

NGHIÊN CỨU ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH POLYETHYLENIMINE VỚI GLUTAMATE OXIDASE ĐỂ PHÁT TRIỂN CẢM BIẾN SINH HỌC THEO DÕI NỒNG ĐỘ GLUTAMATE *IN VITRO*

Đỗ Thị Hồng Diệp¹, Lê Phước Dương¹, Nguyễn Thị Hoài¹, Pier Andrea Serra², Gaia Rocchitta²

(1) Bộ môn Dược lý, Đại học Y Dược Huế; (2) Đại học Sassari, Ý

Tóm tắt

Đặt vấn đề: Cảm biến sinh học thế hệ đầu tiên đã được xây dựng cách đây hơn 50 năm. Nó bao gồm hai thành phần: các thành phần sinh học và bộ chuyển đổi cảm biến sinh học có vai trò quan trọng trong việc theo dõi các chất trung gian hóa học thần kinh cũng như xác định các chất có số lượng rất nhỏ trong mẫu. Mặt khác, glutamate có vai trò quan trọng trong sinh hóa cũng như trong chuyển hóa và các chất trung gian thần kinh. Thách thức đặt ra cho cảm biến sinh học hiện đại là phát hiện và xác định nồng độ rất nhỏ của các chất chứa trong mẫu gồm nhiều chất phức tạp, yếu tố nhiễu cao. Với những lý do đó, chúng tôi thực hiện đề tài này với mục tiêu: Tìm ra nồng độ nào của polyethylenimine (PEI) thể hiện tính nhạy cảm cao nhất, đặc hiệu cao và có sự ổn định lâu dài, từ đó phát triển cảm biến sinh học có thể theo dõi nồng độ Glutamate *in vitro*.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu: Chúng tôi thiết kế cảm biến sinh học cho glutamate với nồng độ PEI khác nhau dao động từ 0% đến 5%, sau đó chúng tôi tiến hành chuẩn độ ở ngày thứ 1 và ngày thứ 8. **Kết quả:** Sau khi tiến hành chuẩn độ nồng độ Glutamate trên 5 nhóm cảm biến sinh học với nồng độ PEI khác nhau (0%, 0,5%, 1%, 2,5% và 5%), kết quả nghiên cứu cho thấy: nồng độ PEI dao động từ 0,5% đến 1% là tốt nhất xét theo V_{MAX} , K_M ; trong khi, PEI 1% cho thấy sự ổn định tuyệt vời. **Kết luận:** PEI 1% là thiết kế tốt nhất cho việc phát triển cảm biến sinh học theo dõi nồng độ glutamate *in vitro*. Trong tương lai, chúng tôi mong đợi có thể phát triển được cảm biến sinh học có khả năng xác định glutamate cấy ghép được trên động vật thực nghiệm.

Từ khóa: Cảm biến sinh học cho glutamate, polyethylenimine (PEI) tăng cường hoạt tính glutamate oxidase, cảm biến sinh học glutamate oxidase.

Abstract

THE ROLE OF POLYETHYLENIMINE IN ENHANCING PERFORMANCE OF GLUTAMATE BIOSENSORS

Do Thi Hong Diep¹, Le Phuoc Duong¹, Nguyen Thi Hoai¹, Pier Andrea Serra², Gaia Rocchitta²

(1) Hue University of Medicine and Pharmacy; (2) University of Sassari, Italia

Background: The first biosensor was constructed more than fifty years ago. It was composed of the biorecognition element and transducer. The first-generation enzyme biosensors play important role in monitoring neurotransmitter and determine small quantities of substances in complex matrices of the samples. Glutamate is important biochemicals involved in energetic metabolism and neurotransmission. Therefore, biosensors requires the development a new approach exhibiting high sensibility, good reproducibility and long-term stability. The first-generation enzyme biosensors play important role in monitoring neurotransmitter and determine small quantities of substances in complex matrices of the samples. The aims of this work: To find out which concentration of polyethylenimine (PEI) exhibiting the most high sensibility, good reproducibility and long-term stability. **Methods:** We designed and developed glutamate biosensor using different concentration of PEI ranging from 0% to 5% at Day 1 and Day 8. **Results:** After Glutamate biosensors *in-vitro* characterization, several PEI concentrations, ranging from 0.5% to 1% seem to be the best in terms of V_{MAX} , the K_M ; while PEI content ranging from 0.5% to 1% resulted stable, PEI 1% displayed an excellent stability. **Conclusions:** In the result, PEI 1% performed high sensibility, good stability and blocking interference. Furthermore, we expect to develop and characterize an implantable biosensor capable of detecting glutamate, glucose *in vivo*.

Key words: Glutamate biosensors, PEI (Polyethylenimine) enhances glutamate oxidase, glutamate oxidase biosensors.

- Địa chỉ liên hệ: Đỗ Thị Hồng Diệp, email: hongdiephuongxuan@gmail.com

- Ngày nhận bài: 12/11/2017, Ngày đồng ý đăng: 28/5/2018, Ngày xuất bản: 5/7/2018

DOI: 10.34071/jmp.2018.3.6

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cảm biến sinh học thế hệ đầu tiên đã được xây dựng cách đây hơn 50 năm [2]. Nó bao gồm hai thành phần: các thành phần sinh học và bộ chuyển đổi [5][6][16]. Cảm biến sinh học được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực cuộc sống như: trong y học, khoa học môi trường, trong chế biến thực phẩm [17][18]... Mặc dù đã ra đời từ rất lâu nhưng về nguyên lý hoạt động cơ bản, vẫn được áp dụng cho đến hiện tại, đồng thời phát triển các bộ cảm biến sinh học thế hệ sau này thông minh, chính xác, nhỏ gọn và độ nhạy cao hơn [8][12][14].

Cảm biến sinh học là một thiết bị kết hợp một đầu dò (ví dụ như dây Bạch kim, Platinum) với một thành phần sinh học như enzyme oxidase [6]. Về mặt cấu tạo, một cảm biến sinh học bao gồm bốn bộ phận chính: đầu dò sinh học: có tác dụng bắt cặp và phát hiện sự có mặt của các tác nhân sinh học cần phân tích; tác nhân cố định: giúp gắn các đầu thu lên trên điện cực; bộ phận chuyển đổi tín hiệu giúp chuyển các biến đổi sinh học thành các tín hiệu có thể đo đạc được; bộ phận xử lý, đọc tín hiệu ra (bộ phận này có tác dụng chuyển thành các tín hiệu điện để máy tính và các thiết bị khác có thể xử lý). Glutamate là chất trung gian hóa học quan trọng liên quan đến chuyển hóa năng lượng và truyền dẫn thần kinh.

Mặt khác, nồng độ glutamate ở trong não rất nhỏ, do đó cần có phương tiện, kỹ thuật mới để phát hiện và theo dõi với độ nhạy và độ đặc hiệu cao. Đó cũng chính là thách thức đặt ra cho cảm biến sinh học hiện đại để phát hiện và xác định nồng độ rất nhỏ của các chất chứa trong mẫu [12]. Do đó, một yêu cầu đặt ra là cần phải phát triển một cảm biến sinh học mới có tính nhạy cảm cao, đặc hiệu và ổn định lâu dài.

Trong bối cảnh này, chúng tôi đã phát triển cảm biến sinh học mới dựa trên vai trò của polyethylenimine (PEI) trong việc nâng cao hiệu quả của các cảm biến sinh học thế hệ đầu tiên. Polyethylenimine là một polymer tổng hợp mang điện tích dương, nó đã được đưa vào một số loại cảm biến sinh học để ổn định các enzyme, như glutamate oxidase hoặc glucose oxidase bằng cách tăng sự ổn định enzyme thông qua sự hình thành các phức hợp polyanionic/polycationic và việc giảm bớt lực đẩy tĩnh điện giữa enzyme và cơ chất đều mang điện tích âm [1][3].

Chính vì vậy, chúng tôi thực hiện đề tài này với mục tiêu: *Tìm ra với nồng độ nào của PEI thì cảm biến sinh học có độ nhạy cao nhất, đặc hiệu cao và có sự ổn định lâu dài, từ đó phát triển cảm biến sinh học có thể theo dõi nồng độ Glutamate in vitro.*

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Chuẩn bị hóa chất

- Dung dịch PBS 50mM được chuẩn bị bằng cách hòa tan 8,9g NaCl (0,15M), 1,76g NaH_2PO_4 (0,04 M), 6,89g NaOH (0,04M) trong nước 1 lít nước tinh khiết và sau đó chuẩn độ pH = 7,4.

- Dung dịch Glutamate oxidase được chuẩn bị bằng cách hòa tan 200UI enzyme trong 10 μL PBS (20 kilounits/mL), bảo quản ở -20°C .

- PEI 5% được pha loãng từ dung dịch PEI 50% (w/w H_2O_2), bảo quản ở -20°C .

- Dung dịch Ortho-Phenylene Diamine monomer (monome OPD, 300mM) đã được hòa tan 648g OPD trong 20ml PBS ngay trước khi sử dụng [14].

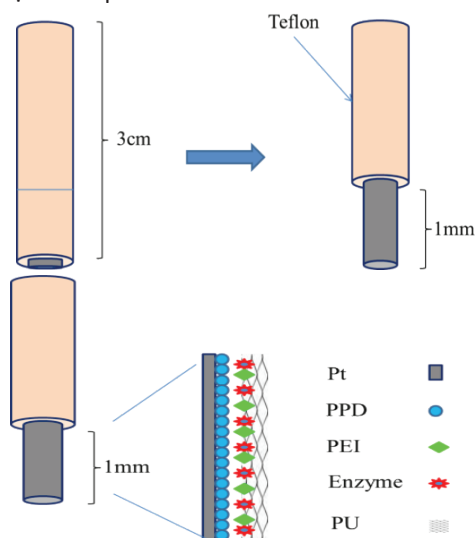
- Các dung dịch glutamat cô đặc (1M) được chuẩn bị ở nước có độ tinh khiết cao ngay trước khi sử dụng như mô tả trước đây.

- Dung dịch acid ascorbic (100 mM) được chuẩn bị bằng cách hòa tan trong HCl (0,01M).

- PU hòa tan trong THF (dung dịch 1% v/v) bảo quản ở -20°C .

2.2. Chuẩn bị cảm biến sinh học

Cảm biến được chuẩn bị bằng cách cắt đoạn dây Pt-Ir (95%, Ir 5%) dài khoảng 4 cm, sau đó loại bỏ lớp cách điện Teflon bao bọc bên ngoài ở 2 đầu dài khoảng 2 mm [7]. Sử dụng kính hiển vi để cắt được chiều dài Pt-Ir chính xác của phần tiếp điện là $1,0 \pm 0,1$ mm (bề mặt hoạt động của cảm biến sinh học). Đầu còn lại để kết nối với hệ thống. Sau đó bề mặt hoạt động của điện cực sẽ được bao phủ bên ngoài lần lượt các lớp như đã mô tả ở Hình 2.1.



Hình 2.1. Chuẩn bị cảm biến sinh học

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã thiết kế 15 cảm biến sinh học bằng Platinum sau đó chia thành 05 nhóm:

- Nhóm 1: PEI 0%, Pt/PPD/[GluOx]₅/PU 1%
- Nhóm 2: PEI 0,5%, Pt/PPD/[PEI+GluOx]₅/PU 1%
- Nhóm 3: PEI 1%, Pt/PPD/[PEI+GluOx]₅/PU 1%
- Nhóm 4: PEI 2,5%, Pt/PPD/[PEI+GluOx]₅/PU 1%
- Nhóm 5: PEI 5%, Pt/PPD/[PEI+GluOx]₅/PU 1%

Tiến hành chuẩn độ Glutamate *in vitro* ngày thứ 01 và ngày thứ 08 trên cả 05 nhóm sau đó, thu thập dữ liệu và phân tích kết quả, so sánh độ bền, độ đặc hiệu giữa 05 nhóm thiết kế. Phép đo các giá trị V_{MAX} , K_M và LRS được thực hiện bằng cách sử dụng thiết bị eDAQ QuadStat, e-Corder 410, eDAQ, Australia.

2.3. Phân tích và xử lý số liệu

Sau khi chuẩn độ, các cảm biến sinh học được đánh giá dựa trên các giá trị V_{MAX} , K_M và LRS (linear regressions slope, đường hồi quy tuyến tính).

Phân tích số liệu thống kê dựa vào phần mềm GraphPad Prism 5.02.

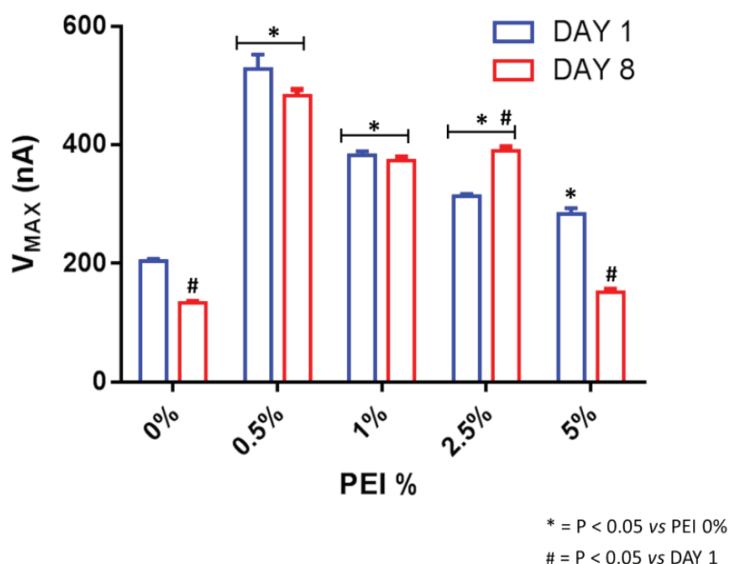
3. KẾT QUẢ

Chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ PEI khác nhau từ 0% đến 5% đối với các

cảm biến sinh học cho glutamate. Mỗi nhóm gồm 3 bộ cảm biến sinh học ($n = 3$). Trong nghiên cứu này, những thay đổi của các thông số Michaelis-Menten (V_{MAX} , K_M) và LRS đã được ghi nhận.

3.1. V_{MAX}

Nghiên cứu tiến hành so sánh giá trị V_{MAX} của thiết kế cơ bản (PEI 0%) (nhóm chứng, $n=3$) và các nhóm khác (PEI 0,5%, 1%, 2,5%, 5%, $n = 3$). Giá trị V_{MAX} trung bình $\pm$ SEM được thể hiện trong Biểu đồ 3.1. Từ kết quả cho thấy, nồng độ PEI từ 0,5% đến 5% có giá trị V_{MAX} cao hơn so với nhóm chứng (PEI 0%). Tại ngày thứ nhất, V_{MAX} trung bình $\pm$ SEM đạt được giá trị cao nhất với thiết kế PEI 0,5% ($527,90 \pm 24,120$ nA, $R_2 = 0,896$). Vào ngày 8, giá trị V_{MAX} vẫn được duy trì ở mức cao đáng kể so với nhóm chứng ở nồng độ PEI 0,5% đến 2,5%. Ở nồng độ PEI là 0% và 5%, V_{MAX} giảm đáng kể ở ngày 8 ($p < 0,05$). Vì vậy, các cảm biến này không ổn định theo thời gian. Do đó, từ số liệu thống kê cho thấy, phạm vi của PEI từ 0,5% đến 1% là tốt nhất xét về V_{MAX} và tính ổn định của nó theo thời gian.

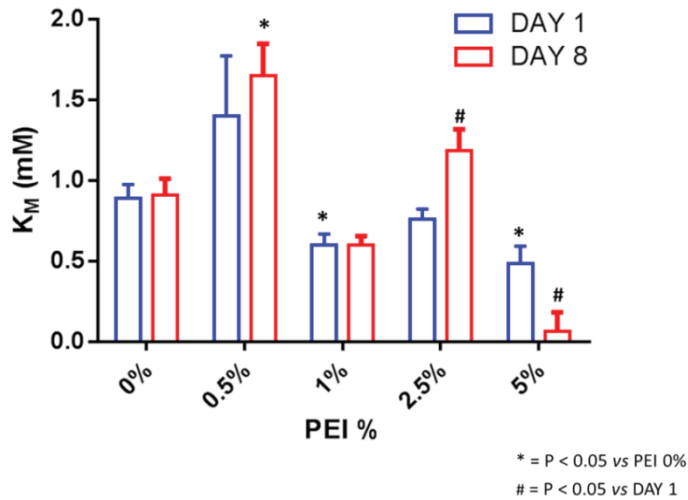


Biểu đồ 3.1. Giá trị V_{MAX} trên 5 nhóm nghiên cứu

3.2. K_M

Các giá trị trung bình $K_M \pm$ SEM được thể hiện trong Biểu đồ 3.2. Với PEI 1%, giá trị K_M thấp hơn so với nhóm chứng ở cả ngày 1 và ngày 8 (ngày 1: $0,601 \pm 0,066$ mM, $R_2 = 0,980$, nhóm chứng: $0,891 \pm 0,083$ mM, $R_2 = 0,985$), (ngày 8: $0,612 \pm 0,054$ mM, $R_2 = 0,985$, nhóm chứng $0,909 \pm 0,103$ mM, $R_2 = 0,978$). Chúng tôi không quan sát thấy sự thay đổi đáng kể

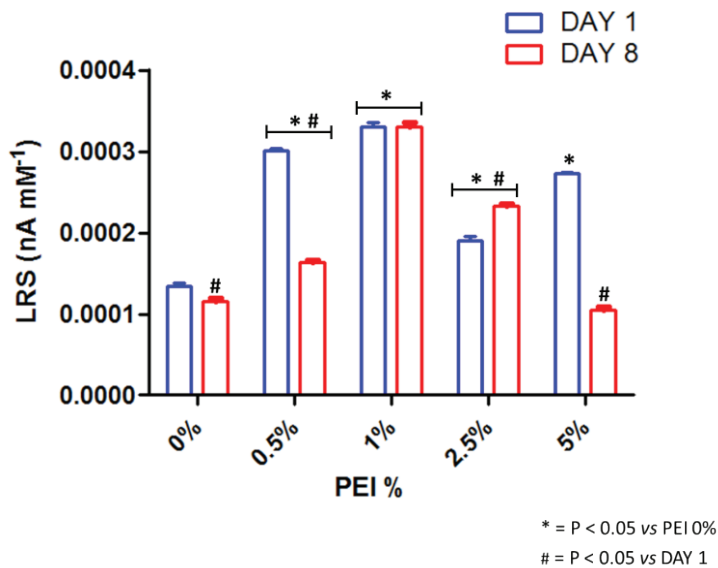
của K_M ở nồng độ PEI 1% vào ngày 8. Điều này cho thấy có một sự ổn định tốt theo thời gian của PEI 1%. Ở những nồng độ PEI khác giá trị của K_M dao động nhiều. Giá trị K_M thay đổi không tỉ lệ với nồng độ PEI, dao động từ $0,065 \pm 0,117$ mM, $R_2 = 0,943$ đến $1,651 \pm 0,196$ mM, $R_2 = 0,979$. Chỉ số K_M đã ổn định theo thời gian với PEI 1%.



Biểu đồ 3.2. Giá trị K_M trên 5 nhóm nghiên cứu

3.3. Linear Region Slope

Vào ngày 1, giá trị LRS ở tất cả các nồng độ của PEI (từ 0,5% đến 5%) trong thí nghiệm cao hơn đáng kể so với nhóm chứng (PEI 0%). Vào ngày 8, PEI từ 0,5% đến 2,5% cho thấy giá trị LRS cao hơn nhóm chứng (PEI 0%). Nồng độ PEI 1% có giá trị LRS cao nhất $0,0004 \pm 0,0001 \text{ nA mM}^{-1}$ ($R_2 = 0,999$) ở ngày 1 và $0,0003 \pm 0,0002 \text{ nA mM}^{-1}$ ($R_2 = 0,999$) trong ngày 8. Do đó, chứng minh rằng chỉ có PEI 1% cho thấy sự ổn định cao.



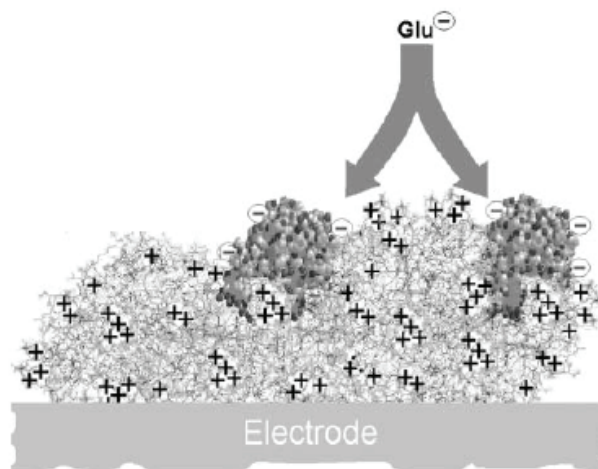
Biểu đồ 3.3. Giá trị Linear Region Slope trên 5 nhóm nghiên cứu

4. BÀN LUẬN

4.1. V_{MAX}

Từ kết quả nghiên cứu cho thấy, rõ ràng sự gia tăng nồng độ PEI đã làm tăng giá trị của V_{MAX} trong khoảng PEI từ 0,5% đến 2,5%. V_{MAX} là thông số biểu thị số lượng các phân tử enzyme hoạt tính lắng đọng trên các bề mặt của cảm biến sinh học. Sự hiện diện của PEI dẫn đến sự gia tăng giá trị của V_{MAX} so với nhóm cảm biến sinh học cơ bản (nhóm chứng PEI

0%). Do đó, PEI đã hoạt động như một chất “tăng cường hoạt động của enzyme”. Trên thực tế, điều này đã được khẳng định bằng các nghiên cứu trước đây PEI xác định sự gia tăng V_{MAX} đối với cảm biến sinh học [9][11][13]. Hơn thế nữa, ở nồng độ PEI 0,5% và 1%, giá trị V_{MAX} có sự ổn định theo thời gian, có thể do sự ổn định tĩnh điện của enzyme. Do đó, nồng độ PEI từ 0,5% đến 1% là tốt nhất xét trên phương diện V_{MAX} .



Hình 4.1. Tương tác tĩnh điện giữa glutamate oxidase (GluOx, 140 kDa, polyanionic) với polyethylenimine (PEI, 750 kDa, polycationic) [9].

4.2. K_M

Với nồng độ PEI 1%, giá trị K_M thấp hơn ở ngày 1 ($0,601 \pm 0,066$ mM, $R_2 = 0,980$) và cả ở ngày 8 ($0,612 \pm 0,054$ mM, $R_2 = 0,985$) so với nhóm chứng (ngày 1 ($0,891 \pm 0,083$ mM, $R_2 = 0,985$) và ngày 8 ($0,909 \pm 0,103$ mM, $R_2 = 0,978$)). Điều này cho thấy giá trị K_M cũng có một sự ổn định tốt theo thời gian. Nghiên cứu của McMahon và cộng sự việc cũng đã kết luận việc sử dụng PEI đã làm giảm đáng kể giá trị K_M ($0,65 \pm 0,05$ mM, PEI, $n = 20$) so với nhóm không sử dụng PEI ($5,4 \pm 0,7$ mM ($n = 45$, $p < 0,001$)), lý giải cho hiện tượng trên là vai trò của PEI (tích điện dương) trong việc giảm bớt lực đẩy tĩnh điện giữa enzyme và cơ chất đều mang điện tích âm [10][15]. PEI giúp giảm rào cản điện từ giữa các enzyme và cơ chất từ đó làm giảm đáng kể giá trị K_M .

4.3. Linear Region Slope

Vào ngày 1, LRS ở tất cả các nồng độ của PEI được sử dụng trong thí nghiệm cao hơn đáng kể so với nhóm chứng. Vào ngày thứ 8, PEI từ 0,5% đến 2,5% cho thấy giá trị LRS cao hơn nhóm chứng. Với

nồng độ PEI 1% thì LRS có giá trị cao nhất là $0,0004 \pm 0,0001$ nA mM⁻¹ ($R_2 = 0,999$) trong ngày 1 và $0,0003 \pm 0,0002$ nA mM⁻¹ ($R_2 = 0,999$) trong ngày 8 so với tất cả các nhóm còn lại. So sánh với nghiên cứu của Ford và cộng sự cũng cho thấy việc sử dụng PEI làm tăng sự ổn định theo thời gian của cảm biến sinh học [4]. Do đó chúng tôi khẳng định rằng, chỉ có PEI 1% cho thấy sự ổn định cao.

5. KẾT LUẬN

Sau khi so sánh các nhóm thiết kế cảm biến sinh học của Glutamate *in vitro*, chúng tôi nhận thấy nồng độ PEI từ 0,5% đến 1% là tốt nhất nếu chỉ dựa trên giá trị V_{MAX} , K_M và đồng thời sử dụng nồng độ PEI dao động từ 0,5% đến 1% dẫn đến ổn định. PEI 1% cho thấy sự ổn định cao với giá trị LRS cao nhất cả ngày 1 và ngày 8.

Do đó, nồng độ PEI 1% là lựa chọn tối ưu nhất cho việc theo dõi nồng độ glutamate trong cơ thể với độ nhạy, độ đặc hiệu cao và tính ổn định theo thời gian.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Abian, O. , Wilson, L. , Mateo, C. , Fernández-Lorente, G. , Palomo, J. M. , Fernández-Lafuente, R. , Guisán, J. M. , Re, D. , Tam, A. , Daminatti, M. (2002), Preparation of artificial hyper-hydrophilic micro-environments (polymeric salts) surrounding enzyme molecules: New enzyme derivatives to be used in any reaction medium, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 19-20, 295-303.
2. Ambrózy, A. , Hlavatá, L. , Labuda, J. (2013), Protective membranes at electrochemical biosensors, *Acta Chimica Slovaca*, 6 (1), 35-41.
3. Christwardana, M. , Kim, K. J. , Kwon, Y. (2016), Fabrication of mediatorless/ membraneless glucose/ oxygen based biofuel cell using biocatalysts including glucose oxidase and laccase enzymes, *Scientific Reports*, 6, 1-9.

4. Ford, R. , Quinn, S. J. , O'Neill, R. D. (2016), Characterization of biosensors based on recombinant glutamate oxidase: comparison of crosslinking agents in terms of enzyme loading and efficiency parameters, *Sensors*, 16 (10), 1565-1582.
5. Gómez-Anquela, C. , García-Mendiola, T. , Abad, J. M. , Pita, M. , Pariente, F. , Lorenzo, E. (2015), Scaffold electrodes based on thioctic acid-capped gold nanoparticles coordinated Alcohol Dehydrogenase and Azure A films for high performance biosensor, *Bioelectrochemistry*, 106, (Part B), 335 -342.
6. Kara, S. (2012), *A roadmap of biomedical engineers and milestones*, Publisher InTech, 116-142.
7. Kirwan, S. M. , Rocchitta, G. , McMahon, C. P. , Craig, J. D. , Killoran, S. J. , O'Brien, K. B. , Serra, P. A. , Lowry, J. P. , O'Neill, R. D. (2007), Modifications of poly(o-phenylenediamine) permselective layer on Pt-ir for biosensor application in neurochemical monitoring, *Sensors*, 7 (4), 420-437.
8. Kuswandi, B. , Irmawati, T. , Hidayat, M. A. , Jayus and Ahmad, M. (2014), A simple visual ethanol biosensor based on alcohol oxidase immobilized onto polyaniline film for halal verification of fermented beverage samples, *Sensors*, 14 (2), 2135-2149.
9. McMahon, C. P. , Rocchitta, G. , Serra, P. A. , Kirwan, S. M. , Lowry, J. P. , O'Neill, R. D. (2006), The efficiency of immobilised glutamate oxidase decreases with surface enzyme loading: an electrostatic effect, and reversal by a polycation significantly enhances biosensor sensitivity, *The Royal Society of Chemistry*, 131, 68-72.
10. McMahon, C. P. , Rocchitta, G. , Serra, P. A. , Kirwan, S. M. , Lowry, J. P. , O'Neill, R. D. (2006), Control of the oxygen dependence of an implantable polymer/enzyme composite biosensor for glutamate, *Analytical Chemistry*, 78 (7), 2352-2359.
11. Monti, P. , Calia, G. , Marceddu, S. , Dettori, M. A. , Fabbri, D. , Jaoua, S. , O'Neill, R. D. , Migheli, Q. , Delogu, G. , Serra, P. A. (2017), Low electro-synthesis potentials improve permselectivity of polymerized natural phenols in biosensor applications, *Talanta*, 162, 151-158.
12. Pingarrón, J. M. , Yáñez-Osedeño, P. , González-Cortés, A. (2008), Gold nanoparticle - based electrochemical biosensors, *Electrochimica Acta*, 53 (19), 5848-5866.
13. Rocchitta, G. , Migheli, R. , Dedola, S. , Calia, G. , Desole, M. S. , Miele, E. , Lowry, J. P. , O'Neill, R. D. , Serra, P. A. (2007), Development of a distributed, fully automated, bidirectional telemetry system for amperometric microsensor and biosensor applications, *Sensors and Actuators B*, 126 (2), 700-709.
14. Rocchitta, G. , Secchi, O. , Alvau, M. D. , Migheli, R. , Calia, G. , Bazzu, G. , Farina, D. , Desole, M. S. , O'Neill, R. D. , Serra, P. A. (2012), Development and characterization of an implantable biosensor for telemetric monitoring of ethanol in the brain of freely moving rats, *Analytical Chemistry*, 84 (16), 7072-7079.
15. Rocchitta, G. , Spanu, A. , Babudieri, S. , Latte, G. , Madeddu, G. , Galleri, G. , Nuvoli, S. , Bagella, P. , Demartis, M. I. , Fiore, V. , Manetti, R. , Serra, P. A. (2016), Enzyme biosensors for biomedical applications: strategies for safeguarding analytical performances in biological fluids, *Sensors*, 16 (6), 780-801.
16. Serra, P. A. , Rocchitta, G. , Bazzu, G. , Manca, A. , Puggioni, G. M. , Lowry, J. P. , O'Neill, R. D. (2007), Design and construction of a low cost single-supply embedded telemetry system for amperometric biosensor applications, *Sensors and Actuators B*, 122 (1), 118-126.
17. Serra, P. A. (2011), *Biosensors for health, environment and biosecurity*, Publisher InTech, 71-86.
18. Serra, P. A. (2011), *New Perspectives in Biosensors Technology and Applications*, Publisher InTech, 198-267.