

BALLARINI G.¹, PREDIERI G.²

I chelati metallici nella nutrizione. Struttura, funzioni e metodi d'analisi

PROGRESS IN NUTRITION
VOL. 9, N. 1, 9-19, 2007

TITLE

Metal chelates in nutrition.
Structural features, functions
and analytical methods

KEY WORDS

Metal chelates, nutrition, organic
trace minerals, analysis of metal
chelates

PAROLE CHIAVE

Chelati metallici, nutrizione,
minerali in tracce, analisi dei
chelati metallici

¹Professore Emerito, Facoltà di
Medicina Veterinaria,
Università di Parma

²Professore Ordinario, Dipartimento
di Chimica G.I.A.F., Università di
Parma

Indirizzi per la corrispondenza:
Prof. Giovanni Ballarini
Facoltà di Medicina Veterinaria
Università di Parma
Via del Taglio, 8
43100 Parma
E-mail: prof.ballarini@libero.it

Prof. Giovanni Predieri
Dipartimento di Chimica G.I.A.F.
Università di Parma
V.le G.P. Usberti 17/A
43100 Parma
E-mail: giovanni.predieri@unipr.it

Summary

Mineral chelates (or metal chelates) in nutrition, i.e. the so-called organic trace minerals, represent the most outstanding proposal of mineral supplementation currently available on the market. They are formed by a transition metal ion (such as Zn^{2+} , Cu^{2+}) and one or more organic chelating molecules (ligands). It is now generally accepted that metal chelates are more bioavailable than the corresponding inorganic salts or oxides and, in spite of their higher price, their use appears nowadays useful or even necessary in some cases. The number of patents and scientific papers regarding production, properties and use of metal chelates is rapidly growing. Understanding mechanisms of their physiological behaviour is the most important target of current research in this field. Nevertheless, although in some cases the efficacy of mineral chelates has been demonstrated and helpful empirical correlations between physiological parameters and chelation strength have been found, their mode of action is far from a definitive comprehension. In fact, the intrinsic nature of metal chelates is intriguing: they belong to a large family of chemical species, which, differently from organic molecules, are not easily recognizable by usual analytical methods. In addition, their stability in solution is strongly dependent on the acidity conditions (pH), on the nature of metal ions and ligands and on the presence in solution of other competitor chelating molecules (such as phytates). For these reasons, every study aimed to bring new sound contributions to the knowledge of physiological action of metal chelates, both in vivo and in vitro, should provide for scrupulous control both of the experimental conditions and of the nature of the used chelates. Aim of this paper is just to give useful informations to approach mineral chelates through two ways: (i) description of the structure of the main species of chelates available on the market; (ii) survey of presently suitable methods for qualitative and quantitative analysis of mineral chelates. Some of these methods are in course of experimental testing and validation at the Dipartimento di Chimica G.I.A.F. of the University of Parma by the "Gruppo di Studio sui Chelati Metallici per la Nutrizione Animale" in the framework of projects financed by Ministero dell'Università e della Ricerca (PRIN/04), by Regione Emilia-Romagna (PRRIIT) and by Regione Lombardia (FIT). (http://www.ricercaitaliana.it/prin/dettaglio_prin-2004038835.htm; <http://www.chim.unipr.it/chelati/home.htm>)

Riassunto

Nel campo della nutrizione (soprattutto in quella animale, ma anche in quella umana) gli elementi metallici in tracce (*micronutrienti minerali*) sono stati somministrati in passato unicamente come integratori e sotto forma d'ossidi o sali inorganici, in quanto stabili, facilmente miscelabili negli alimenti e di costo relativamente basso. Tuttavia negli ultimi anni è cresciuto notevolmente l'interesse per le forme cosiddette *organiche* o *chelate* dei minerali da utilizzare nelle diete, in particolare quelle in associazione con amminoacidi, peptidi o altre molecole organiche. L'interesse è stato suscitato da risultati incoraggianti ottenuti in diversi test *in vivo* sugli animali d'interesse economico alimentati con mangimi contenenti minerali sotto forma di chelati. Tali risultati, attribuiti al miglioramento della biodisponibilità dei metalli, comprendono: (i) incrementi di crescita, (ii) aumenti della capacità riproduttiva (iii) generale miglioramento dello stato di salute degli animali (maggiore resistenza a varie patologie). Le ricerche di maggior rilievo degli ultimi anni sono state, e sono tuttora, rivolte alla comprensione dei meccanismi della loro azione fisiologica. Tuttavia, nonostante che in taluni casi sia stata evidenziata la loro efficacia e siano state trovate utili correlazioni empiriche fra parametri fisiologici e stato di chelazione, ci si trova ancora molto distanti da una comprensione definitiva. Inoltre la natura stessa dei chelati è particolarmente intrigante: si tratta di una famiglia molto vasta di specie, appartenenti alla categoria dei composti di coordinazione, le quali non sono facilmente identificabili, come lo sono invece le altre molecole organiche. Inoltre la loro stabilità in soluzione è fortemente dipendente dalla natura del metallo, dalla natura del chelante organico, dal pH del mezzo e dalla presenza in soluzione d'eventuali chelanti competitori. Per tale motivo, qualsiasi studio *in vivo* e *in vitro*, che voglia apportare solidi contributi alla conoscenza del meccanismo d'azione dei chelati, dovrà essere corredato della descrizione dettagliata del tipo di chelato utilizzato e delle condizioni d'utilizzo. Scopo di quest'articolo è fornire strumenti utili di conoscenza per un approccio consapevole ai chelati attraverso due percorsi: (i) illustrazione della struttura delle principali categorie di chelati presenti sul mercato; (ii) indicazione dei metodi che attualmente possono essere utilizzati per il loro riconoscimento e la determinazione quantitativa. Alcuni di tali metodi sono in corso d'avanzata sperimentazione presso il Dipartimento di Chimica G.I.A.F. dell'Università di Parma da parte del "Gruppo di Studio sui Chelati Metallici per la Nutrizione Animale" nel quadro delle attività di tre progetti cofinanziati rispettivamente dal Ministero dell'Università e della Ricerca (PRIN/04), dalla Regione Emilia-Romagna (PRRIIT) e dalla Regione Lombardia (FIT). (http://www.ricercaitaliana.it/prin/dettaglio_prin-2004038835.htm ; <http://www.chim.unipr.it/chelati/home.htm>)

Introduzione

I *chelati* dei micronutrienti metallici, in altre parole le cosiddette *forme organiche* dei metalli formate da uno ione metallico e da una o più molecole organiche chelanti, costituiscono la proposta di punta dell'integrazione minerale sia dell'uomo e sia degli animali. Si ritiene che i metalli chelati siano più biodisponibili dei corrispondenti ossidi o sali inorganici e il loro uso appare ormai utile, se non necessario in talune circostanze, nonostante il loro costo superiore. I brevetti e gli articoli scientifici sull'argomento sono in continuo aumento. Le ricerche di maggior rilievo degli ultimi anni sono state, e sono tuttora, rivolte alla comprensione dei meccanismi della loro azione fisiologica. Tuttavia, nonostante che in taluni casi sia stata evidenziata la loro efficacia e siano state trovate utili correlazioni

empiriche fra parametri fisiologici e stato di chelazione, ci si trova ancora molto distanti da una comprensione definitiva. Inoltre la natura stessa dei chelati è particolarmente intrigante: si tratta di una famiglia molto vasta di specie, le quali non sono facilmente identificabili, come lo sono invece le altre molecole organiche. Inoltre la loro stabilità in soluzione è fortemente dipendente dalla natura del metallo, dalla natura del chelante organico, dal pH del mezzo e dalla presenza in soluzione d'eventuali chelanti competitori. Per tale motivo, qualsiasi studio in vivo e in vitro, che voglia apportare solidi contributi alla conoscenza del meccanismo d'azione dei chelati, dovrà essere corredato della descrizione dettagliata del tipo di chelato utilizzato e delle condizioni d'utilizzo.

Scopo di quest'articolo è fornire strumenti utili di conoscenza per un

approccio consapevole ai chelati attraverso due percorsi: (i) illustrazione della struttura delle principali categorie di chelati presenti sul mercato; (ii) indicazione dei metodi che attualmente possono essere utilizzati per il loro riconoscimento e la determinazione quantitativa. Alcuni di tali metodi sono in corso d'avanzata sperimentazione presso il Dipartimento di Chimica G.I.A.F. dell'Università di Parma da parte del "Gruppo di Studio sui Chelati Metallici per la Nutrizione Animale" nel quadro delle attività di tre progetti cofinanziati rispettivamente dal Ministero dell'Università e della Ricerca (PRIN/04), dalla Regione Emilia-Romagna (PRRIIT) e dalla Regione Lombardia (FIT). (http://www.ricercaitaliana.it/prin/dettaglio_prin-2004038835.htm; <http://www.chim.unipr.it/chelati/home.htm>)

Figura 1 - Tavola ridotta del Sistema Periodico degli Elementi: le caselle grigie evidenziano i principali metalli alcalini e alcalino-terrosi, quelle azzurro chiaro i metalli di transizione della prima serie, quelle azzurro scuro gli elementi non-metallici che compongono le principali bio-molecole

H																			He
Li	Be											B	C	N	O	F			Ne
Na	Mg											Al	Si	P	S	Cl			Ar
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br			

Minerali e nutrizione

È noto ormai da tempo che molta della chimica della vita è *inorganica*, perché sia la normale crescita, sia lo sviluppo, sia la salute degli organismi viventi implicano la presenza in concentrazione opportuna d'elementi inorganici (detti nutrienti minerali o semplicemente *minerali*), cioè elementi diversi da carbonio, idrogeno, azoto, ossigeno, zolfo e fosforo (caselle azzurro scuro in figura 1) che sono i costituenti principali delle biomolecole fondamentali (protidi, lipidi, glucidi e nucleotidi) (1).

La maggior parte degli elementi *minerali* è costituita da metalli i quali svolgono diverse funzioni. Gli ioni dei metalli dei Gruppi 1 e 2 del sistema periodico (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , caselle grigie in figura 1) agiscono come elementi strutturali e nel mantenimento delle cariche e del bilancio osmotico. Gli ioni dei metalli di transizione (caselle azzurro chiaro in figura 1) presenti con un unico stato di carica elettrica (stato d'ossidazione), come lo zinco (2+), funzionano come elementi strutturali nelle proteine enzimatiche o come attivatori per l'attività proteica. I metalli di transizione che presentano diversi stati d'ossidazione si comportano come trasportatori d'elettroni (ioni di ferro e rame rispettivamente nel citocromo e nella plastocianina).

Nel campo della nutrizione, molto

di più in quella animale, ma anche in quella umana, gli elementi metallici in tracce (*micronutrienti minerali*) sono stati somministrati in passato unicamente come integratori e sotto forma d'ossidi o sali inorganici, in quanto di minor prezzo, ma soprattutto stabili e facilmente miscelabili negli alimenti. Tuttavia negli ultimi anni è cresciuto notevolmente l'interesse per le forme cosiddette *organiche* o *chelate* dei minerali da utilizzare nelle diete, in particolare quelle in associazione con amminoacidi, peptidi o altre molecole organiche (2-5). L'interesse è stato suscitato da risultati incoraggianti ottenuti in diversi test *in vivo* sugli animali d'in-

teresse economico ed alimentati con mangimi contenenti minerali sotto forma di chelati (6-8). Tali risultati, attribuiti al miglioramento della biodisponibilità dei metalli, comprendono: (i) incrementi di crescita, (ii) aumenti della capacità riproduttiva (iii) generale miglioramento dello stato di salute degli animali (maggiore resistenza a varie patologie). Inoltre, l'impiego di chelati metallici in nutrizione animale, in sostituzione agli integratori minerali convenzionali è stato stimolato da una serie di motivazioni (Tab. 1), che ne hanno diffuso l'uso, anche al di fuori di un necessario approfondimento di molti aspetti scientifici. Parallelamente,

Tabella 1 - Chelati metallici in nutrizione animale e relativi miglioramenti

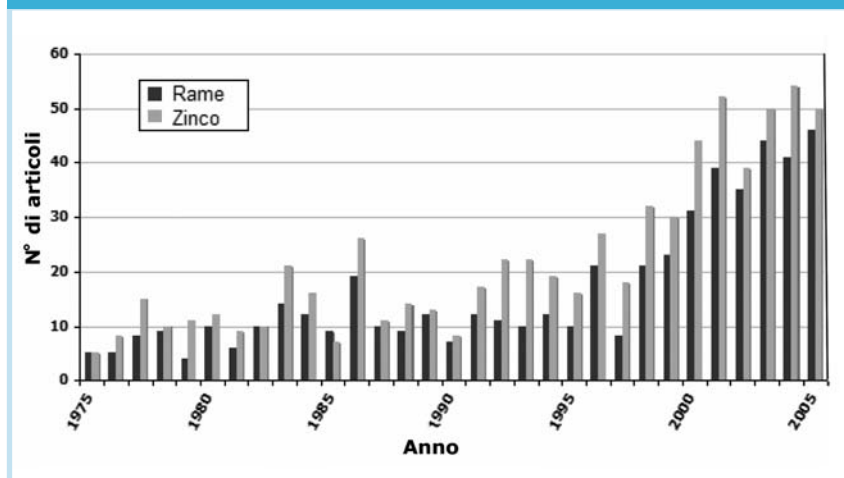
Miglioramento della qualità degli alimenti.

- L'assenza nelle premiscelate di ioni metallici liberi (Fe^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+}), previene l'ossidazione delle vitamine e degli additivi, e i fenomeni d'irrancidimento dei grassi.
- La "protezione" per chelazione riduce negli alimenti le interazioni del catione metallico con fitati e ossalati che ne diminuirebbero la biodisponibilità.

Miglioramento delle proprietà nutrizionali della dieta:

- La chelazione riduce le interazioni con altri componenti della dieta durante il processo digestivo;
- La chelazione può indurre un cambiamento del sito d'assorbimento del catione metallico, evitando fenomeni di competizione fra i diversi cationi (i chelati potrebbero, infatti, seguire le stesse vie d'assorbimento delle molecole leganti), e da qui risulterebbe un maggiore assorbimento e un abbassamento della concentrazione del metallo nelle deiezioni (vantaggi ambientali);
- La chelazione può aumentare l'attività metabolica del metallo dopo il suo assorbimento (effetto nutraceutico).

Figura 2 - Numero di articoli scientifici riguardanti i chelati di zinco e rame apparsi anno per anno dal 1975 al 2006



dopo un periodo d'iniziale scetticismo, e sulla base di molti risultati paratici, è cresciuto pure l'interesse della comunità scientifica sull'uso dei chelati metallici in nutrizione, come è testimoniato dal notevole aumento degli articoli scientifici prodotti negli ultimi dieci anni. Al riguardo, la figura 2 mostra la distribuzione degli articoli apparsi su riviste scientifiche a diffusione internazionale negli ultimi 30 anni nel caso del rame e dello zinco.

Natura dei chelati e loro caratteristiche

I metalli nei sistemi biologici, sia quelli dei gruppi 1 e 2 (caselle grigie in figura 1), sia quelli di transizione (caselle azzurro chiaro figura 1), sono presenti sotto forma di ioni posi-

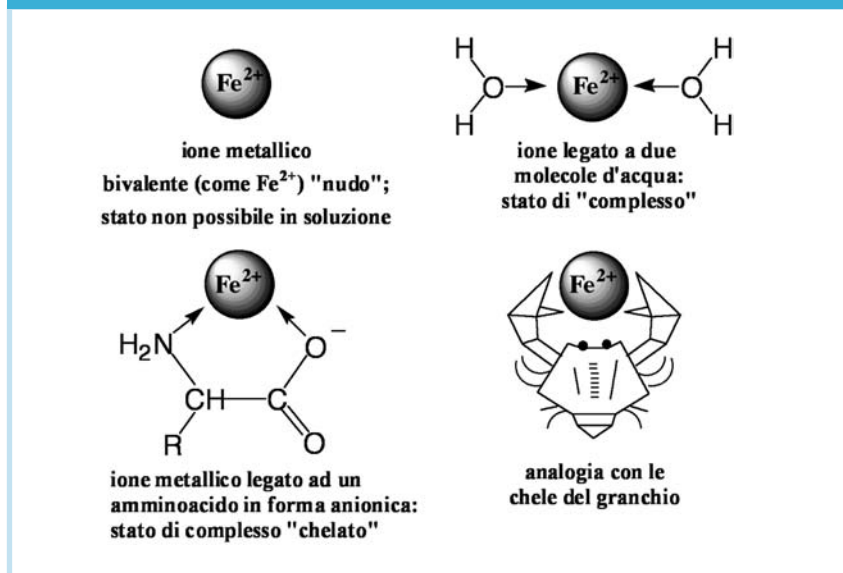
tivi (cationi). Questi in soluzione non sono ioni *nudi*, ma si circondano di (co-ordinano) un certo numero di molecole ricche d'elettroni, sia neutre, sia cariche negativamente (anioni), chiamate *leganti*, al fine di minimizzare l'eccesso di cariche positive. Le molecole leganti per essere tali devono contenere necessariamente atomi in grado di donare una coppia d'elettroni quali N, O, S. In soluzione acquosa, in assenza d'altre molecole donatrici d'elettroni, i cationi metallici sono strettamente circondati da un certo numero di molecole d'acqua (spesso sei, in figura 3 ne sono mostrate due) che donano una coppia d'elettroni al catione metallico. Nel caso dei metalli dei gruppi 1 e 2, come Na e Mg, il legame *ione-molecola d'acqua* è principalmente di natura elettrostatica

(ione-dipolo). Nel caso invece dei metalli di transizione il legame che s'instaura, detto *dativo*, è di natura diversa e consiste nella donazione di una coppia d'elettroni da parte dell'acqua verso lo ione. Le specie risultanti da questa unione sono chiamate *complessi o composti di coordinazione*. Una classe importante di molecole leganti contenenti l'azoto (N) come atomo donatore è quella delle ammine.

I *chelati metallici* sono poi particolari complessi in cui almeno un legante, che può essere di natura organica come un amminoacido, si coordina sul catione metallico centrale attraverso due o più legami dativi. Questo si realizza grazie alla presenza di almeno due centri donatori ricchi d'elettroni come atomi d'ossigeno e/o d'azoto presenti nella stessa molecola. La figura 3 mostra il confronto fra stato di ione *nudo*, non mai presente in soluzione, lo stato di complesso circondato da molecole d'acqua, tipicamente presente in soluzione acquosa e lo stato di chelato per azione di un anione amminoacidico, il quale avendo due centri di donazione viene detto *chelante bidentato*.

Nel caso invece di microelementi non-metallici come selenio e iodio, questi non essendo metalli non formano ioni positivi in soluzione e quindi non possono formare chelati; infatti, la forma organica più importante del selenio è la selenometionina, in contrapposizione con il

Figura 3 - Stati possibili per uno ione metallico: (i) *nudo*, raramente e solo in fase gassosa; (ii) *complesso*, nel caso di soluzione acquosa circondato da molecole d'acqua (le frecce indicano il legame dativo cioè la donazione di una coppia di elettroni, possibile nel caso dei metalli di transizione); (iii) *complesso chelato*, nell'esempio specifico con uno ione aminoacidico che si comporta da chelante bidentato; (iv) analogia con la presa chelante del granchio. I *chelati*, che risultano più stabili in soluzione dei normali complessi con gli stessi atomi donatori, rappresentano una speciale categoria nella famiglia dei *complessi o composti di coordinazione*.



selenito di sodio, la forma inorganica più utilizzata.

Molecole chelanti

Oltre agli aminoacidi, fra i tipici chelanti bidentati mostrati in figura 4, abbiamo i chetoacidi (come l'acido piruvico) e gli idrossiacidi (come la metionina idrossi-analoga) rispettivamente nelle loro forme anioniche, mentre l'anello porfirinico, presente nell'eme e mostrato in figura 5, è invece un tipico esem-

pio di sistema chelante tetradentato.

La maggiore stabilità in soluzione dei chelati metallici, rispetto ai complessi non chelati, è prevista dalla trattazione teorica del fenomeno ed è stata confermata dai dati sperimentali.

Stabilità dei chelati: natura del chelante e del metallo

La capacità chelante degli aminoacidi e di molecole simili può es-

sere correlata con un importante parametro chimico-fisico chiamato *costante di formazione K_f* la quale esprime la stabilità del chelato in soluzione: più alto è tale valore più stabile risulta il chelato (9). Il chelante che mostra valori di K_f fra i più elevati è il noto EDTA, chelante esadentato, capace di sequestrare tutti i cationi dei metalli e utilizzato fra l'altro nell'addolcimento delle acque. La stabilità del chelato dipende dalla natura degli atomi donatori d'elettroni (N, O, S) presenti nella molecola, dalla natura del metallo chelato, dalla carica elettrica del legante e del metallo e infine dalla struttura della molecola legante.

Riguardo quest'ultimo aspetto è da rimarcare che quando gli aminoacidi sono legati fra loro con il legame peptidico a formare oligopeptidi e proteine, la loro capacità chelante è fortemente ridotta in quanto i due centri di chelazione sono impegnati nel legame peptidico; l'oligopeptide mantiene solo un ridotto potere legante con gli aminoacidi terminali e con eventuali altri centri leganti presenti nella catena peptidica. In figura 6 è mostrato schematicamente un piccolo peptide a quattro aminoacidi e l'analogia con una *catena* di quattro granchi.

Dipendenza dal pH

La capacità chelante degli aminoacidi dipende fortemente dal pH della soluzione acquosa: infatti, con

Figura 4 - Esempi di leganti chelanti bidentati in forma anionica

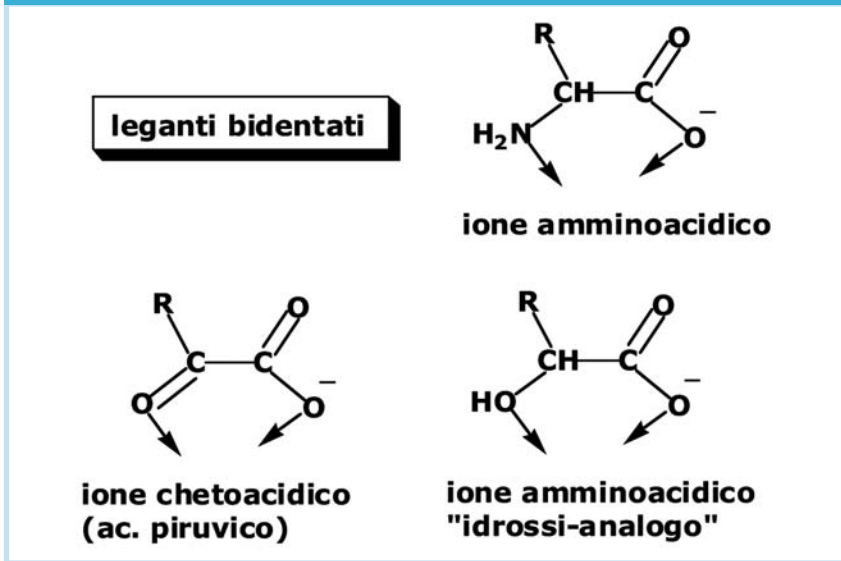
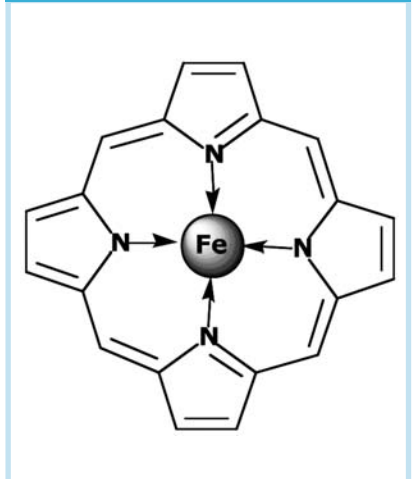


Figura 5 - Modello schematico della struttura dell'eme che contiene il ferro chelato dall'anello tetradentato della porfirina



l'aumentare dell'acidità tale potere decresce fortemente divenendo molto scarso sotto a pH 5. Questo fenomeno, illustrato in figura 7, è comune a tutte le molecole leganti, ma alcune di esse risultano meno sensibili. Infatti, la metionina idrossi-analoga ha ancora capacità chelante a pH 3 (10).

Dissociazione dei chelati in soluzione

Tutti i chelati metallici tendono a dissociarsi in una certa misura, quando sono sciolti in acqua. Anche i bis-chelati degli aminoacidi (Fig. 8) mostrano questa tendenza in modo tale che sciogliendoli in acqua si assiste alla formazione anche della specie mono-chelata per distacco di un aminoacido; tale

Figura 6 - Come i granchi impegnati a formare una catena non possono chelare in maniera efficace, così non lo possono fare gli aminoacidi implicati in una catena peptidica

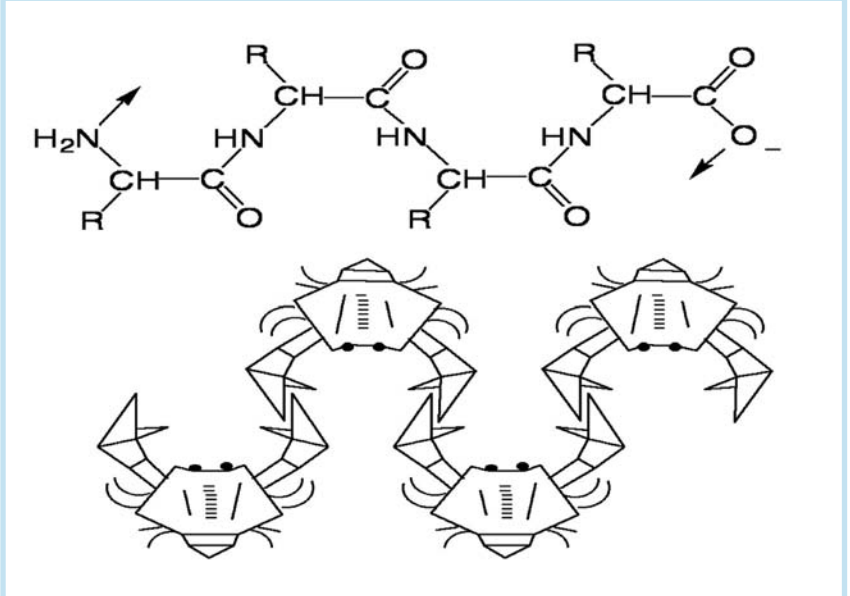


Figura 7 - Progressiva trasformazione di un aminoacido da chelante anionico a molecola protonata cationica, debolmente legante a causa dell'aumento della concentrazione degli ioni H^+ (diminuzione del pH)

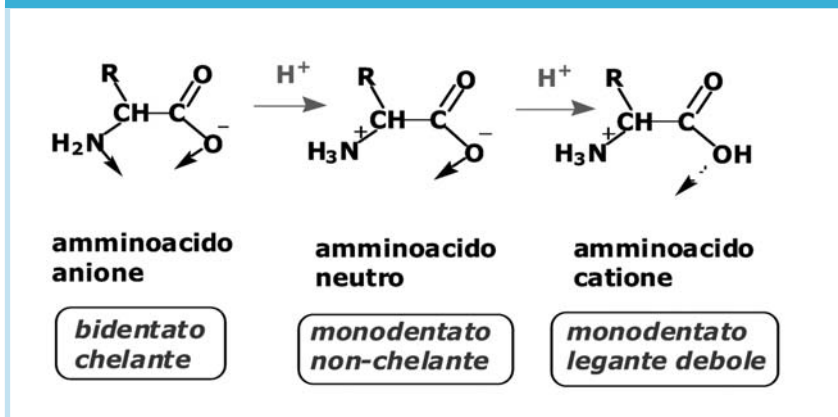
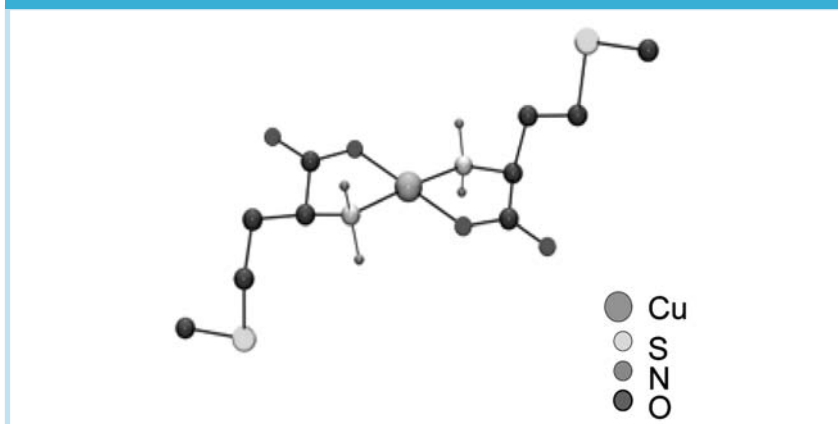


Figura 8 - Schema della struttura del bis-chelato di rame con la metionina determinata allo stato solido mediante diffrazione dei raggi X (C. C. Ou, D. A. Powers, J. A. Thich, T. R. Felthouse, D. N. Hendrickson, J. A. Potenza, H. J. Schugar, Inorg. Chem., 1978, 17, 34-38). E' ben evidente il modo di chelazione dell'amminoacido tramite gli atomi di azoto e ossigeno. Tale chelato posto in soluzione è soggetto, come tutti i chelati a processi dissociativi che portano anche alla formazione del monochelato; al posto dell'amminoacido uscente si possono collocare molecole d'acqua o leganti competitori in modo comunque reversibile.



processo è comunque reversibile. Questa tendenza è connessa con la stabilità del chelato e quindi con la costante di formazione K_f .

La dissociazione dei chelati in acqua, grande o piccola che sia, è comunque un fatto ineluttabile, che determina poi le difficoltà che s'incontrano nelle analisi dei chelati in soluzione.

Inoltre la tendenza alla dissociazione espone il chelato all'attacco d'altre molecole leganti che possono essere presenti negli alimenti o nei fluidi gastrici e intestinali, quali gli ioni cloruro, gli ioni solfato e i fitati. Questi arrivano a competere con il chelante originario nel legarsi al centro metallico in misura vieppiù crescente all'aumentare della loro concentrazione.

Categorie di chelati e metodi d'analisi

Un importante obiettivo della ricerca sui chelati consiste nel mettere a punto metodi analitici rapidi ed efficaci per la *riconoscimento* e la *determinazione* delle forme chelate presenti nelle preparazioni destinate all'alimentazione (umana e prodotti ad uso zootecnico), oppure per la *valutazione del grado di chelazione del metallo* (rapporto fra metallo libero e metallo chelato) laddove la complessità della miscela non consenta il riconoscimento univoco di singole specie (11).

Aldilà della ben nota classificazione dell' "Association of American Feed Control Officials" (AAFCO, 2001) (12) (Tab. 2), dal punto di vista

Tabella 2 - Classificazione ufficiale di complessi e chelati

La grande varietà di complessi metallici e chelati per la nutrizione animale presenti sul mercato (soprattutto nordamericano) ha indotto la "Association of American Feed Control Officials" (AAFCO, 2001) a introdurre una classificazione *merceologica* dei differenti prodotti:

- *Metal/aminoacid complex*: prodotto risultante dalla complessazione di un sale metallico solubile con amminoacidi.
- *Metal/specific-aminoacid complex*: prodotto risultante dalla complessazione di un sale metallico solubile con uno specifico amminoacido.
- *Metal/aminoacid chelate*: prodotto che risulta dalla reazione tra uno ione metallico da un sale solubile ed amminoacidi con un rapporto molare da 1:1 a 1:3 (preferibilmente 1:2) a formare legami covalenti coordinativi. Il peso medio degli amminoacidi idrolizzati deve essere approssimativamente 150 e il peso molecolare risultante del chelato non deve eccedere 800.
- *Metal/proteinate*: prodotto che risulta dalla complessazione di un sale solubile con amminoacidi e/o proteine parzialmente idrolizzate.
- *Metal/polysaccharide complex*: prodotto che risulta dalla complessazione di un sale solubile con una soluzione polisaccaridica.

L'Unione Europea, attraverso la sua Commissione (OJEC, 1998), ha fornito una definizione solo per i *Metal chelate of amino acid hydrate*, aventi formula $M(X)_{1-3} \cdot n H_2O$.

Solo recentemente i *glicinati di ferro, rame, manganese e zinco* sono stati approvati dalla Commissione Europea (EC), tramite l'EFSA, come forme chelate (Official Journal of the European Union, OJEU, 24/3/2006, L 86/4-7)

strettamente chimico-analitico le specie chelate presenti in commercio (approvate o in fase d'approvazione) si possono ricondurre alle seguenti categorie.

- (i) Chelati di un singolo amminoacido di formula ben definita.
- (ii) Chelati di un singolo alfa-idrossiacido (metionina idrossi-analoga) di formula ben definita.
- (iii) Chelati di un *pool* d'amminoacidi in percentuale nota.

(iv) Chelati di lisati proteici (per esempio farina d'estrazione di soia).

(v) Più raramente, chelati d'altre molecole organiche (saccaridi o altro).

Chelati puri

I primi due casi (i, ii) comprendono i chelati puri costituiti da uno ione metallico circondato da un numero ben definito di molecole chelanti note; sono sostanze pure, e come ta-

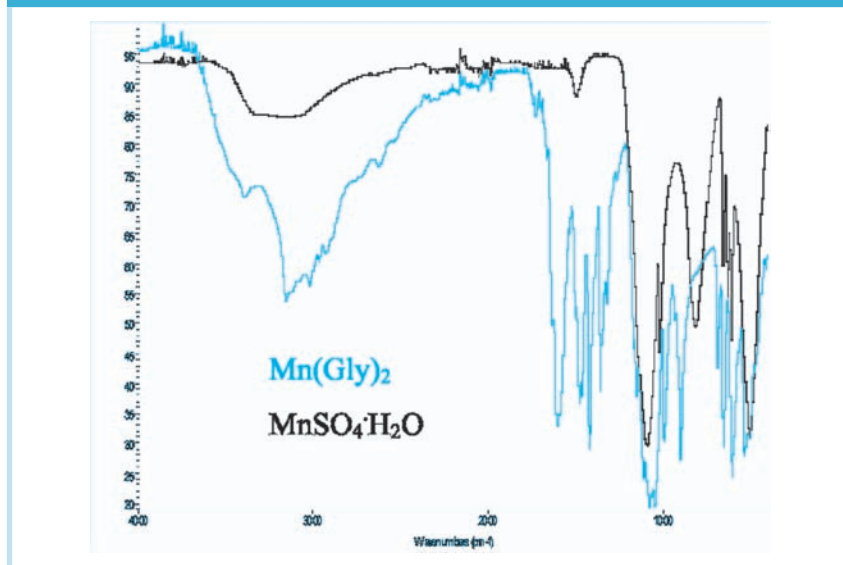
li per loro esiste un preciso codice d'identificazione (*Registry Number*) del *Chemical Abstract Service*, l'agenzia statunitense che provvede alla catalogazione di tutta la letteratura chimica mondiale e di tutte le sostanze nuove che sono pubblicate.

Per questi chelati è spesso possibile il loro riconoscimento direttamente nel prodotto tal quale allo stato solido mediante spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FTIR). Eventualmente l'abbinamento al microscopio ottico (micro-FTIR) permette di identificare anche grani di dimensioni inferiori al millimetro in miscele complesse. Infatti, ciascuna sostanza di formula definita (e quindi anche i chelati puri) presenta uno specifico spettro infrarosso che rappresenta una sorta d'impronta digitale della sostanza stessa consentendo la sua identificazione univoca.

La figura 9 mostra la diversità fra lo spettro riguardante il bis-chelato di manganese con la glicina e quello concernente il sale inorganico solfato di manganese. Inoltre con questa tecnica è possibile effettuare determinazioni quantitative dei chelati sempre sul solido tal quale sfruttando la dipendenza proporzionale fra l'altezza (o l'area) dei picchi principali dello spettro FTIR e la concentrazione del chelato.

La figura 10 mostra la retta di calibrazione usata per determinare la percentuale del bis-chelato di zinco con la metionina-idrossianaloga

Figura 9 - Confronto fra gli spettri infrarossi (FTIR) del solfato di manganese e del bis-glicinato di manganese



(MHA) in una premiscela. Nel caso di concentrazioni inferiori si può comunque effettuare la determinazione quantitativa ricorrendo all'analisi multivariata.

Miscela di chelati

Nei casi (iii - v), quando cioè siano presenti più specie chelate in miscela, il riconoscimento univoco delle

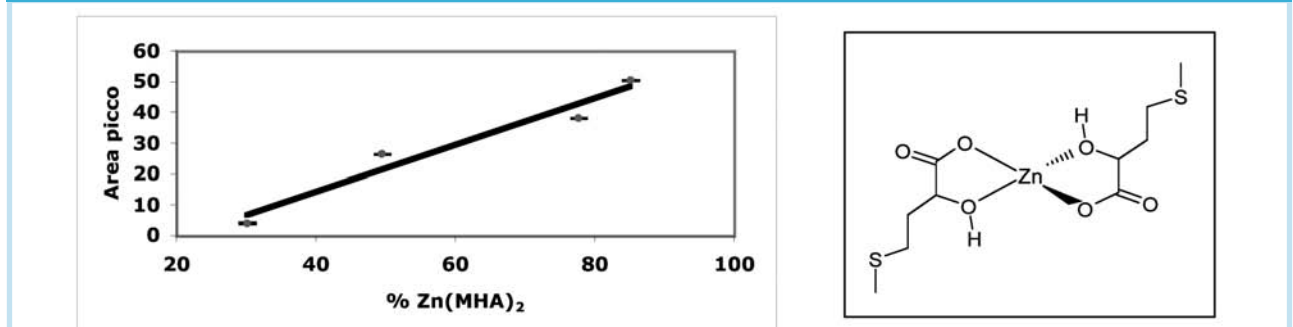
single specie è praticamente impossibile. Infatti, non è possibile effettuare separazioni in cromatografia liquida (HPLC) a causa dell'instabilità dei chelati durante l'eluizione nelle colonne cromatografiche.

Si deve ricorrere quindi ad una serie di procedure tese a valutare l'effettiva presenza di chelati e il grado di chelazione del metallo. Tali procedure potrebbero variare nei dettagli da caso a caso, ma dovrebbero seguire il seguente percorso principale a tre stadi.

(1) *Indagine morfologica e spettroscopica FTIR* (macro e micro) sul tal quale: permette una valutazione preliminare dello stato della miscela potendo discriminare fra semplici miscele meccaniche di peptidi (macro- e/o micro-eterogenee) con sali metallici e veri sistemi chelati, per loro natura omogenei.

(2) *Estrazione acquosa* (eventualmente a diversi pH) sul prodotto macinato e *determinazione del conte-*

Figura 10 - Retta di calibrazione che correla l'area del principale picco IR con la % di bis-chelato di zinco con la metionina-idrossianaloga (MHA) in una premiscela, tale retta può essere utilizzata per la rapida determinazione quantitativa del chelato nella premiscela tal-quale. Il riquadro mostra la struttura del chelato allo stato solido



nuto di metallo, di chelanti (spesso amminoacidi) e d'eventuali molecole complessanti competitive, dopo adeguate procedure di filtrazione con membrane a porosità controllata per discriminare le specie a diverso peso molecolare.

(3) *Valutazione del grado di chelazione* sul metallo in soluzione con opportune tecniche analitiche. Questa fase è la più delicata e controversa; recentemente si sta consolidando la convinzione fra i ricercatori del settore che la polarografia (tecnica elettrochimica che utilizza l'elettrodo a goccia di mercurio per la riduzione del catione metallico in soluzione) possa permettere una rapida determinazione del grado di chelazione (13). Infatti, i dati polarografici sono direttamente correlabili con la costante di formazione dei chelati K_f . Nei casi dubbi o per validazioni si potrà poi ricorrere anche a tecniche spettroscopiche sofisticate come la risonanza di spin elettronico (ESR, preziosa nel caso del rame) e la risonanza magnetica nucleare (NMR).

Considerazioni finali

Nonostante che un metodo standard accettato non sia ancora dis-

ponibile, è comunque prevedibile che lo sforzo congiunto di vari laboratori di ricerca impegnati nel settore metterà presto a disposizione dei produttori e dei consumatori una serie di metodi adeguati per il controllo dei chelati.

Ulteriori studi in ambito zootecnico e veterinario dovrebbero essere focalizzati nella ricerca di correlazione fra parametri legati alla produzione, alle *performance* qualitative di prodotto d'origine animale (latte, carne, uova) ed allo stato di salute degli animali, con le caratteristiche chimico-fisiche dei chelati utilizzati, caratteristiche che oggi possono essere valutate con soddisfacente affidabilità (14, 15). Migliori risultati in quest'area possono costituire una buona base sulla quale poi sviluppare indagini sulla specie umana.

Tali studi, che dovrebbero implicare una diretta collaborazione fra unità di ricerca in ambito chimico, zootecnico e veterinario ed unità produttive, al fine di costituire un punto di partenza per un utilizzo più razionale delle diverse specie chelate da impiegare nella nutrizione animale. Infatti, ciascun chelato potrebbe avere una sua specifica funzione e un suo ottimale utilizzo in diverse circostanze d'allevamento e produzione.

Bibliografia

1. Hughes MN. The Inorganic Chemistry of Biological Processes, J. Wiley & Sons, New York, 1981.
2. Kratzer FH, Vohra P. Chelates in Nutrition, CRC Press Inc., Boca Raton, FL, 1986.
3. Patton RS. Feedstuffs. 1990; 62 (9): 14.
4. Ballarini G, Predieri G. Kraftfutter 2002; 10: 375-85.
5. McDowell LR. Minerals in Animal and Human Nutrition, Elsevier, Amsterdam (NL), 2003.
6. Wadekind KJ, Hortin AE, Baker DH. J Anim Sci 1992; 70: 178-87.
7. Ashmead HD, Zuninho H. In Ashmead HD, DeWaine H (eds), The Roles of Aminoacid Chelates in Animal Nutrition, Moyes Publ., Park Ridge, NJ, 1993: 21-40.
8. Spears JW. Anim Feed Sci Technol 1996; 58: 151-63.
9. Basolo F, Johnson R. Chimica dei composti di coordinazione, Zanichelli Bologna, 1967.
10. Predieri G, Tegoni M, Cinti E, Leonardini G, Ferruzza S. J Inorg Biochem 2003; 95: 221-4.
11. Leach GA, Patton R S. Feedstuffs 1997; 69 (13): 1-4.
12. AAFCO, Official Publication. Am Ass Feed Controls Officials 2001: 282-3.
13. Mellor S. Feed Mix 2003; 11 (6): 1-4.
14. Cao J, Henry PR, Guo R, et al. J Anim Sci 2000; 78: 2039-54.
15. Ji F, Luo XG, Lu L, Liu B, Yu SX. Poultry Science 2006; 85: 1217-25.