

Development of an innovative microcantilever-based biosensor for 17 β -estradiol detection in bovine muscles: preliminary results

Danilo Pitardi,¹ Marzia Pezzolato,¹ Maria Cavarretta,¹ Guia Richelmi,¹ Marilena Gili,¹ Daniele Di Corcia,² Niccolò Ciprianetti,³ Ivan Ferrante,³ Karin Santoro,³ Carlo Ricciardi,³ Elena Bozzetta¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino;

²Centro Regionale Antidoping,

Orbassano; ³Laboratorio di Tecnologie Elettrobiochimiche Miniaturizzate per l'Analisi e la Ricerca - Politecnico di Torino, Torino, Italy

Abstract

17 β -estradiol is the most powerful substance with estrogenic effect, commonly used as illegal growth promoter in livestock production. To avoid health risks for consumers, sensitive, reliable and low-cost methods for quantification of extremely low concentrations of such carcinogenic residues in food are needed. Antibody-immobilised microcantilever resonators were proposed as innovative biosensors able to quantify an adsorbed target mass thanks to a shift in resonance frequency. Furthermore, the quantification of masses on the order of few picograms has recently shown to be successfully achievable with very high precision. In this study, we analysed the performance of our microcantilever sensors using extracted samples of bovine muscle from experimental animals, containing variable concentrations of 17 β -estradiol (HPLC-MS/MS tested). Preliminary data showed that treated animals are correctly revealed, exhibiting large negative frequency shifts. More experiments, though, are needed to obtain a correct quantification of 17 β -estradiol concentration.

Introduzione

Benché gli estrogeni siano stati messi al bando nel nostro paese dal 1961 (Repubblica Italiana, 1961) rappresentano ancora una classe di molecole molto utilizzata fraudolentemente a scopo anabolizzante. La facile reperibilità nel mercato nero di prodotti registrati

per Paesi extraeuropei, la disponibilità nel nostro Paese di preparazioni ad uso umano e veterinario, nonché un favorevole rapporto costo/beneficio sono stati i fattori principali che ne hanno favorito la diffusione in Europa (Nebbia, 2009).

Grande favore ha sempre incontrato in particolare modo il composto naturale (17 β -estradiolo) sia per l'ottima efficacia anabolizzante che per la difficoltà di metterne in evidenza l'origine esogena.

Per la ricerca di questa molecola negli animali produttori di derrata, il Piano Nazionale Residui prevede campionamenti soltanto in allevamento e limitatamente ai vitelli/vitelloni, con limiti sierici fissati a 40 ppt (DM 14 novembre 1996; Ministero della Sanità, 1996). Studi condotti negli anni Ottanta-Novanta hanno portato gli esperti del *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (JECFA) alla determinazione di un *acceptable daily intake* ed evidenziato l'inutilità di un limite massimo residuale (LMR) per le carni (WHO, 1988).

Negli ultimi anni, però, l'aumento dell'incidenza di patologie ormono-dipendenti quali telarca, ginecomastia e ovaie policistiche (Akslae *et al.*, 2006) pone qualche dubbio sulla validità di tali studi, soprattutto per alcune fasce a rischio: ragazzi in età prepubere e donne in gravidanza.

Come evidenziato da numerose ricerche, la sensibilità del feto e dei soggetti giovani ai perturbanti endocrini sembra esponenzialmente maggiore di quella degli adulti e di quella calcolata dalla Food and Drug Administration (FDA) e dal JECFA (Baik *et al.*, 2005; Ramaswamy, 2005; Akslae *et al.*, 2006). Si evidenzia dunque la necessità di rivalutare i livelli di 17 β -estradiolo considerati sicuri per le suddette fasce a rischio, di riconsiderare la necessità di LMR per i tessuti animali, nonché di sviluppare metodiche rapide e sensibili per la determinazione di questo analita, a livello di ppt, negli alimenti di origine animale.

In questo lavoro vengono presentati i risultati preliminari di uno studio volto proprio allo sviluppo di un metodica rapida, basata su microcantilever (MC), per la determinazione dei livelli di 17 β -estradiolo nel muscolo bovino. I MC sono piccoli trampolini di silicio che vibrano alla loro frequenza naturale, la frequenza di risonanza. Analizzando le variazioni di frequenza quando una massa si lega alla superficie, si riesce a quantificare la massa adsorbita. In numerosi studi è stato possibile quantificare masse dell'ordine di nano-zeptogrammi. Se la superficie è attivata con biorecettori specifici (tipicamente anticorpi), allora la microbilancia diventa un biosensore selettivo per la molecola d'interesse.

Correspondence: Danilo Pitardi, Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, via Bologna 148, 10154 Torino, Italy.
Tel. +39.011.2686348 - Fax: +39.011.2686322.
E-mail: danilo.pitardi@izsto.it

Key words: 17 β -Estradiol detection, Bovine muscle, Microcantilever, Biosensor.

Received for publication: 15 January 2013.
Revision received: 19 April 2013.
Accepted for publication: 21 April 2013.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 License (by-nc 3.0).

©Copyright D. Pitardi *et al.*, 2013
Licensee PAGEPress, Italy
Italian Journal of Food Safety 2013; 2:e12
doi:10.4081/ijfs.2013.e12

Materiali e Metodi

Scelta dei campioni

Muscoli bovini provenienti da animali sperimentali (trattati e controlli) sono stati valutati mediante *high performance liquid chromatography-mass spectrometry* (HPLC-MS/MS) e selezionati sulla base delle concentrazioni rilevate di 17 β -estradiolo. In particolare, per questo studio sono stati scelti 4 campioni con concentrazioni di 0, 45, 73, 90 ppt.

Estrazione dei campioni

Per le analisi sono stati utilizzati circa 2 g di campione, sottoposti ad una fase estrattiva liquido/liquido seguita da una purificazione su cartucce per estrazione in fase solida [*solid phase extraction C18-modified* (SPE C18)]. L'estratto finale è stato portato a secco e successivamente ripreso con 1 mL di soluzione buffer.

Produzione dei microcantilever e analisi degli estratti

Cinque array comprendenti 11 cantilever realizzati presso le camere pulite dei laboratori del Politecnico di Torino sono stati modificati chimicamente attraverso reazioni con amminopropiltriotosilano (APTES) e successivamente Glutaraldeide per permettere il legame stabile con la proteina G e infine immobilizzare correttamente l'anticorpo selettivo per la molecola 17 β -estradiolo. La frequenza di risonanza, misurata prima e dopo l'incubazione per un'ora con gli estratti e col solo buffer d'estrazione (bianco reagente), è stata monitorata attraverso un sistema composto da un diodo laser e un fotorivelatore (PSD). Infine è stato attribuito a ogni analisi un valore, calcolato come la media delle variazioni

relative di frequenza di ogni cantilever che compone l'array stesso.

Risultati e Discussione

Le misure effettuate sugli estratti di carne hanno mostrato la validità del metodo basato su nano-biosensori a cantilever. Infatti, mentre il campione di tessuto negativo ha mostrato un segnale estremamente basso, confrontabile con quello dovuto al solo buffer di estrazione, i campioni provenienti da animali trattati (45, 73, 90 ppt) sono stati riconosciuti come tali, in virtù dello shift negativo misurato sulla frequenza di risonanza (Figura 1). Successive misure saranno realizzate per ottenere una più precisa quantificazione delle concentrazioni di 17β -estradiolo.

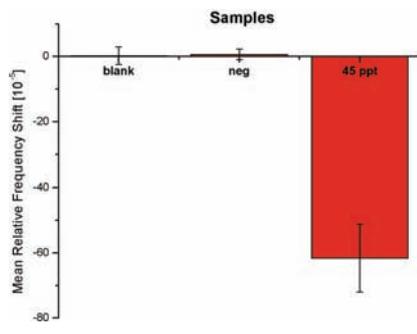


Figura 1. Differenze di frequenza rilevate analizzando bianco reagente (blank), campione da animale controllo (neg) e campione da animale trattato (45 ppt).

Conclusioni

Il 17β -estradiolo è la più potente sostanza naturale ad azione estrogenica ed è spesso impiegato illegalmente come promotore della crescita negli animali produttori di derrate alimentari.

La facile reperibilità nel mercato di prodotti a uso umano e veterinario, l'ottima efficacia anabolizzante e la difficoltà di dimostrarne l'origine esogena, sono tra i fattori principali che ne hanno favorito la diffusione.

In questo lavoro sono presentati i risultati preliminari di uno studio volto allo sviluppo di una metodica rapida basata su MC funzionalizzati con anticorpo anti- 17β -estradiolo, per la determinazione dei livelli di quest'ormone nel muscolo bovino.

I risultati dello studio hanno mostrato che le microbance sono state funzionalizzate con successo utilizzando l'anticorpo anti- 17β -estradiolo. Gli MC così sviluppati sono stati inoltre in grado di legare e rivelare l'analita presente nei campioni di muscolo bovino. I dati preliminari mostrano come la tecnica sia particolarmente promettente al fine di mettere in evidenza piccole quantità di analita, considerati i bassi livelli di residuo attesi nelle carni; ulteriori prove sperimentali sono in corso per valutare le prestazioni del metodo.

Bibliografia

Aksglæde L, Juul A, Leffers H, Skakkebaek NE,

Andersson A, 2006. The sensitivity of the child to sex steroids: possible impact of exogenous estrogens. *Hum Reprod Update* 12;341-9.

Baik I, Devito WJ, Ballen K, Becker PS, Okulicz W, Liu Q, Delpapa E, Lagiou P, Sturgeon S, Trichopoulos D, 2005. Association of fetal hormone levels with stem cell potential: evidence for early life roots of human cancer. *Cancer Res* 65;358-63.

Nebbia C, 2009. Residui di farmaci e contaminanti ambientali nelle produzioni animali. Edises, Napoli, Italia.

Ministero della Sanità, 1996. Determinazione dei livelli fisiologici massimi degli ormoni sessuali di natura endogena 17β -estradiolo, progesterone e testosterone nel siero o nel plasma di sangue bovino. DM 14 novembre 1996. In: *Gazzetta Ufficiale* n. 24, 30/1/1997.

Ramaswamy S, 2005. Pubertal augmentation in juvenile rhesus monkey testosterone production induced by invariant gonadotropin stimulation is inhibited by estrogen. *J Clin Endocr Metab* 90;5866-75.

Repubblica Italiana, 1961. Divieto dell'impiego degli estrogeni come fattori di crescita o di neutralizzazione sessuale negli animali le cui carni e prodotti sono destinati all'alimentazione umana. DL 3/02/1961, n. 4. In: *Gazzetta Ufficiale* n. 43, 18/02/1961.

WHO, 1988. Thirty-second report of the joint FAO/WHO expert committee on food additives (JECFA). WHO ed., Ginevra, Svizzera.