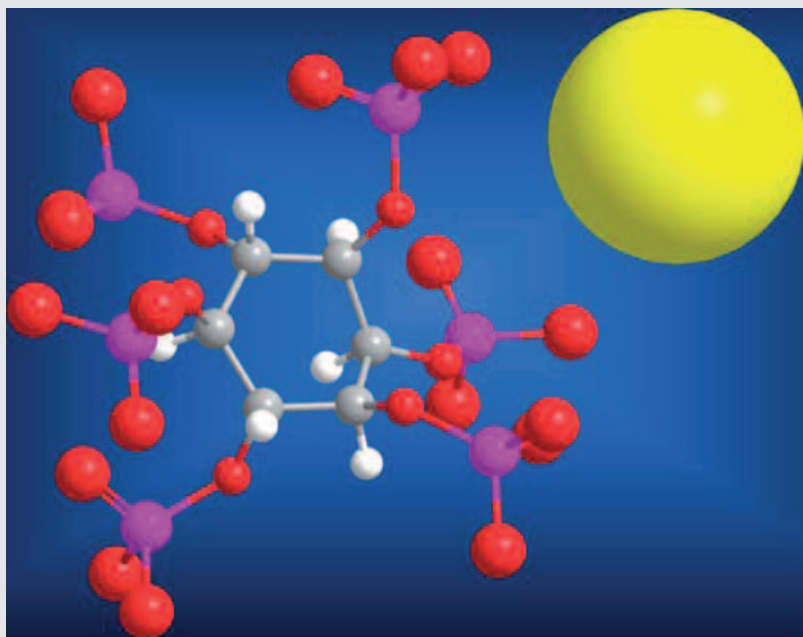




Gabriele Lando
Dipartimento di Chimica Inorganica,
Chimica Analitica e Chimica Fisica
Università di Messina
glando@unime.it

IL FITATO COME AGENTE SEQUESTRAANTE. UN LEGANTE “SAFE” E “LOW COST”

Il fitato è una molecola naturale ubiquitaria di notevole interesse biologico, tecnologico e ambientale. L'elevata disponibilità a basso costo ne favorisce l'impiego in molti settori strategici (farmaceutico, remediation, etc.), grazie alla sua spiccata capacità complessante verso molti cationi.

L'1,2,3,4,5,6-exakis(di-idrogenofosfato)myo-inositolo, meglio conosciuto come acido fitico (Fig. 1), è largamente diffuso in natura, principalmente sotto forma di sali di magnesio e potassio, ed è ubiquitario in tutte le cellule eucariotiche. Da quando, nel 1903, è stata dimostrata la presenza di questo composto nei semi di molte piante, i fitati sono diventati oggetto di studio in molti settori. Numerose ricerche sono incentrate sullo studio della sua struttura, del suo comportamento chimico e delle sue proprietà funzionali e nutrizionali, principalmente legate alla caratteristica del fitato di formare complessi molto stabili con ioni metallici, proteine ed amidi. Quest'autore è stato insignito del Premio Fernando Pulidori 2010

sti complessi sono spesso insolubili in condizioni fisiologiche, o troppo forti per rilasciare principi nutritivi, rendendoli così indisponibili per i vari organismi. L'acido fitico forma inoltre delle specie scarsamente solubili anche con molti metalli pesanti e radionuclidi ed è quindi impiegato con successo nel trattamento *in situ* di corpi idrici e suoli contaminati da tali sostanze. Numerose sono anche le evidenze sperimentali a favore delle sue proprietà antiossidanti e antitumorali. È stato anche dimostrato che esso riduce la formazione di calcoli renali ed è presente in farmaci per il trattamento di numerose patologie. Molte di queste proprietà ed applicazioni sono discusse in letteratura [1-6]. Un

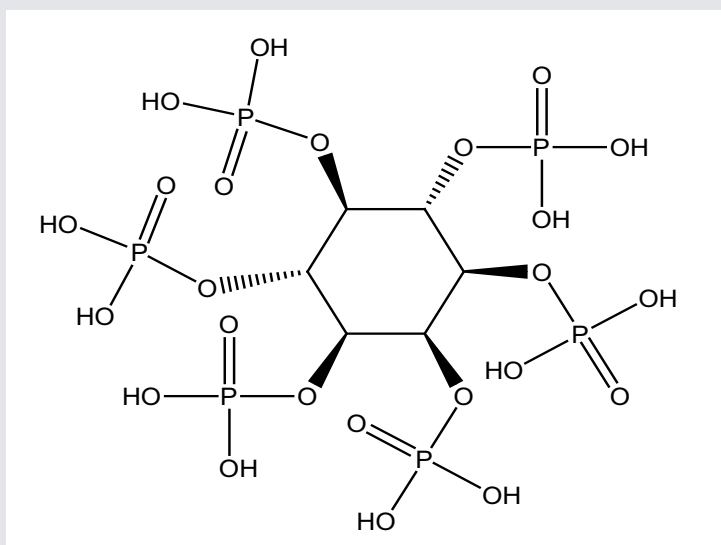


Fig. 1 - Struttura dell'acido fitico

valido approccio alla comprensione di tutte queste caratteristiche non può prescindere da un corretto studio della speciazione dell'acido fitico in fluidi naturali. Infatti, tutte le proprietà citate sono fortemente regolate dalle sue proprietà acido-base, dalla solubilità e dalla sua capacità complessante verso cationi metallici, organometallici e organici (e.g., poliammine). Il comportamento in soluzione del fitato è a sua volta funzione di numerose variabili come pH, forza ionica, temperatura e mezzo ionico. Purtroppo, però, i dati di letteratura sulla speciazione del fitato in fluidi naturali sono relativamente scarsi e disomogenei, in netto contrasto con l'elevatissimo numero di lavori pubblicati sulle sue caratteristiche ed applicazioni. Per tale ragione, è stato intrapreso uno studio sistematico della speciazione dell'acido fitico in soluzione acquosa, riguardante le sue proprietà acido-base, la solubilità e le interazioni con numerosi cationi metallici ed organometallici di interesse biologico ed ambientale [7-13]. È stata anche valutata l'entità delle interazioni tra il fitato ed alcune ammine biogeniche, considerata la simultanea presenza in molte matrici biologiche. In questo contributo si riportano alcuni risultati sulla speciazione e sulla capacità sequestrante del fitato nei confronti del cadmio(II).

Risultati e discussione

I risultati riportati in questo contributo sulle interazioni tra il cadmio(II) ed il fitato (Phy) sono stati ottenuti mediante tecniche voltammetriche e potenziometriche. In particolare sono state utilizzate la potenziometria con elettrodi a vetro (ISE-H⁺) [9] ed a cadmio (ISE-Cd²⁺) e la voltammetria differenziale pulsata con stripping anodico (DP-ASV). In tutti i casi sono state effettuate titolazioni, con NaOH, di soluzioni contenenti quantità note e variabili di Cd(NO₃)₂, PhyH₁₂, HNO₃ e NaNO₃. Questo ha permesso di determinare, tramite la soluzione delle opportune equazioni di bilancio di massa, la stabilità delle varie specie formate, con stechiometria Cd_jH_iPhy (j = 1-3 e i = 1-7) variabile, funzione del pH e delle concentrazioni relative dei reagenti. In De Stefano *et al.* [9] è riportata la formazione di diverse specie polinucleari (Cd_jH_iPhy^(i+2j-7),

con j = 1, 2; 4 ≤ i ≤ 7 e la specie Cd₃H₄Phy) e la dipendenza dalla forza ionica delle costanti di formazione secondo le equazioni della teoria della interazione specifica (SIT) e della teoria di Debye-Hückel estesa. Recentemente questo gruppo ha proposto per l'anione fitato una carica media, in mezzi ionici concenenti sodio, pari a z = -7 ([9, 14]). Le titolazioni effettuate con elettrodo ISE-Cd²⁺ hanno permesso di determinare solo le costanti di formazione delle specie CdH₅Phy e CdH₆Phy. Il ristretto intervallo di pH investigato non ha consentito la determinazione delle specie che si formano a valori di pH molto acidi e molto alcalini.

Le titolazioni voltammetriche (DP-ASV) sono state effettuate sfruttando la metodica riportata in diversi articoli da Cuckovsky *et al.* [15, 16], interfacciando però il sistema voltammetrico a quello potenziometrico per mezzo di una "remote box" e stabilendo la comunicazione tra i due strumenti tramite un metodo "home-made", i cui dettagli sperimentali sono riportati in [17]. Dall'analisi dei dati ottenuti è stato possibile determinare la stabilità di sette specie mononucleari, cioè: CdHPhy⁴⁻, CdH₂Phy³⁻, CdH₃Phy²⁻, CdH₄Phy⁻, CdH₅Phy, CdH₆Phy⁺, CdH₇Phy²⁺. In Tab. 1 sono riportati i valori di costanti di stabilità ottenuti tramite le tre tecniche analitiche utilizzate.

Per comprendere l'obiettivo di questo contributo, è fondamentale, a questo punto, discutere le motivazioni che ci hanno condotto alla scelta delle tecniche analitiche. La potenziometria è certamente la tecnica più utilizzata negli studi di speciazione, in quanto l'interpretazione dei dati sperimentali è relativamente semplice, oltre che affidabile, e la strumentazione richiesta è disponibile a costi relativamente bassi, oltretutto vi sono innumerevoli riferimenti che dimostrano l'elevata specificità di questa tecnica nell'analisi di equilibrio. D'altro canto, la potenziometria richiede, per ottenere informazioni attendibili, una concentrazione dei reagenti dell'ordine del millimolare (10⁻³ mol L⁻¹), quindi sufficientemente elevata per la formazione sia di specie polinucleari (con due o più ioni metallici aggregati) che di specie poco solubili (come nel caso Cd(II)/Phy), a valori di pH relativamente bassi (pH~6). Questo problema spesso limita il range di pH investigabile alla sola parte acida, nel caso del sistema Cd(II)/Phy, infatti, la misure potenziometriche sono state effettuate fino a pH~5,5. Per ovviare a queste limitazioni, abbiamo ritenuto opportuno utilizzare la voltammetria, una tec-

Tab. 1 - Costanti di stabilità delle specie mononucleari CdH_iPhy⁽⁵⁻ⁱ⁾⁻, ottenute tramite ISE-H⁺ [9], ISE-Cd²⁺ e DP-ASV a I = 0,1 mol·L⁻¹ e t = 25 °C

i	log K _i ^{a)}		
	ISE-Cd ²⁺ b, c)	DP-ASV b, c)	ISE-H ⁺ d)
1		6,97±0,36	(7,22)
2		6,74±0,21	(7,15)
3		6,04±0,02	(6,12)
4		4,84±0,01	5,14
5	4,61±0,12	4,22±0,09	4,50
6	4,24±0,08	4,02±0,14	3,98
7		3,97±0,16	4,18

a) log K_i si riferisce all'equilibrio: Cd + H_iPhy = CdH_iPhy

b) in NaNO_{3(aq)}; c) ±95% C.I.; d) in NaCl_{aq}; i valori in parentesi sono calcolati (vedi rif. [9])

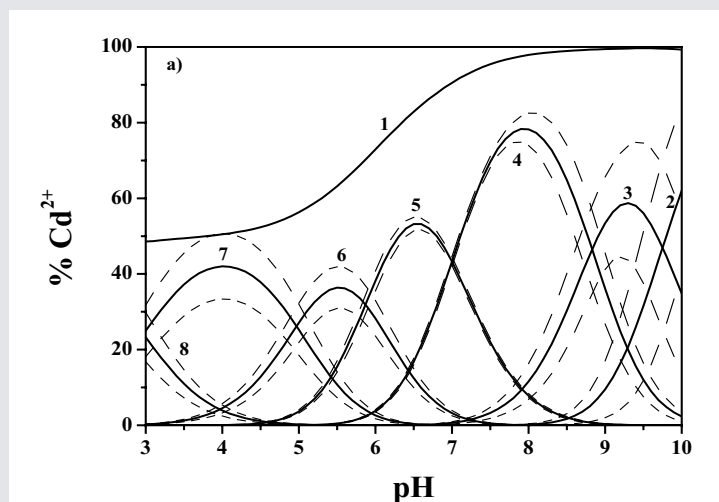


Fig. 2 - Diagramma di distribuzione delle specie $\text{CdH}_3\text{Phy}^{(6-3-)}$ vs. pH, ottenuto con dati DP-ASV. Condizioni sperimentali $c_{\text{Cd}} = 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $c_{\text{Phy}} = 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $I = 0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e $t = 25^\circ\text{C}$. Specie. 1. sommatoria di tutte le specie $\text{CdH}_i\text{Phy}^{(6-i-)}$; 2. CdHPhy^{4-} ; 3. $\text{CdH}_2\text{Phy}^{3-}$; 4. $\text{CdH}_3\text{Phy}^{2-}$; 5. $\text{CdH}_4\text{Phy}^{1-}$; 6. CdH_5Phy^0 ; 7. CdH_6Phy^+ ; 8. $\text{CdH}_7\text{Phy}^{2+}$. Le curve tratteggiate rappresentano le bande di confidenza

nica che ci permette, al pari della potenziometria, di calcolare le costanti di stabilità lavorando con concentrazioni di metallo più basse di diversi ordini di grandezza. Questo rende possibile lo studio in intervalli di pH più ampi, limitando la formazione di specie poco solubili (e polinucleari) e ci fornisce, inoltre, informazioni in condizioni sperimentali più simili a quelle di un fluido naturale. I risultati ottenuti con le diverse tecniche possono essere considerati complementari ed analizzati con spirito critico danno di certo un'idea più chiara degli equilibri di formazione delle specie in soluzione, soprattutto in sistemi che presentano una elevata complessità, come quello in esame.

I valori di costanti di stabilità riportati in Tab. 1, ottenuti tramite potenziometria e voltammetria sono in buon accordo tra di loro, ma occorre sottolineare che tali valori per le specie CdHPhy , CdH_2Phy e CdH_3Phy , relativi alle misure potenziometriche con ISE- H^+ sono riportati in parentesi in quanto calcolati tramite una equazione predittiva (vedi [9]) e non determinati sperimentalmente.

Le differenze riscontrate nei valori delle costanti di stabilità possono essere attribuite ai diversi schemi di speciazione (ricordiamo che nel caso della potenziometria con ISE- H^+ sono considerate anche le specie polinucleari) ed agli errori, spesso elevati, associati a questo tipo di costanti [7].

La definizione dello schema di speciazione di un sistema è certamente il passo fondamentale per la comprensione del comportamento di una qualsiasi specie chimica. Nella fattispecie la conoscenza dello schema di speciazione del sistema Cd(II)/Phy ci permette di conoscere il comportamento dello ione Cd(II) in presenza di fitato al variare di parametri termodinamici. Certamente questo è forse l'aspetto più importante nel campo degli equilibri in soluzione, in quanto la conoscenza di pochi parametri (costanti e parametri di dipendenza da temperatura, forza ionica etc.) ci dà la possibilità conoscere, con l'ausilio di opportuni modelli, tutte le specie presenti in soluzione in modo

quali-quantitativo. A questo proposito è interessante mostrare un diagramma di distribuzione (Fig. 2), in cui si può notare come il fitato complessi il cadmio (nelle condizioni sperimentali selezionate) in tutto l'intervallo di pH considerato, arrivando a complessare la totalità del cadmio presente in soluzione a $\text{pH} > 8$ (come sommatoria delle specie presenti). La percentuale di formazione delle singole specie è variabile tra un valore di 20% per la specie CdH_7Phy ($\text{pH}=4$) fino ad un valore di 70% per la specie CdH_3Phy ($\text{pH}=8$). Sono anche riportate, con linee tratteggiate, le bande di confidenza, delle curve di formazione delle specie; la distanza di tali bande dalla curva continua, che rappresenta il valore medio, è funzione dell'errore associato alla costante di formazione della specie stessa.

Una applicazione molto interessante degli studi di speciazione è la determinazione della sequestrazione di un dato legante nei confronti di un metallo. Spesso è molto complesso, se non impossibile poter paragonare il "potere complessante" di diversi leganti rispetto ad un metallo o viceversa, poiché sono quasi sempre presenti diversi schemi di speciazione oltre che reazioni competitive, come la protonazione del legante, l'idrolisi del metallo, etc.

Per questo motivo spesso è davvero complesso captare informazioni, che siano fruibili da chiunque riguardo eventuali applicazioni in campi diversi dalla chimica analitica. Per questo motivo, da qualche anno a questa parte è stato proposto un parametro semi-empirico ed oggettivo che prende il nome di pL_{50} . Il pL_{50} , che equivale al $-\log c_L$ (c_L = concentrazione analitica del legante), rappresenta la concentrazione di legante necessaria a complessare il 50% del metallo presente in traccia. Tale parametro è fortemente dipendente dalle condizioni sperimentali (pH , I , t etc.), ma tiene conto di tutte le reazioni competitive, ed è quindi corretto confrontare i valori di pL_{50} di diversi leganti rispetto ad un metallo, a parità di condizioni sperimentali. Alla luce di quanto detto in precedenza, la determinazione del pL_{50} potrebbe sembrare molto complessa, tuttavia in moltissimi casi è possibile formulare delle semplici relazioni $\text{pL}_{50} = f(\text{pH}, I, t \text{ etc.})$. Ad esempio, nel caso del sistema Cd(II)/Phy , abbiamo determinato i valori di pL_{50} a diversi valori di pH (Tab. 2). A titolo di esempio riportiamo in Fig. 3 anche alcuni diagrammi di sequestrazione calcolati con i dati ottenuti dalle misure voltammetriche.

La relazione che lega pL_{50} e pH è (Fig.4):

$$\text{pL}_{50} = (1,1 \pm 0,3) + (0,55 \pm 0,04)\text{pH}$$

Tab. 2 - Valori di pL_{50} ^{a)} per il sistema Cd(II)/Phy a $I = 0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e $t = 25^\circ\text{C}$

pH	pL_{50}		
	ISE- H^+ ^{b)}	DP-ASV ^{c)}	ISE- Cd^{2+} ^{c)}
5,00	3,79	4,14	4,40
6,00	4,22	4,41	4,57
7,35	4,92	5,26	
8,10	5,42	5,77	
9,00	5,99	6,28	

^{a)} $\sigma = \pm 0,1$; ^{b)} in NaClaq ; ^{c)} in NaNO_3aq

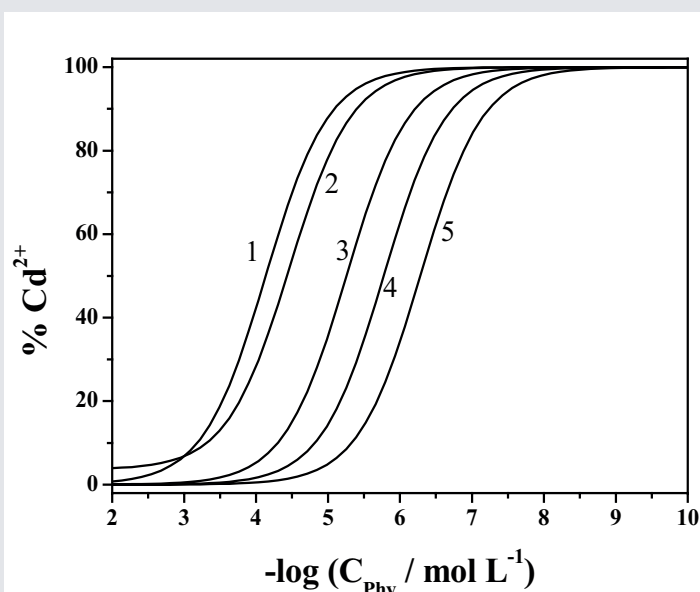


Fig. 3 - Diagrammi di sequestrazione del Cd(II) in presenza di fitato calcolati con dati DP-ASV. Percentuale di Cd(II) non complessato dal fitato rispetto alla concentrazione totale di fitato (come $-\log_{10} C_{Phᵥ}$) per il sistema Cd/Phy a $I = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $t = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, a differenti valori di pH; $c_{Cd} = 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Simboli. 1: pH = 5,0; 2: pH = 6,0; 3: pH = 7,35; 4: pH = 8,1; 5: pH = 9,0

e questa relazione fornisce la possibilità di determinare il valore di pL_{50} ad ogni valore di pH compreso nell'intervallo $5 \leq \text{pH} \leq 9$. Effettuando qualche semplice calcolo stechiometrico se ci trovassimo in una situazione di un corpo idrico di volume pari a 1000 l, ad un pH = 8,1, una forza ionica $I = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ed a $t = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, che fosse inquinato da cadmio(II) ad una concentrazione pari a $c_{Cd} = 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, noto il pL_{50} del fitato in queste condizioni ($pL_{50} = 5,77$, Tab. 2), sareb-

bero necessari 1,25 g di fitato (come $K_2H_{10}Phy$, prodotto commerciale) per sequestrare il 50% del cadmio totale e modificarne in modo drastico la biodisponibilità. Il costo sarebbe ridottissimo, in quanto il prodotto commerciale al 95% di purezza è molto economico, inoltre il fitato è una molecola naturalmente presente in tutti gli organismi, quindi l'aggiunta della stessa al corpo idrico non comporterebbe problemi di tossicità. Infine questo legante sequestrerebbe anche gli altri metalli pesanti eventualmente presenti, come riportato in altri lavori pubblicati su questo argomento dal gruppo di ricerca di Chimica Analitica dell'Università di Messina ([7-13, 18]).

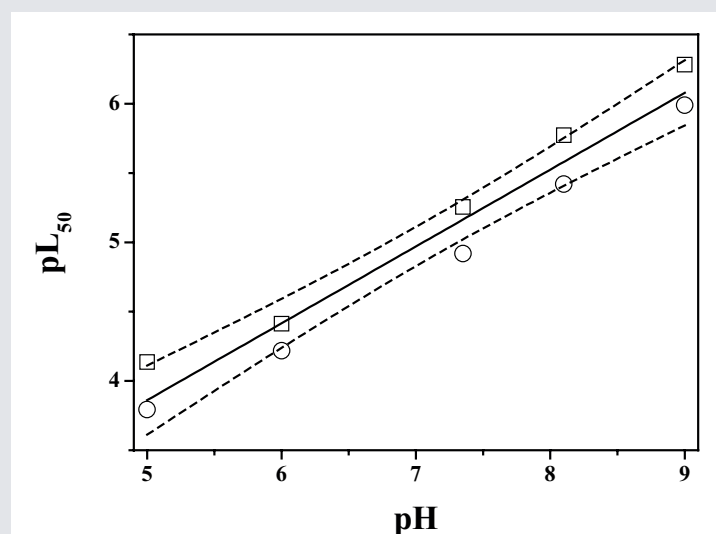


Fig. 4 - Relazione tra pL_{50} e pH. I valori di pL_{50} sono stati determinati dai diagrammi di sequestrazione (vedi Fig. 3) per il sistema Cd(II)/fitato a $I = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ e $T = 298,15 \text{ K}$. Simboli: $\square$: DP-ASV/ NaNO_{3aq} ; $\circ$: ISE- H^+ / NaCl_{aq} [9]. Linee tratteggiate: bande di confidenza (95 %)

Bibliografia

- [1] F. Crea *et al.*, *Coord. Chem. Rev.*, 2008, **252**, 1108.
- [2] E. Graf, J. W. Eaton, *Free Rad. Biol. Med.*, 1990, **8**, 61.
- [3] J.A. Maga, *J. Agric. Food Chem.*, 1982, **30**, 1.
- [4] L. Oatway *et al.*, *Food Rev. Int.*, 2001, **17**, 419.
- [5] N.R. Reddy *et al.*, *Phytates in Cereals and Legumes*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1989.
- [6] N.R. Reddy, S.K. Sathe, *Food Phytates*, CRC Press, Boca Raton, 2001.
- [7] R.M. Cigala *et al.*, *J. Chem. Eng. Data*, 2010, in press.
- [8] F. Crea *et al.*, *J. Solution Chem.*, 2009, **38**, 115.
- [9] C. De Stefano *et al.*, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2006, **386**, 346.
- [10] C. De Stefano *et al.*, *Biophys. Chem.*, 2005, **116**, 111.
- [11] C. De Stefano *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 2006, **54**, 1459.
- [12] F. Crea, *et al.*, *Ann. Chim. (Rome)*, 2007, **97**, 635.
- [13] F. Crea *et al.*, *Monatsh. Chem.*, 2010, **141**, 511.
- [14] R.M. Cigala *et al.*, *J. Chem. Thermodynamics*, 2010, **42**, 1393.
- [15] I. Cukrowski, M. Adsetts, *J. Electroanal. Chem.*, 1997, **429**, 129.
- [16] I. Cukrowski *et al.*, *Anal. Chim. Acta*, 1996, **319**, 39.
- [17] C. De Stefano *et al.*, *J. Solution Chem.*, 2010, **39**, 179.
- [18] P. Crea *et al.*, *Biophys. Chem.*, 2006, **124**, 18.

RIASSUNTO

Phytate as Low Cost and Safe Sequestering Agent

Phytic acid, 1,2,3,4,5,6 hexakis (di-hydrogen phosphate) myo-inositol, is an ubiquitous natural molecule of great biological, environmental and technological interest. Its availability at reduced costs favors its use in many strategic fields (pharmaceutics, remediation, etc.), thanks to its marked binding ability toward several metal and organometal cations. The sequestering ability of phytate toward cadmium(II) is reported here as an example.