)	Au@MESA/ LbL: PV-AuNPs	H ₂ O ₂	AMP	[19]
2.1.1.3. Nanočestice temeljene na ugljiku kao sloj								
PAH(+)	GO	LbL	GCE	LbL: PAH(+)-GO; potom redukcija GO s NaBH ₄ kako bi se dobio rGO	GCE/LbL: PAH – rGO	Cu ²⁺	DPASV	[20]
Konjugi- rani PE: PBCSO₃(-)	Grafen (rGO)	Elektrokem. Taloženje/ LbL	GCE	Elektrokem. tal.i istovremena redukcija GO na GCE; potom LbL: PBCSO ₃ (-)-rGO	GCE/ErGO/ LbL: PBCSO ₃ -rGO	Policiklički aromatski ugljiko- vodici	DPV	[21]
2.1.1.4. DNA kao sloj								
PAH(+)	ssDNA	LbL	SiO ₂	SiO ₂ (-) pri fiziološkom pH; potom LbL: PAA(+)-ssDNA(-)	SiO ₂ /LbL: PAA-ssDNA	cDNA	IMP	[22]
PAH(+)	ssDNA	LbL	FE čip SiO ₂	LbL: PAH(+)-ssDNA(-)	FE čip/LbL: PAH-ssDNA	cDNA	EIS	[23]

2.1.1.5. Enzim kao sloj								
PAH(+)	Sarkozin oksidaza (SOD)	LbL	Au	Benzenditiol (BDT) se imobilizira na Au; zatim se Au elektroda uranja u Cd/SeQD@BDT; potom LbL: SOD-PAH(+)	Au@BDT/QD@BD T/ LbL: SOD-PAH	Sarkozin	AMP – foto struja	[24]
PAMAM (+); PAH(+)	Penicilaza	LbL	FET (Si/SiO ₂)	LbL: PAMAM(+) ili PAH(+)- penicilaza	FET/LbL: PAMAM ili PAH – penicilaza	Penicilin	EIS	[25]
2.1.2. Samostalan sloj sastavljen od S/M/T materijala zarobljenog između PE								
2.1.2.1. Me ili MeO nanočestice-PE kao sloj								
SiPy(+)/Cl(-); HA(-)	PtNPs@SiPy	LbL	FTO	Redukcija PtCl ₆ ⁻ u prisutnosti SiPy(+); potom LbL: HA(-)-PtNPs@SiPy(+) i obratno	FTO/ LbL: HA-PtNPs@SiP	17 α- etinil estradiol, EE2	DPV	[26]
CS(+); PSS(-)	Me ⁿ⁺ @CS Me ⁿ⁺ = Cu ²⁺ , Ni ²⁺ , Ag ⁺	LbL	Kvarcna, silicijska podloga ; ITO	Supstrat/LbL: Me ⁿ⁺ @CS(+)-PSS(-); potom kemijska redukcija Me ⁿ⁺ na filmu	Supstrat/ LbL: Me@CS-PSS	glukoza	CV	[27]

2.1.2.2. Nanočestice temeljene na ugljiku-PE kao sloju

2.1.2.2. Nanočestice temeljene na ugljiku-PE kao sloju								
PSS(-); PAH(+)	rGO@PSS/ rGO@PAH	LbL	Ugljikov film	LbL: rGO@PSS(-)- rGO@PAH(+)	Ugljikov film/ LbL: rGO@PSS-rGO@PAH	NO ₂	otpor	[28]
PDDA(+)	Enzim- AChE	LbL	GCE	LbL: SWCNTs@PDDA(+)- AChE(-)	GCE/LbL: SWCNTs@PDDA- AChE	Karbaril- pesticid	AMP	[29]

2.1.1.1. Redoks medijatori (složene tvari/spojevi) kao sloj

Za elektrokemijsko određivanje dopamina u prisutnosti askorbinske kiseline (AK) i mokraćne kiseline Santos i sur. [16] konstruirali su senzor LbL modifikacijom površine staklene elektrode od indij-kositar oksida (ITO). Za formiranje slojeva korišteni su 3-n-propilpiridin silseskvioksan polimer (SiPy^+Cl^-) i niklov (II) tetrasulfoftalocijanin (NiTsPc). SiPy^+Cl^- je kationski polielektrolit, topljiv u vodi, koji radi stabilne tanke filmove na mnogim površinama. Upravo zbog svoje sposobnosti da formira stabilne filmove na raznim površinama, SiPy^+Cl^- se dodaje NiTsPc koji kao samostalan sloj pokazuje nestabilnost u voltametrijskim mjerenjima uzrokovanu elektrostatskim odbijanjima s površinom ITO elektrode (oboje negativno). Ovako konstruiran elektrokemijski senzor pokazuje dobru selektivnost, nisku granicu određivanja te daje brz odgovor što ga uz njegovu jednostavnost u pripremi i jeftinost čini pogodnim za istovremenu analizu dopamina i mokraćne kiseline.

Površina ITO elektrode se može modificirati i naizmjeničnim nanošenjem tankog sloja poli(etilenimina) (PEI) i fosfotungstične kiseline (PTA). Ovako konstruiran elektrokemijski senzor pokazuje veliku selektivnost za određivanje vodikovog peroksida H_2O_2 ili pak askorbinske kiseline (vitamin C) [17].

2.1.1.2. Nanočestice metala ili metalnih oksida kao sloj

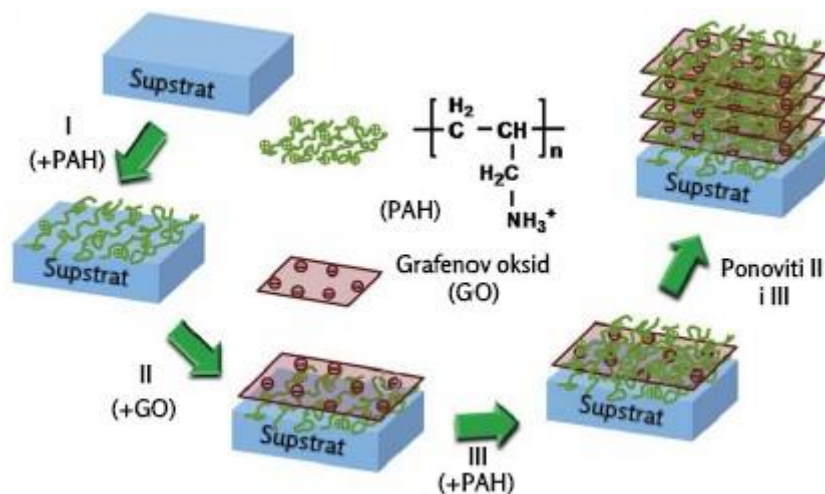
Jović i sur. [18] konstruirali su uporabom nanočestica metalnih oksida (iridijev oksid) i polikationskog polielektrolita pH osjetljiv LbL film. Tiskani slojevi negativno nabijenih nanočestica iridijevog oksida (IrOx) i pozitivno nabijenog polidialildimetilamonijevog (PDDA) polimera su naizmjenično nanosili na površinu ITO/PET (polietilentereftalat) elektrode.

LbL film Au nanočestica inkapsuliranih s kloridnim ionom Cl^- i derivata poliviologena korišten je za amperometrijsko određivanje vodikovog peroksida H_2O_2 . Prije formacije LbL filma, Au elektroda se mora modificirati kako bi površina elektrode bila negativno nabijena. Navedeni senzor pokazuje veliku selektivnost koja se pripisuje sinergističkom djelovanju Au nanočestica i poliviologena [19].

2.1.1.3. Nanočestice na bazi ugljika kao sloja

Za izradu elektrokemijskih senzora mogu se koristiti i nanočestice na bazi ugljika koje se LbL metodom nanose na površinu elektrode. Pritom treba paziti da su čestice suprotno nabijene od polielektrolita koji se koristi. Osnovna uloga ugljikovih nanočestica je prijenos elektrona odnosno povećavanje elektroaktivne površine elektrode [14].

Primjer takvog elektrokemijskog senzora jest senzor za određivanje Cu(II) iona sastavljen od slojeva pozitivno nabijenog polialilamin hidroklorida (PAH) bogatog primarnim amino skupinama i grafenovog oksida (GO) na staklenoj ugljikovoj elektrodi (slika 3). Za navedeni senzor redukcija grafenovog oksida u grafen vrši se tek nakon formiranja [PAH-GO]_n slojeva na površini elektrode [20].

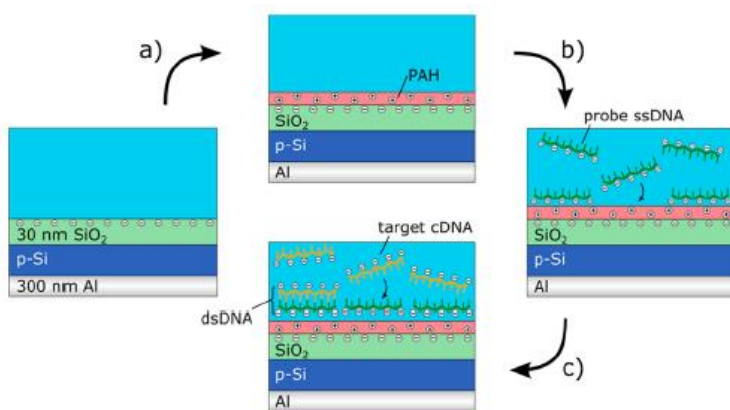


Slika 3 - Shematski prikaz nastajanja [PAH-GO]_n/GCE senzora za određivanje bakrovih (II) iona. [20]

Staklena ugljikova elektroda također se može modificirati nanošenjem slojeva konjugiranog polielektrolita PBCSO₃Na i grafena. Prije nanošenja navedenih slojeva na samu površinu elektrode se nanosi grafenov oksid koji se potom elektrotreducira u E-rGO. Navedeni elektrokemijski senzor upotrebljen je za voltametrijsko određivanje policikličkih aromatskih ugljikovodika koji su sveprisutni polutanti u okolišu [21].

2.1.1.4. DNA kao sloj

Mehanizam metoda za određivanje DNA temelji se na određivanju hibridizacije u kojem se jednolančana DNA (ssDNA) specifično veže za komplementarnu DNA (cDNA) čime nastaje DNA poznate strukture (slika 4). Jedan od načina određivanja DNA je određivanje njihovog unutarnjeg molekuskog naboja pomoću poluvodičkih uređaja s efektom polja (FED). Bronder i sur. konstruirali su EIS (eng. electrolyte-insulator-semiconductor) senzor, najjednostavniji FED, njegovom modifikacijom LbL metodom. Pozitivni PAH se adsorbira na negativno nabijena SiO₂ vrata tranzistora, a potom se negativno nabijena jednolančana DNA (ssDNA) imobilizira na prethodno nastali PAH sloj. Imobilizirana ssDNA zatim reagira tj. hibridizira s komplementarnom DNA (cDNA) [22].



Slika 4 - Shematski prikaz konstrukcije DNA senzora: a) adsorpcija PAH, b) imobilizacija jednolančane DNA (ssDNA), c) hibridizacija komplementarne DNA (cDNA) sa ssDNA. [22]

EIS senzori također su modificirani dvoslojem sastavljenog od polikationskog PAH i jednolančane DNA. Kao i u prethodnom senzoru, mehanizam rada senzora temelji se na određivanju unutarnjeg molekuskog naboja ciljane komplementarne DNA [23].

2.1.1.5. Enzimi kao sloj

Elektrokemijski senzor na bazi CdSe/ZnS kvantnih točaka upotrebljen je za određivanje koncentracije sarkozina. Enzim sarkozin oksidaza se pomoću PAH polielektrolita imobilizira na površinu kvantnih točaka. U prisutnosti sarkozina, SOD u kombinaciji s elektrodom od kvantnih točki uzrokuje promjenu u fotostruji (struja generirana zračenjem) zbog kompeticijskog odnosa s kisikom [24].

Poluvodički uređaji s efektom polja mogu se modificirati za određivanje enzima. Primjer takvog uređaja je senzor za određivanje penicilina. Površina vrata EIS je modificirana sa slojevima PAH/PAMAM (poli(amidoamin)) i slojem penicilinaze. Ovako konstruiran senzor prepoznaje promjene u lokalnoj vrijednosti pH u blizini površine EIS i naboju makromolekula uzrokovanom enzimskom reakcijom. Pomak napona ili signal senzora definiran je koncentracijom penicilina ili pH- ovisnim promjenama naboja SiO₂ površine ili promjenama unutar PE/enzim sloja [25].

2.1.2. S/M/T materijal zarobljen s PE koji služi kao samostalan sloj u višeslojnom filmu sastavljenom od 2 naizmjenična sloja

2.1.2.1. Me ili MeO nanočestice-PE kao sloj

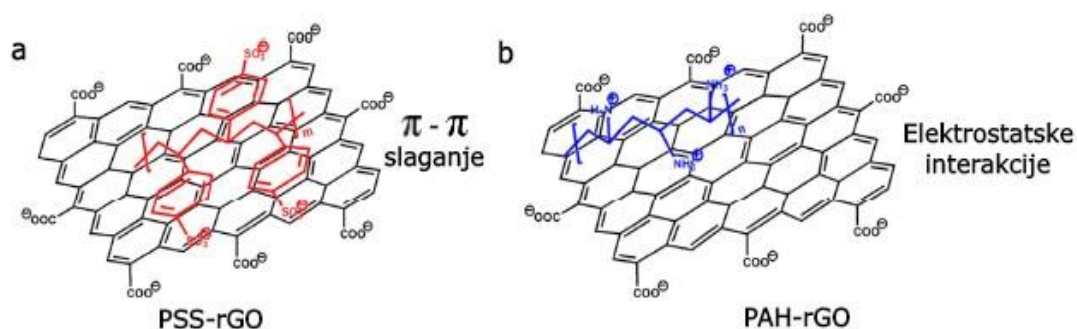
Metalne nanočestice se zbog svojih karakteristika kao što su velika aktivna površina i katalitička aktivnost sve češće nalaze kao dio polielektrolitnih LbL filmova. Uloga polielektrolita u takvim filmovima jest da stabiliziraju nanočestice te da im povećaju selektivnost tako što "zatvore" katalitički aktivna mjesta [9, 14].

Za određivanje 17-etinilestradiola razvijen je senzor od Pt nanočestica imobiliziranih u 3-n-propilpiridin silsekvioksanu i prirodnog polimera, huminske kiseline. Sinergistički učinak Pt-SiPy⁺Cl⁻ i huminske kiseline povećava elektroaktivna svojstva ovog senzora te omogućava primjenu senzora u određivanju derivata estrogena [26].

Za pripremu nanokompozitnih (eng. nanocomposite) filmova s višestrukim slojevima Xiong i sur. [27] koristili su pozitivno nabijeni hitozan (CS) sa srebrovim, bakrovim ili niklovim ionima i negativno nabijeni natrijev polistiren sulfonat (PSS). Nakon formiranja slojeva, provedena je redukcija s natrijevim tetrahidroboratom NaBH₄ kako bi se dobili Ag, Cu i Ni nanokompozitni filmovi. Nastale slojeve autori su koristili za određivanje glukoze.

2.1.2.2. Nanočestice bazirane na ugljiku-PE kao sloju

Li i sur. [28] konstruirali su senzor za određivanje NO_{2(g)} koristeći se LbL metodom. Za izradu slojeva koristili su grafenov oksid (GO) kojeg su reducirali u grafen rGO, kationski polielektrolit PAH te anionski polielektrolit polistirensulfonat (PSS) (slika 5). Obzirom da se rGO teško dispergira u vodenim otopinama, najprije su GO izložili otopinama polielektrolita i potom ga reducirali pri čemu su nastali slojevi PAH-rGO i PSS-rGO. Nastali senzor pokazuje veliku selektivnost, stabilnost te reproducibilnost.



Slika 5 - Shematski prikaz PSS-rGO i PAH-rGO filmova. [28]

Amperometrijski biosenzor za određivanje karbaril insekticida konstruirali su Firdoz i sur. [29]. Površinu staklene ugljikove elektrode (SCE) modificirali su LbL metodom. Jednozidne ugljikove nanocjevčice (SWCNTs) se dispergiraju u otopini poli(dialildimetilamonijevog klorida) (PDDA). SCE se potom uroni u pripremljenu otopinu SWCNTs-PDDA, a nakon formiranja slojeva uranja se u otopinu acetilkolin esteraze. Film [PDDA-SWCNTs/AchE]/GCE pokazuje veliku elektrokatalitičku aktivnost prema karbarilu što se prepisuje većoj površini i vodljivosti SWCNTs.

2.2. Višeslojni film koji se sastoji od više od dvije komponente (sloja)

Osim filmova sastavljenih od 2 sloja pri izradi elektrokemijskih senzora moguće je konstruirati i filmove od više (>2) različitih slojeva. Višeslojni filmovi koji imaju više od 2 sloja (spoja) mogu se podijeliti na filmove sa 3 ili više naizmjeničnih slojeva i na filmove s 2 ili više višeslojnih filmova. U tablici 2 prikazana je podjela filmova konstruiranih na jedan od dva navedena načina.

Tablica 2. Prikaz elektrokemijskih senzora sastavljenih od višeslojnih LbL filmova sa 2 ili više slojeva. Tablica je napravljena i modificirana po uzoru na [14]

2.2. Višeslojni filmovi koji imaju više od 2 sloja								
2.2.1. Višeslojni film od 3 ili više ponavljajućih slojeva								
2.2.1.1. Redoks medijatori kao sloj								
PE	Senzorni element	Metoda modifikacije	Elektroda/supstrat	Modifikacijski put	Konstrukcija senzora	Analit	Analitička metoda	Ref.
PEI(+)	NaMMT i NiTsPc	LbL	ITO	LbL: PEI(+)- MMT(-) -PEI(+)-NiTsPc	ITO/LbL: PEI-MMT-PEI-NiTsPc	Dopamin	DPV	[30]
PEI(+); PAH(+)	PB	LbL	Au	LbL: PEI(+)-PB(-)-PEDOT:PSS-PAH(+)	Au/LbL: PEI-PB-PEDOT:PSS-PAH	H ₂ O ₂	CV	[31]
2.2.1.2. DNA kao sloj								
PAH(+); PSS(-)	Plavi metilen (MB) i zeleni metilen (MG); DNA	Elektropolimerizacija/LbL	GCE	Elektropolimerizacija MB/MG na GCE; potom nastaju različite LbL strukture: 1. PSS-PAH; 2. DNA-PAH; 3. PSS-PAH-PSS; 4. PSS-PAH-DNA; 5. DNA-PAH-PSS	GCE/LbL: DNA-PAH-PSS	DNA	IMP	[32]

2.2.1.3. Enzim kao sloj								
PDDA(+)	LOx	LbL	Polikristalni Au (PGA)	LbL na tiolnoj (MPS) PGA površini (-): PDDA(+)-AuNPs-LOx	Au@MPS/ LbL: PDDA-AuNPs-LOx	L- laktat	AMP	[33]
2.2.2. Višeslojni film od 2 ili više različitih višeslojeva								
2.2.2.1. Me ili MeO nanočestice kao sloj								
PDDA(+); PSS(-)	Au	LbL	ITO	Nanopeleti grafena stabilizirani u PDDA(+) (GPDDA(+)) i PSS(-) (GPSS(-)); LbL: GPDDA(+)-GPSS(-); potom LbL: AuNP(+)-GPSS(-)	ITO/ LbL: GPDDA-GPSS/ LbL: AuNP-GSS	Metil paration	DPV	[34]
PDDA(+); PSS(-)	SiO ₂ NPs	LbL	ISFET	LbL: PDDA(+)-PSS(-); potom LbL: PDDA(+)-SWCNT(-) ILI In ₂ O ₃ NPs(-); potom LbL: PDDA(+)-SiO ₂ NPs(-)	ISFET/ LbL: PDDA-PSS/ LbL: PDDA-SWCNT ili In ₂ O ₃ NPs/ LbL: PDDA-SiO ₂ NPs	pH	Kemotpor	[35]

2.2.2.2. Nanomaterijali na bazi ugljika kao sloj								
CS(+); PAH(+); PDDA(+); PSS(-)	CS@SWCNTs	LbL	SiO ₂ pokrivena s Cr-Au	SiO ₂ @Cr-Au; potom LbL: PDDA(+)-PSS(-); potom LbL: PE(+)- SWCNTs(-)	SiO ₂ @Cr-Au/ LbL: PDDA-PSS/ LbL: PE-SWCNTs	pH	Kemo- otpor	[36]
2.2.2.3. Enzim kao sloj								
PAH(+); PSS(-)	GOx	Potapanje/ LbL	Au	Au modif. s 3-merkaptio-1-propansulfonskom kiselinom (MPS) (-); potom prekursorni dvoslojni film: PAH(+>@PSS(-); potom LbL: MWCNTs(->@PAH(+)-HRP; potom LbL: ConA (most između HRP i GOx)-GOx	Au@MPS/PAH@PSS/ LbL: MWCNTs@PAH- HRP/ LbL: ConA-GOx	Glukoza	AMP	[37]
PDDA(+); PSS(-)	SWCNTs; AChE	LbL	SiO ₂ / Cr/Au	LbL: PDDA(+)-PSS(-); potom LbL: PDDA(+)-SWCNTs(-); zatim sloj PDDA(+); potom LbL: PDDA(+)-PSS-AChE	SiO ₂ /Cr/Au/LbL: PDDA-PSS/LbL: PDDA- SWCNTs/PDDA/ LbL: PSS-AChE	pH, acetokolin	POT	[38]

2.2.1. Višeslojni film od 3 ili više ponavljajućih slojeva

2.2.1.1. Redoks medijatori kao sloj

Za određivanje dopamina de Lucena i sur. [30] istraživali su tri različite strukture filmova. Dva filma pripravljena su od PEI i montmorilonita odnosno NiTsPc, dok je treći film sastavljen kombinirajući PEI, montmorilonit i NiTsPc. Od navedenih filmova najbolje rezultate daje treći film.

Primjenom LbL metode napravljen je senzor za određivanje vodikovog peroksida H_2O_2 . Nanočestice berlinskog modrila (prusko plava, PB) imobilizirane su u slojevima različitih polielektrolita (PAH i PEI). PEI služi za imobilizaciju filma PB/PAH na površini zlatne elektrode. Dodatkom polimera poli(3,4-etilendioksitiofen)-poli(stirensulfonata) (PEDOT:PSS) povećavaju su elektroaktivne osobine filma te osjetljivost prema vodikovom peroksidu [31].

2.2.1.2. DNA kao sloj

Senzor za impedimetrijsko određivanje oštećenog DNA konstruiran je primjenom fenotijazinskih boja (metilen plava, metien zelena) i polielektrolitnih kompleksa koji uključuju DNA. Prethodno formiranju slojeva staklena ugljikova elektroda se elektropolimerizira s fenotijazinskim bojama koje služe kao medijatori u prijenosu elektrona. Napravljene su različite LbL strukture: 1. PSS-PAH; 2. DNA-PAH; 3. PSS-PAH-PSS; 4. PSS-PAH-DNA; 5. DNA-PAH-PSS. Filmovi kod kojih je DNA u neposrednom dodiru s elektropolimeriziranim filmovima pokazuju najveću osjetljivost, dok filmovi koji sadrže elektropolimeriziranu metilen plavu pokazuju veću selektivnost [32].

2.2.1.3. Enzim kao sloj

Za određivanje L-laktata napravljen je amperometrijski biosenzor sačinjen od LbL filma sastavljenog od PDDA, Au nanočestica i laktat oksidaze (LOx) nanesenog na tiol modificiranu polikristalnu zlatnu elektrodu [33].

2.2.2. Višeslojni film od 2 ili više različitih višesloja

2.2.2.1. Me ili MeO nanočestice kao sloj

Rodrigues i sur. [34] izradili su 2 različita LbL filma za određivanje metil parationa. Jedan LbL film sastojao se od naizmjeničnih slojeva GPDDA (grafenske nanopelete stabilizirane u PDDA)/GPSS, a drugi je uz GPDDA i GPSS imao i zlatne nanočestice. Metil paration različito reagira s navedenim slojevima. Na filmu koji se sastoji samo od GPDDA/GPSS se adsorbira na agregate grafena, dok se na filmu s Au nanočesticama ravnomjerno raspoređuje. Navedene razlike uzrokuju da GPDDA/GPSS film ima nižu granicu dokazivanja, a film s Au nanočesticama ima veće linearno dinamičko područje.

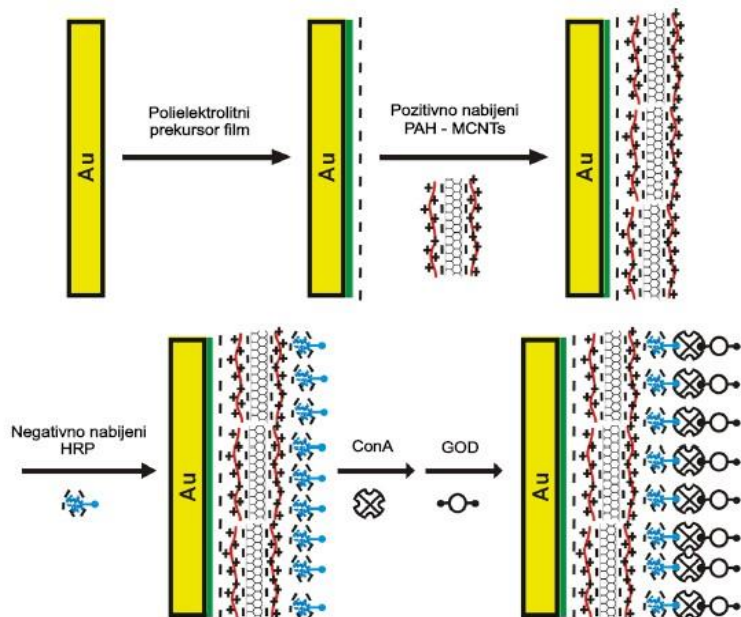
Ispitivana je uloga sloja nanočestica silicijevog (IV) oksida SiO_2 na provodnost poluvodičkog nanomaterijala. Kao poluvodički nanomaterijal Lee i sur. [35] koristili su SWCNTs i nanočestice indijevog (III) oksida In_2O_3 kojeg su formirali LbL metodom. Upotrijebili su tri filma. Prvi film, koji ima ulogu pojačivača naboja površine napravljen je naizmjeničnom depozicijom PDDA i PSS polielektrolita. Drugi film napravljen je od PDDA i SWCNTs/ In_2O_3 , a treći film napravljen je od PDDA i nanočestica SiO_2 .

2.2.2.2. Nanomaterijali bazirani na ugljiku kao sloj

Karboksilizirane SWCNTs sastavljene su LbL metodom naizmjeničnim slaganjem slojeva slabih polielektrolita s amino funkcionalnim grupama koji posjeduju različite konstante disocijacije (hitozan, PDDA, PAH). Naboj navedenih slabih polielektrolita ovisi o pH vrijednosti medija što utječe na vodljivost SWCNTs pa se stoga nastali film može koristiti za mjerenje pH vrijednosti [36].

2.2.2.3. Enzim kao sloj

Chen i sur. [37] su LbL metodom napravili biosenzor za određivanje glukoze temeljen na funkcionalnim ugljikovim nanocjevčicama i biospecifičnim interakcijama između šećera i lektina (slika 6). Na površinu prethodno modificirane (kako bi imala negativan naboj) zlatne elektrode nanosi se prekursori PAH-PSS film. Zatim se na prekursori film naizmjenično nanose slojevi PAH-MCNT (multifunkcionalne ugljikove nanocjevčice) i HRP (peroksidaze hrena). Na sloj HRP se potom LbL metodom formira višeslojni konkanavalin A (ConA) – glukoza oksidaza film.



Slika 6 - Shematski prikaz nastajanja biosenzora za određivanje glukoze zasnovanog na funkcionalnim ugljikovim nanocjevčicama i šećer-lektin interakcijama. [37]

Tanki sloj karboksiliranih jednozidnih ugljikovih nanocjevčica upotrebljen je za određivanje pH. Dodatkom acetilkolin esteraze (AChE) navedeni film može se koristiti za određivanje acetilkolina. Hidroliza acetilkolina uzrokuje promjenu u lokalnom pH u blizini SWCNT što dovodi do promjene potencijala elektrode u odnosu na referentnu elektrodu. Za određivanje pH SWCNT se modificiraju LbL metodom odnosno formira se PDDA/PSS + PDDA/SWCNT film. Kako bi se odredio acetilkolin potrebno je dodati još slojeve PDDA+ PSS/AChE [38].

2.3. Višeslojni film kao supstrat za depoziciju osjetilnog sloja

Polielektroliti se nalaze kao dio prekursornog filma kako bi se smanjile moguće interferencije supstrata i osjetilnog elementa. Također, primjenom polielektrolita osigurava se ravnomjerno raspoređeni naboj na površini. Prekursorni film je najčešće sastavljen od slabih polielektrolita (pr. PEI, PAH) [39].

Tablica 3. Prikaz elektrokemijskih senzora sastavljenih od prekursornih LbL filmova. Tablica je napravljena i modificirana po uzoru na [14]

2.3. Višeslojni film kao supstrat za depoziciju osjetilnog sloja								
2.3.1. Redoks medijatori u prekursornim višeslojnim filmovima								
PE	Senzorni element	Metoda modifikacije	Elektroda/supstrat	Modifikacijski put	Konstrukcija senzora	Analit	Analitička metoda	Ref.
PEI (+)	Aptameri (TBA; LBA)	LbL/nakapavanje	ITO	LbL: Fc@PEI(+)-CNTs(-); potom nakapavanje TBA/LBA; potom BSA (prevencija nespecifične adsorpcije)	ITO/ LbL: Fc@PEI-CNTs/ TBA ili LBA	Trombin, lizosomi	DPV	[40]
SiPy(+) Cl(-); Nafion® (-)	GOx	LbL/nakapavanje	FTO	LbL:SiPy(+)-CuTsPc(-); potom adsorpcija SiPy(+); potom nakapavanje GOx; potom nakapavanje Nafion®-a (-)	FTO/LbL:SiPy-CuTsPc/SiPy/GOx/Nafion®	Glukoza	AMP	[41]

2.3.2. Me ili MeO nanočestice u prekursorim višeslojnim filmovima

<p>PEI(+); PSS(-)</p>	<p>P₂Mo₁₇V</p>	<p>LbL/ umakanje</p>	<p>ITO</p>	<p>LbL: PSS(-)-PEI(+); potom uranjanje u AuCl⁴⁻ te redukcija s NaBH₄; potom uranjanje u AgNO₃ te redukcija s askorbinskom kiselinom; potom umakanje u otopinu P₂Mo₁₇V@PEI(+)</p>	<p>ITO/ LbL: PSS-PEI/ Au@2Ag/ P₂Mo₁₇V@ PEI</p>	<p>L- cistein</p>	<p>AMP</p>	<p>[42]</p>
<p>PSS(-); PDDA(+)</p>	<p>Anti- APOE-4</p>	<p>LbL/ elektrotaloženje</p>	<p>ITO</p>	<p>LbL: PDDA(+)-PSS(-); potom potenciostatska elektrodepozicija AuCl₄⁻ kako bi nastao fraktalni Au (FracAu); potom imobilizacija anti- APOE-4</p>	<p>ITO/ LbL: PDDA- PSS/FracAu/ anti- APOE-4</p>	<p>Protein APOE-4</p>	<p>AMP</p>	<p>[43]</p>

2.3.3. DNA u prekursorim višeslojnim filmovima

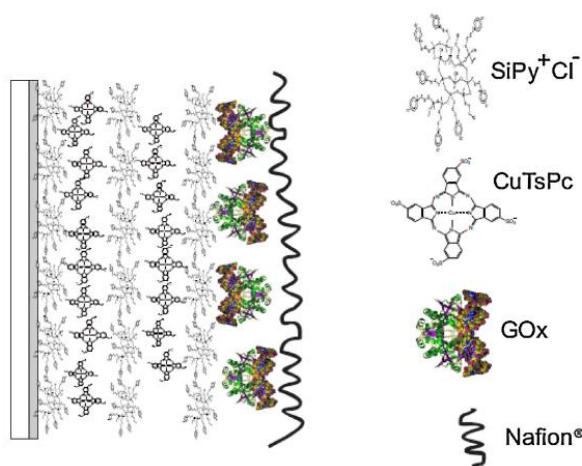
2.3.3. DNA u prekursorim višeslojnim filmovima								
PAA(+); PSS(-)	Enzim AChE	LbL/ drop-casting	GCE	Nakapavanje suspenzije Co-ftalocijanina (CoPc) i ugljkove paste; potom LbL: PAA(+)-PSS(-) ili PAA(+)-DNA(-); potom nakapavanje AChE	GCE/CoPc@CB/ LbL: PAA-PSS ili PAA-DNA/ AChE	Huperzin a i galantamin	AMP	[44]
2.3.4. Nemodificirani PE u prekursorim višeslojnim filmovima								
Polisaharid: CS(+); CMP(-)	Ureaza	LbL/ adsorpcija ili kovalentna imobilizacija enzima	Uglik	PANI(-) elektropolimeriziran na grafitu; potom LbL: CS(+)-CMP(-); potom nakapavanje ili kovalentna imobilizacija ureaze (karboimidna reakcija)	C/PANI/LbL: CS- CMP/enzim	Urea	POT	[45]

PDDA(+); PSS(-); Nafion®	GOx	LbL/ dip-coating	ITO	ZnONRs or NPs naneseni na ITO; potom LbL: PSS(-)-PDDA(+); potom umakanje GOx; potom Nafion®	ITO/ZnO NRs ili NPs/ LbL: PSS- PDDA/GOx/ Nafion®	Glukoza	AMP	[46]
---	-----	---------------------	-----	---	---	---------	-----	------

2.3.1. Redoks medijatori u prekursorim višeslojnim filmovima

Napravljena su dva elektrokemijska aptasenzora LbL metodom za dokazivanje proteina (trombin, lizosomi). LbL film napravljen je od poli(etilenimina) (PEI) kojem je dodan ferocen (Fc), ugljikovih nanocjevčica (CNT) i aptamera. Aptameri su oligonukleinske kiseline koje imaju visoku sposobnost prepoznavanja i vezanja za specifične molekule (mete). U prisutnosti odgovarajućeg analita aptamer koji se nalazi na vanjskom sloju LbL filma specifično veže analit i na taj način sprječava prijenos elektrona što dovodi do smanjenja signala Fc-PEI sloja. Za oba analita ovako pripremljen senzor pokazuje nisku granicu dokazivanja, visoku selektivnost, osjetljivost te stabilnost [40].

Za određivanje glukoze napravljen je biosenzor LbL modifikacijom površine elektrode od sloja kositrovog oksida dopiranog s fluorom (FTO) (slika 7). Na površinu su naizmjenično nanoseni slojevi SiPy^+Cl^- i bakrovog (II) tetrasulfoftalocijanina (CuTsPc). Na nastali film nanosen je novi sloj SiPy^+Cl^- te sloj glukoza oksidaze (GOx). Kako bi se spriječilo ispiranje enzima, na kraju je nanosen sloj Nafiona[®] [41].

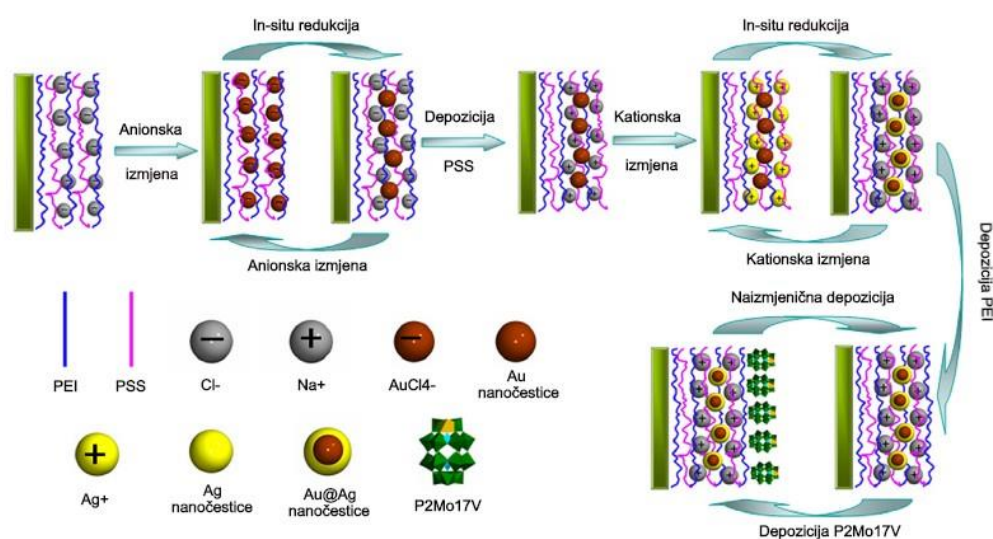


Slika 7 - Shematski prikaz pripreme biosenzora za određivanje glukoze. [41]

2.3.2. Me ili MeO nanočestice u prekursorim višeslojnim filmovima

Napravljen je složeni LbL film koji sadrži $\text{P}_2\text{Mo}_{17}\text{V}$ i $\text{Au}@2\text{Ag}$ nanočestice (slika 8). Na površinu elektrode se najprije nanosi višeslojni PEI-PSS film koji služi kao prekursori film. PEI-PSS sloju se dodaje dodatni PEI sloj te se nastali film uranja u otopinu tetrakloroauratne kiseline HAuCl_4 i kemijski reducira s natrijevim tetrahydroboratom NaBH_4 . Formirani sloj Au nanočestice se uranja u otopinu srebrovog nitrata te reducira kako bi se formirale srebreve nanočestice. U konačnici, nastali film uranja se u otopinu $\text{P}_2\text{Mo}_{17}\text{V}$ i nastaje složeni film. Au-Ag nanočestice jezgrene ljuske ovom senzoru omogućuju široko linerarno dinamičko

područje, veliku selektivnost te nisku granicu dokazivanja. Navedeni senzor upotrebljava se za dokazivanje L-cisteina [42].



Slika 8 - Shematski prikaz konstrukcije LbL filma sastavljenog od Au@2Ag nanočestica jezgrene ljuske i P₂Mo₁₇V. [42]

Napravljen je elektrokemijski imunosenzor za kvantitativno određivanje APOE-4 proteina temeljen na fraktalnim nanostrukturama zlata (FracAu) i amplifikaciji enzima. Kako bi se na površinu elektrode elektrodepozicijom nanijele fraktalne nanostrukture zlata, ona se prethodno mora modificirati polielektrolitima (PDDA, PSS). Na površinu FracAu elektrode nanose se slojevi ljudskog antitijela APOE4 i ljudskih antitijela APOE4 obilježenih peroksidazom hrena (HRP). Navedeni APOE4 imunosenzor pokazuje nisku granicu dokazivanja, visoku specifičnost te osjetljivost [43].

2.3.3. DNA u prekursorim višeslojnim filmovima

Senzor za određivanje reverzibilnih AChE inhibitora (huperzin A, galantamin) napravljen je nekovalentnom imobilizacijom acetilkolinesteraze (AChE) na sloj polielektrolita. Površina GCE pokrivena je kobaltovim ftalocijaninom i ugljikovom pastom te je modificirana LbL metodom polielektrolitnim kompleksima (PAA-DNA ili PAA-PSS). DNA se koristi kao polianion jer u odnosu na uobičajene PE ima veću gustoću naboja te povećanom adsorpcijom enzima stabilizira površinske slojeve. AChE se nakapavanjem imobilizira na modificiranu elektrodu. AChE se u navedenom slučaju imobilizira nekovalentnom modifikacijom jer ona slabije utječe na steričku strukturu biopolimera, a to je posebice važno kod određivanja reverzibilnih inhibitora (interakcija se odvija van aktivnog mjesta enzima) [44].

2.3.4. Nemodificirani PE u prekursorim višeslojnim filmovima

Lakard i sur. [45] konstruirali su biosenzor za kvantitativno određivanje uree. Na ugljikovu elektrodu, na koju se prethodno elektrodepozicijom nanio polianilin, se LbL metodom nanosi polielektrolitni film. LbL film je građen od polisaharida karboksimetil pululana (CMP) i hitozana (CS). Uloga filma je da osigura stabilnost te poboljša imobilizaciju enzima. Enzim ureaza se kovalentno veže za vanjski sloj LbL filma (CMP) putem reakcije karboimidnog spajanja pri čemu također dolazi do međusobnog povezivanja polisaharidnog filma (amino grupe hitozana reagiraju s ostacima karboksilne kiseline karboksimetil pululana) što dodatno stabilizira film.

Za amperometrijsko određivanje glukoze, glukoza oksidaza je adsorbirana na nanostrukturama cinkovog (II) oksida ZnO koje osiguravaju imobilizaciju enzima. Prethodno adsorbiranju GOx, ITO elektroda s ZnO nanostrukturama modificirana je stvaranjem LbL filma koji se sastoji od PDDA i PSS polielektrolita. Nakon adsorpcije, na pripremljenu elektrodu se nanosi sloj Nafiona[®] kako bi se spriječio gubitak enzima [46].

2.4. LbL metoda u razvoju kompozitnih nanočestica

2.4.1. Složene nanočestice (nanosfere, čestice šuplje ljuske, sonde)

Tablica 4. Prikaz elektrokemijskih senzora napravljenih primjenom LbL metode u razvoju različitih složenih nanočestica/senzora. Tablica je napravljena i modificirana po uzoru na [14].

2.4. LbL metoda u razvoju složenih nanočestica								
2.4.1. Složene nanočestice (nanosfere, čestice šuplje ljuske, sonde)								
PE	Senzorni element	Metoda modifikacije	Elektroda/supstrat	Modifikacijski put	Konstrukcija senzora	Analit	Analitička metoda	Ref.
PAH(+); PSS(-)	Streptavidin/ AgNP- označene CNSs	LbL	Au; CNS	Prijavljena sonda: LbL na CNS: PAH(+)-PSS(-); potom u otopinu Ag ⁺ i citrata; potom u streptavidin	CNS/LbL: PAH-PSS/AgNPs/ streptavidin	DNA	LSV	[47]
PAH(+); PEI(+); PAA(-); PSS(-)	AChE i HRP	LbL/ nakapavanje	SPCE	LbL na PSS(-) (kao <i>template</i>): PAH(+)-PAA(-) ili PEI(+)-PAA(-); potom imobilizacija enzima na sferu PE miješajući je u otopinu enzima; potom nakapavanje na SPCE	SPCE/ LbL na PSS: PAH-PAA ili PEI-PAA/ HRP ili AChE	Pesticidi ili H ₂ O ₂	AMP	[48]

2.4.2. LbL metoda u drugim strukturama senzora

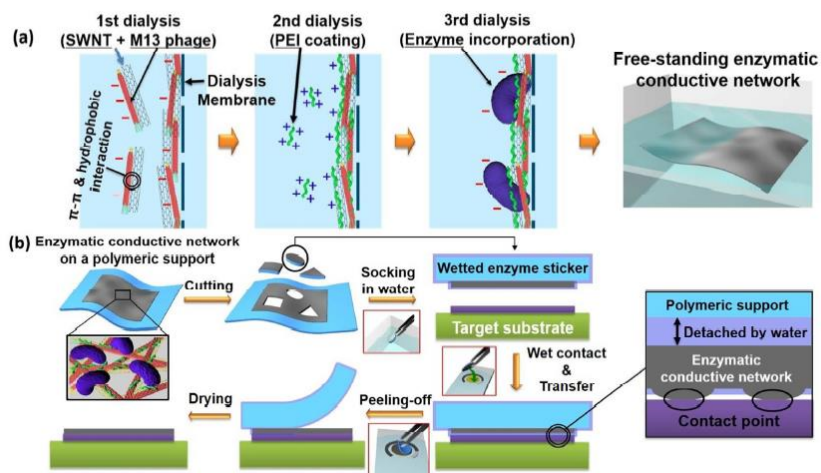
M13(-); PEI(+)	GO _x	LbL	SPAu	LbL na polimernoj membrani celuloza acetata dijalizom: SWCNTs@M13(-)-GO _x @PEI(+); potom <i>wet contact-transfer-print</i> na SPAu	SPAu/ LbL: SWCNTs@M13- GO _x @PEI	Glukoza	AMP	[49]
PDDA(+); CNNC(-)	PEDOT	LbL/ elektro-polimerizacija	GCE	LbL: elektrodepozicija PDDA(+)- potom uranjanje u CNNC(-); potom elektropolimerizacija EDOT	GCE/LbL: PDDA- CNNC/ PEDOT	Nitrit	AMP	[50]

Za određivanje DNA konstruirana je sonda napravljena kombinacijom homogenog recikliranja ciljanih DNA potpomognutog endonukleazom (eng. homogeneous endonuclease-assisted target DNA recycling) i streptavidinom funkcionaliziranih srebrovih nanočestica označenih sa ugljikovim nanosferama [47].

PSS mikrosfere modificirane LbL metodom sa slojevima PE Snyder i sur. [48] koristili su za određivanje paraoksona (pesticid) i vodikovog peroksida H_2O_2 . Pripremljena su dva različita sustava. Prvi sustav sastoji se od PAH-PAA filma na PSS mikrosferama. Na površinu PE filma adsorbira se enzim acetilkolin esteraza (AChE) ili HRP te se ovako pripremljen senzor koristi za amperimetrijsko određivanje paraoksona odnosno vodikovog peroksida. Drugi sustav sastoji se od PEI-PAA filma formiranog na PSS mikrosferama. Kao i u prvom sustavu, da bi se paraokson tj. vodikov peroksid mogao odrediti potrebno je na površinu filma imobilizirati AChE tj. HRP.

2.4.2. LbL metoda u drugim strukturama senzora

Lee i sur. razvili su enzim *sticker* metodu za razvoj elektrokemijskih senzora. Enzimska naljepnica sastoji se od nano-mrežnog provodljivog enzimskog filma (eng. enzymatic conductive nano-network film) i polimernog nosača (slika 9). LbL sastavljanje nano-mrežnog provodljivog enzimskog filma provodi se dijalizom. SWCNTs pomiješane s fagom M13 se podvrgavaju dijalizi nakon čega se dodaje PEI te se dijaliza nastavlja. U konačnici se dodaje enzim od interesa (u ovom slučaju GOx) te slijedi posljednja dijaliza. Napravljeni film nanosi se na polimerni nosač (polimerna membrana celuloza acetata). Pripremljena naljepnica se reže, natapa u vodi te prenosi na željeni supstrat (*wet-transfer-print*). Navedeni senzor autori su koristili za određivanje glukoze [49].



Slika 9 - Shematski prikaz pripreve enzimske naljepnice: a) konstrukcija nano-mrežnog provodljivog enzimskog filma, b) struktura enzimske naljepnice i princip rada wet-transfer-print metode. [49]

Xu i sur. [50] napravili su nanokompozitni senzor za amperimetrijsko određivanje nitrita (NO_2^-). LbL metodom slojevi PDDA i karboksilirane nanokristalne celuloze (CNCC) se naizmjenično nanose na GCE. Zatim se na nastali višeslojni film imobilizira poli(3,4-etilendioksitiofen) (PEDOT). Navedeni senzor pokazuje veliku selektivnost, stabilnost te osjetljivost.

3. Zaključak

U ovom radu prikazane su moguće strukture senzorskih filmova postignute sloj na sloj metodom. Također je prikazana uloga polielektrolita u konstrukciji LbL filmova te njihova primjena. Višeslojni filmovi mogu se sastojati od 2 sloja u kojima se polielektroliti izmjenjuju s osjetilnim, medijatorskim ili pak pretvorničkim komponentama (NiTsPc). S/M/T komponente kao što su primjerice enzimi ili nanočestice također mogu biti i zarobljene unutar slojeva polielektrolita. Višeslojni filmovi koji imaju više od 2 sloja mogu se sastojati od 3 ili više slojeva ili pak mogu biti načinjeni od višeslojnih naizmjeničnih filmova. Polielektroliti se na supstrate također mogu nanositi u obliku prekursornih filmova kada se žele umanjiti interferencije osjetilnog elementa sa supstratom. Ukoliko se polielektroliti nanose kao prekursorni film senzorni elementi se nanose metodama kao što su nakapavanje, umakanje, elektrodepozicija itd. Uz navedeno, polielektroliti se LbL metodom mogu ugraditi u složene nanočestice (nanosfere, sonde) ili u druge strukture senzora.

Popis kratica

Polielektroliti:

CMP – karboksimetilpululan

CNCC - karboksilirana nanokristalna celuloza

CS – hitozan

HA – huminska kiselina

PAA(+) – poli(akrilamid)

PAA(-) – poli(akrilna kiselina)

PADA – poli[akrilamid-co- (dialildimetilamonij klorid)]

PAH – poli(alilamin hidroklorid)

PAM – poliakrilamid

PAMAM – poli(amidoamin) dendrimer

PAS – natrijev poli(anetol sulfonat)

PET – polietilentereftalat

PC – pektin

PDADMAC – poli(dialildimetilamonijev klorid)

PDDA – poli(dialildimetilamonijev klorid)

PEI – poli(etilenimin)

PHD – poli(hidroksietil metakrilat-poli[2-(dimetilamino)etil metakrilat])

PHEMA-b – poli(hidroksietil metakrilat)

PDMAEMA – poli[2-(dimetilamino)etil metakrilat]

PSS – poli(stiren sulfonat)

PQ11 – poli[(2-etildimetilaminoetil metakrilat etilsulfat)-co-(1-vinilpirolidon)]

PVP – poli(vinil pirolidon)

PVS – poli(vinilsulfat)

SCS – sulfonirani hitozan

SiPyCl – 3-n-propilpiridin silseskvioksan

Ugljikovi nanomaterijali:

CNS – ogljikove nanosfere

CNO – ogljikovi nano-lučice

ErGO – elektrokemijski reduciran grafenov oksid

GO – grafenov oksid

MWCNTs – višezidne ogljikove nanocjevčice

MCNT – multifunkcionalne ogljikove nanocjevčice

rGO – reducirani grafenov oksid

SWCNTs – jednozidne ogljikove nanocjevčice

DNA:

cDNA – komplementarna DNA

ssDNA – jednolančana DNA

Enzimi:

AChE – acetilkolin esteraza

ChOx – kolin esteraza

HRP – peroksidaza hrena

GOx – glukoza oksidaza

LOx – laktat oksidaza

SOD – sarkozin oksidaza

Elektrode:

FET – tranzistor s efektom polja

FTO – kositrov oksid dopiran s fluorom

GCE – staklena ugljikova elektroda

IDE – planarno isprepletana elektroda

ITO – indij-kositar oksid

SPAu – sitotiskana zlatna elektroda

SPCE – sitotiskana ugljikova elektroda

SPGE – sitotiskana grafitna elektroda

Elektroanalitičke metode:

AMP – amperometrija

CV – ciklička voltometrija

DPASV – diferencijalna pulsna voltometrija anodnog otapanja

DPV – diferencijalna pulsna voltometrija

EIS – elektrokemijska impedancijska spektroskopija

IMP – impedancija

LSV – linearna zamašna voltometrija

POT – potenciometrija

SWV – voltometrija kvadratnog vala

Ostalo:

APTES – 3-amminopropil-trietoksisilan

BSA – goveđi serumski albumin

CD – ciklodekstrin

GTH – glutaraldehid

MB – metilen plava

MG – metilen zelena

MPA – merkaptopropionska kiselina

PANI – polianilin

PB – prusko plava/ berlinsko modrilo

PEDOT – poli(3,4-etilendioksitiofen)

PSA – polistiren-co-akrilna kiselina

SDS – natrijev dodecil sulfat

S-PEDOT – sulfonirani poli(3,4-etilendioksitiofen)

TEOS – tetraetil ortosilikat

4. Literatura

- [1] *J. W. Gooch*, Polyelectrolyte, u *Encyclopedic Dictionary of Polymers*, J. W. Gooch, Ur., NY: Springer, New York, 2011, str. 557–557.
- [2] *J. Lyklema*, *Fundamentals of Interface and Colloid Science: Soft Colloids*, Elsevier, 2005.
- [3] *M. Yin, B. Gu, Q. Zhao, i suradnici*, Highly sensitive and fast responsive fiber-optic modal interferometric pH sensor based on polyelectrolyte complex and polyelectrolyte self-assembled nanocoating, *Anal. Bioanal. Chem.* **399** (2011) 3623–3631, doi: 10.1007/s00216-011-4705-0.
- [4] *X.-Z. Zhang, F.-J. Tian, Y.-M. Hou, i Z.-H. Ou*, Preparation and in vitro in vivo characterization of polyelectrolyte alginate–chitosan complex based microspheres loaded with verapamil hydrochloride for improved oral drug delivery, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **81** (2015) 429–440, doi: 10.1007/s10847-014-0471-x.
- [5] *I. Shabani, M. M. Hasani-Sadrabadi, V. Haddadi-Asl, i M. Soleimani*, Nanofiber-based polyelectrolytes as novel membranes for fuel cell applications, *J. Membr. Sci.* **368** (2011) 233–240, doi: 10.1016/j.memsci.2010.11.048.
- [6] *W. Li, D. Xu, Y. Hu, K. Cai, i Y. Lin*, Surface modification of titanium substrates with silver nanoparticles embedded sulfhydrylated chitosan/gelatin polyelectrolyte multilayer films for antibacterial application, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **25** (2014) 1435–1448, doi: 10.1007/s10856-014-5190-8.
- [7] *A. Liu i J. Anzai*, Ferrocene-containing polyelectrolyte multilayer film-covered electrodes: electrocatalytic determination of ascorbic acid and use of inner blocking layers to improve the upper detection limit of the electrodes, *Anal. Bioanal. Chem.* **380** (2004) 98–103, doi: 10.1007/s00216-004-2728-5.
- [8] *J. J. Richardson, J. Cui, M. Björnmalm, J. A. Braunger, H. Ejima, i F. Caruso*, Innovation in Layer-by-layer Assembly, *Chem. Rev.* **116** (2016) 14828–14867, doi: 10.1021/acs.chemrev.6b00627.
- [9] *G. Decher i J. B. Schlenoff*, *Multilayer Thin Films: Sequential Assembly of Nanocomposite Materials*, John Wiley & Sons, 2012.
- [10] *J. L. Lutkenhaus i P. T. Hammond*, Electrochemically enabled polyelectrolyte multilayer devices: from fuel cells to sensors, *Soft Matter* **3** (2007) 804–816, doi: 10.1039/B701203A.

- [11] V. S. Meka, M. K. G. Sing, M. R. Pichika, S. R. Nali, V. R. M. Kolapalli, i P. Kesharwani, A comprehensive review on polyelectrolyte complexes, *Drug Discov. Today* **22** (2017) 1697–1706, doi: 10.1016/j.drudis.2017.06.008.
- [12] URL : <https://polymerdatabase.com/polymer%20classes/Polyelectrolyte%20type.html> (4.8.2020.).
- [13] S. K. Chatterjee, D. Yadav, S. Ghosh, i A. M. Khan, Study of interaction between two oppositely charged polyelectrolytes and formation of polyelectrolyte complexes, *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **27** (1989) 3855–3863, doi: 10.1002/pola.1989.080271125.
- [14] I. Škugor Rončević, D. Krivić, M. Buljac, N. Vladislavić, i M. Buzuk, Polyelectrolytes Assembly: A Powerful Tool for Electrochemical Sensing Application, *Sensors* **20** (2020), doi: 10.3390/s20113211.
- [15] H. M. Fares, Q. Wang, M. Yang, i J. B. Schlenoff, Swelling and Inflation in Polyelectrolyte Complexes, *Macromolecules* (2018), doi: 10.1021/acs.macromol.8b01838.
- [16] C. S. Santos, R. Ferreira, C. Calixto, J. Rufino, J. Garcia, S. Fujiwara i suradnici, The influence of organization of LbL films containing a silsesquioxane polymer on the electrochemical response of dopamine, *J. Appl. Electrochem.* **44** (2014) 1047–1058, doi: 10.1007/s10800-014-0703-1.
- [17] J. Xu, S. Xu, S. Feng, Y. Hao, i J. Wang, Electrochemical sensor for detecting both oxidizing and reducing compounds based on poly(ethyleneimine)/phosphotungstic acid multilayer film modified electrode, *Electrochimica Acta* **174** (2015) 706–711, doi: 10.1016/j.electacta.2015.06.058.
- [18] M. Jović, J. Hidalgo-Acosta, A. Lesch, V. Costa Bassetto, E. Smirnov, F. Cortés-Salazar i suradnici, Large-scale sloj na sloj inkjet printing of flexible iridium-oxide based pH sensors, *J. Electroanal. Chem.* **819** (2018) 384–390, doi: 10.1016/j.jelechem.2017.11.032.
- [19] C. Zanardi, F. Terzi, B. Zanfognini, L. Pigani, R. Seeber, J. Lukkari i suradnici, Effective catalytic electrode system based on polyviologen and Au nanoparticles multilayer, *Sens. Actuators B Chem.* **144** (2010) 92–98, doi: 10.1016/j.snb.2009.10.041.
- [20] H. Liu, S. Li, D. Sun, Y. Chen, Y. Zhou, i T. Lu, Layered graphene nanostructures functionalized with NH₂-rich polyelectrolytes through self-assembly: construction and their application in trace Cu(II) detection, *J. Mater. Chem. B* **2** (2014) 2212–2219, doi: 10.1039/C4TB00104D.
- [21] Y. Pang, Y. Huang, W. Li, L. Feng, i X. Shen, Conjugated Polyelectrolyte/Graphene Multilayer Films for Simultaneous Electrochemical Sensing of Three Monohydroxylated

- Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, *ACS Appl. Nano Mater.* **2** (2019) 7785–7794, doi: 10.1021/acsnm.9b01821.
- [22] *T. S. Bronder, A. Poghossian, S. Scheja, C. Wu, M. Keusgen, D. Mewes i suradnici*, DNA Immobilization and Hybridization Detection by the Intrinsic Molecular Charge Using Capacitive Field-Effect Sensors Modified with a Charged Weak Polyelectrolyte Layer, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **7** (2015) 20068–20075, doi: 10.1021/acsami.5b05146.
- [23] *T. S. Bronder, M. P. Jessing, A. Poghossian, M. Keusgen, i M. J. Schöning*, Detection of PCR-Amplified Tuberculosis DNA Fragments with Polyelectrolyte-Modified Field-Effect Sensors, *Anal. Chem.* **90** (2018) 7747–7753, doi: 10.1021/acs.analchem.8b01807.
- [24] *M. Riedel, G. Göbel, A. M. Abdelmonem, W. J. Parak, i F. Lisdat*, Photoelectrochemical Sensor Based on Quantum Dots and Sarcosine Oxidase, *ChemPhysChem*, **14** (2013) 2338–2342, doi: 10.1002/cphc.201201036.
- [25] *M. H. Abouzar, A. Poghossian, J. R. Siqueira, O. Oliveira, W. Moritz, i M. J. Schöning*, Capacitive electrolyte-insulator-semiconductor structures functionalised with a polyelectrolyte/enzyme multilayer: New strategy for enhanced field-effect biosensing, *Phys. Status Solidi A* **207** (2010) 884–890, doi: 10.1002/PSSA.200983317.
- [26] *M. dos Santos, E. Wrobel, V. dos Santos, S. Quinária, S. Fujiwara, J. Garcia i suradnici*, Development of an Electrochemical Sensor Based on LbL Films of Pt Nanoparticles and Humic Acid, *J. Electrochem. Soc.* **163** (2016) B499–B506, doi: 10.1149/2.1001609jes.
- [27] *F. Xiong, C. Chen, i S. Liu*, Preparation of Chitosan/Polystyrene Sulfonate Multilayered Composite Metal Nanoparticles and Its Application, *J. Nanosci. Nanotechnol.* **16** (2016) 6027–6031, doi: 10.1166/jnn.2016.12111.
- [28] *X. Li, A. Umar, Z. Chen, T. Tian, S. Wang, i Y. Wang*, Supramolecular fabrication of polyelectrolyte-modified reduced graphene oxide for NO₂ sensing applications, *Ceram. Int.* **41** (2015) 12130–12136, doi: 10.1016/j.ceramint.2015.06.030.
- [29] *S. Firdoz, F. Ma, X. Yue, Z. Dai, A. Kumar, i B. Jiang*, A novel amperometric biosensor based on single walled carbon nanotubes with acetylcholine esterase for the detection of carbaryl pesticide in water, *Talanta* **83** (2010) 269–273, doi: 10.1016/j.talanta.2010.09.028.
- [30] *N. C. de Lucena, C. M. Miyazaki, F. M. Shimizu, C. J. L. Constantino, i M. Ferreira*, Layer-by-layer composite film of nickel phthalocyanine and montmorillonite clay for synergistic effect on electrochemical detection of dopamine, *Appl. Surf. Sci.* **436** (2018) 957–966, doi: 10.1016/j.apsusc.2017.12.117.

- [31] A. Pajor-Świerzy, M. Kolasieńska-Sojka, i P. Warszyński, The electroactive multilayer films of polyelectrolytes and Prussian blue nanoparticles and their application for H₂O₂ sensors, *Colloid Polym. Sci.* **292** (2014) 455–465, doi: 10.1007/s00396-013-3091-x.
- [32] G. A. Evtugyn, V. B. Stepanova, A. V. Porfireva, A. I. Zamaleeva, i R. R. Fakhrullin, Electrochemical DNA sensors based on nanostructured organic dyes/DNA/polyelectrolyte complexes, *J. Nanosci. Nanotechnol.* **14** (2014) 6738–6747, doi: 10.1166/jnn.2014.9345.
- [33] V. I. Paz Zanini, O. E. Linarez Pérez, M. L. Teijelo, P. Labbé, B. A. Lopez de Mishima, i C. D. Borsarelli, Development of a bioelectrode fabricated with a multilayer thin film of poly(diallyldimethylammonium)/gold-nanoparticle/lactate oxidase for analysis of l-lactate in food samples, *Sens. Actuators B Chem.* **247** (2017) 830–839, doi: 10.1016/j.snb.2017.03.103.
- [34] G. H. S. Rodrigues, C. M. Miyazaki, R. J. G. Rubira, C. J. L. Constantino, i M. Ferreira, Layer-by-layer Films of Graphene Nanoplatelets and Gold Nanoparticles for Methyl Parathion Sensing, *ACS Appl. Nano Mater.* **2** (2019) 1082–1091, doi: 10.1021/acsnm.9b00007.
- [35] D. Lee i T. Cui, A role of silica nanoparticles in sloj na sloj self-assembled carbon nanotube and In₂O₃ nanoparticle thin-film pH sensors: Tunable sensitivity and linearity, *Sens. Actuators Phys.* **188** (2012) 203–211, doi: 10.1016/j.sna.2012.01.004.
- [36] D. Lee i T. Cui, Layer-by-layer Self-Assembly of Single-Walled Carbon Nanotubes with Amine-Functionalized Weak Polyelectrolytes for Electrochemically Tunable pH Sensitivity, *Langmuir* **27** (2011) 3348–3354, doi: 10.1021/la1047547.
- [37] H. Chen, F. Xi, X. Gao, Z. Chen, i X. Lin, Bionzyme bionanomultilayer electrode for glucose biosensing based on functional carbon nanotubes and sugar–lectin biospecific interaction, *Anal. Biochem.* **403** (2010) 36–42, doi: 10.1016/j.ab.2010.04.011.
- [38] D. Lee i T. Cui, Carbon nanotube thin film pH electrode for potentiometric enzymatic acetylcholine biosensing, *Microelectron. Eng.* **93** (2012) 39–42, doi: 10.1016/j.mee.2011.10.017.
- [39] C. Peng, Y. S. Thio, i R. A. Gerhardt, Effect of Precursor-Layer Surface Charge on the Sloj na sloj Assembly of Polyelectrolyte/Nanoparticle Multilayers, *Langmuir* **28** (2012) 84–91, doi: 10.1021/la203626x.
- [40] Y. Du, C. Chen, B. Li, M. Zhou, E. Wang, i S. Dong, Layer-by-layer electrochemical biosensor with aptamer-appended active polyelectrolyte multilayer for sensitive protein determination, *Biosens. Bioelectron.* **25** (2010) 1902–1907, doi: 10.1016/j.bios.2010.01.003.

- [41] C. G. de Jesus, D. Lima, V. dos Santos, K. Wohnrath, i C. A. Pessôa, Glucose biosensor based on the highly efficient immobilization of glucose oxidase on layer-by-layer films of silsesquioxane polyelectrolyte, *Sens. Actuators B Chem.* **186** (2013) 44–51, doi: 10.1016/j.snb.2013.05.063.
- [42] L. Zhang, L. Ning, Z. Zhang, S. Li, H. Yan, H. Pang i suradnici, Fabrication and electrochemical determination of l-cysteine of a composite film based on V-substituted polyoxometalates and Au@2Ag core–shell nanoparticles, *Sens. Actuators B Chem.* **221** (2015) 28–36, doi: 10.1016/j.snb.2015.06.070.
- [43] Y. Liu, L.-P. Xu, S. Wang, W. Yang, Y. Wen, i X. Zhang, An ultrasensitive electrochemical immunosensor for apolipoprotein E4 based on fractal nanostructures and enzyme amplification, *Biosens. Bioelectron.* **71** (2015) 396–400, doi: 10.1016/j.bios.2015.04.068.
- [44] R. Davletshina, A. Ivanov, i G. Evtugyn, Acetylcholinesterase Sensor Based on Polyelectrolyte Complexes with DNA Inclusion for the Determination of Reversible Inhibitors, *Electroanalysis* **32** (2020) 308–316, doi: 10.1002/elan.201900507.
- [45] B. Lakard, D. Magnin, O. Deschaume, G. Vanlancker, K. Glinel, S. Demoustier-Champagne i suradnici, Urea potentiometric enzymatic biosensor based on charged biopolymers and electrodeposited polyaniline, *Biosens. Bioelectron.* **26** (2011) 4139–4145, doi: 10.1016/j.bios.2011.04.009.
- [46] Y. Zhai, S. Zhai, G. Chen, K. Zhang, Q. Yue, L. Wang i suradnici, Effects of morphology of nanostructured ZnO on direct electrochemistry and biosensing properties of glucose oxidase, *J. Electroanal. Chem.* **656** (2011) 198–205, doi: 10.1016/j.jelechem.2010.11.020.
- [47] Z. Zhu, F. Gao, J. Lei, H. Dong, i H. Ju, A Competitive Strategy Coupled with Endonuclease-Assisted Target Recycling for DNA Detection Using Silver-Nanoparticle-Tagged Carbon Nanospheres as Labels, *Chem. – Eur. J.* **18** (2012) 13871–13876, doi: 10.1002/chem.201201307.
- [48] A. Snyder, Z. Bo, Q. Sun, C. Martinez, i L. Stanciu, Electrochemical Biosensors Fabricated with Polyelectrolyte Microspheres, *J. Electrochem. Soc.* **159** (2012) B783–B788, doi: 10.1149/2.033208jes.
- [49] S.-W. Lee, T.-H. Kang, S. K. Lee, K.-Y. Lee, i H. Yi, Hydrodynamic layer-by-layer Assembly of Transferable Enzymatic Conductive Nanonetworks for Enzyme-Sticker-Based Contact Printing of Electrochemical Biosensors, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **10** (2018) 36267–36274, doi: 10.1021/acsami.8b13070.
- [50] G. Xu, S. Liang, J. Fan, G. Sheng, i X. Luo, Amperometric sensing of nitrite using a glassy carbon electrode modified with a multilayer consisting of carboxylated nanocrystalline

cellulose and poly(diallyldimethyl ammonium) ions in a PEDOT host, *Microchim. Acta* **183** (2016) 2031–2037, doi: 10.1007/s00604-016-1842-3.