

50376
1991
316

67560

50376
1991
316

N° d'ordre : 829

**UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE LILLE FLANDRES ARTOIS**

U.F.R. DE CHIMIE

Thèse

présentée pour l'obtention du grade de Docteur en Spectrochimie

**POUVOIR COMPLEXANT DES SUCRES
ACIDES AVEC LES IONS METALLIQUES.
COMPLEXATION DE L'ACIDE
LACTOBIONIQUE AVEC LES IONS
CUIVRE(II) ET OXOVANADIUM(IV).**

Saâd BOUHSINA



Villeneuve d'Ascq, le 7 décembre 1991

Composition du jury :

- Président : Daniel COUTURIER, Professeur, Université de Lille I.
Rapporteurs : Henryk KOZLOWSKI, Professeur, Université de Wroclaw, Pologne.
Giovanni MICERA, Professeur, Université de Sassari, Italie.
Jolanta SWIATEK, Docteur de l'Académie de Médecine de Wroclaw, Pologne.
Examineur : Patrick DECOCK, Professeur, Université de Lille I. Directeur de Thèse.

Cette recherche a été réalisée dans le cadre d'une collaboration avec le Centre de Recherche sur l'Environnement Industriel, de Dunkerque.

« Le plus grand dérèglement de l'esprit
est de croire les choses
parce qu'on veut qu'elles soient. »

à mes parents qui m'ont permis d'être ce que je suis,
avec mon affection et ma reconnaissance éternelle.

à *ELIE* avec toute ma tendresse,
pour son dévouement et sa patience.

à *Laïla*,

à *Bouchra*,

à *Sakina*,

à tous ceux qui me sont chers.

Ce travail a débuté dans le Laboratoire de Chimie Minérale et Méthodologie Analytique et s'est poursuivi dans celui de Chimie Organique et Environnement, sous la direction de Monsieur P. DECOCK Professeur à l'Université de LILLE I. Pour les longs et nombreux débats que nous avons eus, toujours sans concession de sa part, parfois passionnés et qui ont souvent suscité des interrogations nouvelles et influé sur l'orientation de mes recherches, qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

Je prie Monsieur D. COUTURIER, Professeur à l'Université de LILLE I d'accepter mes plus vifs remerciements pour m'avoir fait l'honneur d'examiner ce travail et de présider ce jury.

Monsieur H. KOZLOWSKI, Professeur à l'Université de WROCLAW a su me donner le goût de la recherche scientifique et m'encourager dans les moments difficiles. J'ai pu apprécier, au-delà de ses compétences pédagogiques, ses grandes qualités humaines. Je tiens à le remercier profondément pour la confiance qu'il m'a accordée et pour tout l'intérêt qu'il a porté à mon travail.

Madame J. SWIATEK, Docteur de l'Académie de Médecine de WROCLAW, a accepté de juger ce travail. Qu'elle trouve ici l'expression de mes sincères remerciements.

Ma gratitude va également à Monsieur G. MICERA, Professeur à l'Université de SASSARI, qui m'a fait l'honneur de juger cette thèse.

Je ne saurais oublier Monsieur B. DUBOIS, Maître de Conférences à l'université de LILLE I, dont la disponibilité, la patience et les conseils judicieux ont accompagné de manière constante la réalisation de cette thèse. Qu'il en soit ici remercié.

Je remercie également A. ANOUAR mon camarade de laboratoire, pour sa sympathie et son soutien.

Enfin, je remercie Madame MOREAU pour la réalisation particulièrement soignée des schémas, ainsi que Madame SAINLEGER pour l'impression de ce travail.

SOMMAIRE

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I : BASES THEORIQUES ET METHODOLOGIE DES TECHNIQUES UTILISEES.....	7
A - RAPPELS THEORIQUES.....	8
I - Techniques spectroscopiques.....	8
1 - Transitions électroniques dans les complexes métalliques.....	8
a - Transitions du métal.....	8
b - Transitions électroniques par transfert de charge.....	12
2 - Dichroïsme circulaire.....	13
3 - Résonance paramagnétique électronique.....	15
II - Potentiométrie.....	19
1 - Rappels.....	19
2 - Concentration et activité.....	23
3 - Principe de calcul des constantes de stabilité..	24
B - METHODOLOGIE POTENTIOMETRIQUE ET SPECTROSCOPIQUE.....	26
I- Etudes spectroscopiques.....	26
1 - Appareillage.....	26
2 - Mode opératoire.....	27
II - Technique potentiométrique.....	28
1 - Appareillage.....	28
2 - Solutions.....	30
3 - Conduite d'une mesure.....	31
a - Etalonnage des électrodes.....	32

b - Programme de dérivation et pH Visue.....	32
c - Contrôle des concentrations de ligand.....	33
d - Calcul des constantes.....	34
4 - Système Nickel (II)-glycine.....	35
5 - Méthodologie de l'étude cinétique.....	35
III - Dosage des métaux par spectrophotométrie.....	36
CHAPITRE II : ETUDE DE LA CINETIQUE D'EQUILIBRE DE L'ACIDE LACTOBIONIQUE AVEC LA δ-LACTONE	41
I - Etude théorique.....	43
1 - Calcul des constantes d'équilibre.....	43
a - Calcul théorique.....	43
b - Programme K_a K_c simplex.....	46
2 - Calcul des constantes vitesse.....	47
II - Résultats.....	51
CHAPITRE III : ETUDE DE LA COMPLEXATION DE L'ACIDE LACTOBIONIQUE AVEC LE CUIVRE(II) ET L'OXOVANADIUM(IV).....	56
A - SYSTEME CUIVRE(II) - ACIDE LACTOBIONIQUE.....	58
I - Intervention de la cinétique d'équilibre.....	58
II - Résultats spectroscopiques.....	61
1 - Spectroscopie U.V. visible.....	61
2 - Dichroïsme circulaire.....	63
3 - Spectroscopie R.P.E.....	65
III - Etude potentiométrique.....	67
1 - Modèles de coordination possibles.....	67
2 - Protocole expérimental.....	68
a - Méthode séquentielle.....	69
b - Méthode directe.....	70
3 - Résultats.....	71

4 - Choix de modèle de coordination.....	73
IV - Discussion.....	77
B - ETUDE DE LA COORDINATION DE L'OXOVANADIUM(IV) AVEC L'ACIDE LACTOBIONIQUE.....	82
I - Résultats spectroscopiques.....	82
1 - Spectroscopie U.V. Visible.....	82
2 - Dichroïsme circulaire.....	83
3 - Spectroscopie R.P.E.....	85
a - Calculs théoriques des paramètres spectroscopiques du R.P.E.....	85
b - Résultats expérimentaux.....	87
II - Résultats potentiométriques.....	88
C - CONCLUSION.....	93
 CHAPITRE IV : ETUDE DU SYSTEME TERNAIRE CU(II) - ACIDE LACTOBIONIQUE - D-GLUCOSAMINE.....	 95
A - SYSTEME CU(II)-D-GLUCOSAMINE.....	96
I - Résultats expérimentaux.....	97
1 - Résultats spectroscopiques.....	97
a - Spectroscopie U.V.....	97
b - Dichroïsme circulaire.....	97
c - Résultats R.P.E.....	99
II - Résultats potentiométriques.....	100
III - Discussion.....	102
B - ETUDE DU SYSTEME TERNAIRE - ACIDE LACTOBIONIQUE - CUIVRE(II) - D-GLUCOSAMINE.....	105
I - Prévision d'existence de complexes ternaires.....	105
II - Résultats expérimentaux.....	107

1 - Résultats spectroscopiques.....	107
a - Spectroscopie R.P.E.....	107
b - Dichroïsme circulaire.....	109
2 - Prévision d'existence de complexes ternaires sur la base des résultats spectroscopiques.....	111
 III - Résultats potentiométriques.....	 116
 IV - Discussion.....	 117
 CONCLUSION.....	 121
 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	 124
 ANNEXES.....	 130

INTRODUCTION

Les molécules organiques actives du point de vue biologique, (protéines, polypeptides, carbohydrates, etc...) et leurs dérivés, contiennent des atomes donneurs de doublets électroniques. Ce sont des ligands potentiels qui peuvent former des liaisons avec les ions métalliques et participer aux processus de protonation-déprotonation. La protonation et la coordination avec l'ion métallique font baisser la densité électronique des groupements donneurs participant à ce processus. Ce changement s'étend généralement à d'autres parties de la molécule, entraînant des changements significatifs de sa structure électronique et, par conséquent, une modification de son comportement chimique.

D'où l'intérêt qu'il y a d'établir précisément les interactions chimiques de coordination, si l'on veut expliquer parfaitement les effets biologiques de ces composés bioactifs et, donc, leurs intérêts pharmacologiques ou thérapeutiques.

Un certain nombre de travaux de recherche ont pu mettre en évidence l'importance des complexes métalliques dans les interactions chimiques de coordination et, par là, de leurs effets sur les processus biologiques. On peut en citer de nombreux exemples.

Ainsi, une corrélation a été prouvée entre la concentration des ions métalliques et les facteurs de risque intervenant dans certaines maladies cardio-vasculaires (1). De même, le traitement de la maladie de Wilson avec la D-pénicillamine (2) est basé sur l'élimination du cuivre sous la forme de son complexe pénicilline-amine. Les effets de la formation des complexes métalliques sont aussi utilisés en pharmacologie, ces complexes métalliques pouvant, par exemple,

retarder la décomposition enzymatique des peptides. L'action retardée de certains polypeptides contenus dans les médicaments (insuline, corticotropine) peut être assurée par l'administration de leurs complexes de zinc du fait de l'effet stabilisant de la coordination métallique sur la protéine. En influant sur la toxicité des molécules, et notamment en la faisant baisser, la coordination métallique des composés bioactifs agit sur l'activité de nombreux composés organiques utilisés comme médicaments. Les complexes cuivriques des dérivés de l'acide salicylique ont des effets antipyrétiques plus importants que ceux des composés en présence de cuivre non complexé (3).

Les carbohydrates et leurs dérivés forment des complexes avec les ions métalliques. Cependant, la chimie des complexes carbohydratés reste largement inexplorée. Ce n'est que ces vingt dernières années qu'un intérêt considérable s'est manifesté pour ce type d'étude, et ceci essentiellement du fait de l'importance possible de certaines interactions dans les processus biologiques (liaisons entre les ions métalliques et les parois cellulaires).

Les sucres acides sont en général des complexes efficaces des ions métalliques. Les complexes du fer sont des préparations potentielles pour la thérapie de déficience en ions ferriques. Leur stabilité est suffisamment élevée pour empêcher l'hydrolyse de Fe(III) dans les systèmes biologiques. Les interactions des ions ferreux et ferriques avec ces ligands suscitent donc un grand intérêt. Les interactions de l'acide lactobionique, de l'acide gluconique et du lactose avec les ions Fe(III) ont été étudiées par spectrophotométrie (4), et on a pu montrer que la stabilité des complexes décroît selon l'ordre gluconate > lactobionate > lactose. Les constantes de formation des complexes ferriques de différents acides organiques (galacturonique et gluconique notamment) ont été déterminées et les répartitions de ces complexes ont été calculées (5). Les résultats ont montré que l'acide galacturonique est un ligand prometteur dans la thérapie de déficience en fer. La composition et les constantes de

stabilité des complexes de l'acide D-saccharique avec les ions Mn(II), Fe(III), Co(II), Ni(II), Cu(II) et Cd(II) ont été déterminées (6-8). Les résultats indiquent que dans chaque complexe (Fe 1/3) et (Cu 1/2), deux groupes carboxyliques sont impliqués. Les résultats des études polarographiques ont révélé qu'un ion hydroxyde participe aussi à la formation des complexes Cu(II)-acide saccharique (9). L'étude de la coordination des acides uroniques par les ions Cu(II) et VO(IV) a montré l'existence de complexes faisant intervenir le groupement carboxylique en même temps qu'un groupement hydroxyle. (10, 11).

La présence de groupes carboxyliques et/ou aminés dans une molécule de sucre, renforce sa capacité à former des complexes métalliques, même en solution acide ou neutre (12-17).

L'acide gluconique a fait l'objet de nombreux travaux. Les premiers résultats des chélates Cu(II)-gluconate ont été publiés par Peksok en 1955 (18). Celui-ci a mis en évidence l'existence des espèces Cu(II)-gluconate 2:4, 2:2, et 2:1 en milieu fortement alcalin. Des mesures potentiométriques de ce système dans la zone de pH 3.5 --> 6.5 (19) indiquent la formation de complexes mononucléaires CuL^+ , CuL_2 , $CuLH_{-1}$, $CuLH_{-2}^-$ et $CuL_2H_{-1}^-$, avec la participation d'un groupement hydroxyle dès pH 5. Les investigations concernant la complexation de l'acide gluconique avec l'oxovanadium(IV) ont été réalisées entre pH 5 et pH 14 (20). Elles montrent l'existence des espèces 1:1 à pH 6 et 1:2 dans la zone de pH basique, la déprotonation du groupement hydroxyle se produit lorsque le ligand est lié au métal par la fonction carboxylique. On peut relever les études de ce ligand avec W(VI) (21), ainsi qu'avec Cd(II) par potentiométrie (22) et par polarographie (23).

Le champ d'application des interactions entre les sucres acides et les ions métalliques est un domaine en pleine évolution.

Des études récentes ont montré que l'existence de l'anémie chez les enfants et les adolescents, est le résultat

d'une faible assimilation du fer. Si le lait est largement consommé par cette fraction de la population, il est logique de considérer qu'il serait un bon moyen de transport des métaux de transition qu'il faudrait administrer en quantité supplémentaire pendant la période de croissance. Malheureusement, il est prouvé que le lait de vache est peu concentré en fer et en cuivre, les pédiatres recommandent donc souvent de rajouter ces deux éléments essentiels au lait pour atteindre des taux de 6 à 12 Mg de fer par litre et de 0,4 Mg par litre pour le cuivre. Il s'avère, cependant, que la présence d'ions métalliques dans le lait contribue à créer rapidement une odeur et un goût désagréables, probablement dûs à l'oxydation des lipides contenus dans le lait (24-27).

Nous sommes donc face à un paradoxe : les intérêts nutritionnels résultant de l'addition du fer et du cuivre au lait sont incompatibles avec les intérêts de l'industrie laitière moderne, où la stabilité du produit dans le temps constitue une exigence fondamentale.

Pour contourner ces difficultés, de nouveaux agents chélatants sont recherchés qui pourraient, d'une part, inhiber l'oxydation des lipides et donc maintenir plus longtemps la stabilité du lait et, d'autre part, retenir encore mieux les ions métalliques en solution. Les groupes les plus prometteurs de ces produits sont les acides aldoniques, dérivés des sucres et, en particulier, l'acide lactobionique (4-0-D galactopyranosyl-D-gluconic-acid). Ce dernier est connu pour être un bon réducteur vis-à-vis des acides gras insaturés (28-29).

En tant qu'agent de chélation, il forme des complexes moins stables que ceux de l'acide gluconique (4). Des considérations biochimiques laissent penser que les complexes métalliques de l'acide lactobionique de poids moléculaire important, peuvent mieux simuler les processus "In Vivo" que les complexes simples des monosaccharides et de leurs dérivés.

Les sucres acides sont communément utilisés dans des domaines aussi différents que la laiterie, les détergents, la

bière, les industries du cuir et du textile, etc... L'acide lactobionique est utilisé en médecine (30, 31) en liaison avec

Le calcium pour combattre les processus de rejet lors des greffes, en pharmacie (32, 33) sous forme d'erythromicin lactobionate (ERYTROCINE par intraveineuse) et également en agriculture (34). Ses effets thérapeutiques sont mal connus mais on peut supposer que son importante utilisation est due, certainement, à ses propriétés de chélation avec les ions métalliques, qu'il pourrait ainsi véhiculer.

L'objet principal de notre thèse a donc consisté en l'étude du pouvoir complexant du sucre acide lactobionique avec les ions métalliques et, en particulier, de sa complexation avec le cuivre(II) et l'oxovanadium(IV).

L'oxovanadium(IV), peu étudié, provient de la réduction du vanadium(V) contenu dans les organismes vivants, par des réducteurs biologiques tels que les sucres. Le cuivre(II), quant à lui, forme en général des complexes très stables.

Les moyens d'investigation sur lesquels nous nous sommes appuyés pour nos recherches sont de deux types :

- d'une part des méthodes spectroscopiques, notamment la spectroscopie d'absorption U.V. visible, le dichroïsme circulaire et la résonance paramagnétique électronique, que nous avons utilisées d'un point de vue essentiellement qualitatif. Ces méthodes permettent de prévoir le nombre de complexes formés, la nature des liaisons engagées et la géométrie de ces complexes.

- d'autre part des méthodes potentiométriques et polarographiques qui sont d'un apport essentiellement quantitatif, dans la mesure où elles permettent d'évaluer la stabilité des complexes en solution, par le biais de techniques de modélisation.

Le plan de notre thèse se présente de la manière suivante :

Le chapitre premier présente l'essentiel des bases théoriques des techniques potentiométriques et spectroscopiques appliquées à la complexation, ainsi que la méthodologie mise en oeuvre.

Le chapitre second consiste en l'étude cinétique de l'équilibre acide lactobionique-lactone. Cette étude nous permet de déterminer dans quelle proportion la forme ligand (sucre acide) intervient dans la complexation avec l'ion métallique.

Le troisième chapitre est consacré à l'étude de la complexation des systèmes cuivre(II)-acide lactobionique et VO(IV)-acide lactobionique en solution aqueuse. L'exploitation des résultats expérimentaux conduit à proposer la nature, le pourcentage de formation en fonction du pH et la valeur de la constante de stabilité des différents complexes formés.

Le dernier chapitre, enfin, aborde l'étude de la formation de complexes ternaires. Dans le milieu naturel, les ions métalliques et les molécules organiques ne sont jamais présents à l'état libre. Les conditions biologiques favorisent la formation des complexes mixtes métal-ligands. Nous avons alors choisi de nous intéresser au système Cu(II)-acide lactobionique-D-glucosamine, les sucres aminés étant des composés organiques naturels très abondants. Ils jouent un rôle important vis-à-vis des métaux présents à l'état de trace dans l'environnement. Le chitosane, polymère de la D-glucosamine est connu pour des intérêts multiples. Il est utilisé pour la séparation des métaux de transition (35), mais aussi en pharmacologie, en médecine, en cosmétologie, en agriculture et on pense pouvoir l'utiliser dans l'industrie papetière. En effet, la structure de la molécule de chitosane est proche de celle de la cellulose qui constitue les parois des cellules végétales (les groupements hydroxyles sont remplacés par des groupements aminés).

CHAPITRE I

**BASES THEORIQUES ET
METHODOLOGIE DES TECHNIQUES
UTILISEES**

De nombreuses molécules bioactives (protéines, sucres, etc) contiennent un certain nombre de groupements donneurs ayant des basicités et des affinités avec les ions métalliques, similaires mais non identiques. Leurs équilibres de complexation avec ces derniers sont ainsi caractéristiques de chaque système. Ces équilibres sont influencés aussi par les interactions intramoléculaires, dues à la conformation de la molécule de ligand. tout ceci complique l'évaluation des résultats de l'équilibre expérimental de chaque système.

Pour étudier la complexation des systèmes ion métallique-ligand nous avons utilisé essentiellement les techniques potentiométriques et spectroscopiques. Les secondes comportant principalement la spectroscopie électronique, le dichroïsme circulaire et la résonance paramagnétique électronique, apportent des renseignements quant à l'environnement de l'ion métallique et la nature des liaisons métal-ligand. La potentiométrie est utilisée par contre de manière quantitative pour déterminer les constantes de formation des complexes métalliques. Ce chapitre est consacré à quelques rappels théoriques ainsi qu'à la méthodologie mise en oeuvre pour réaliser cette étude de complexation.

A - RAPPELS THEORIQUES

I - spectroscopies électroniques

1 - transitions électroniques dans les complexes métalliques

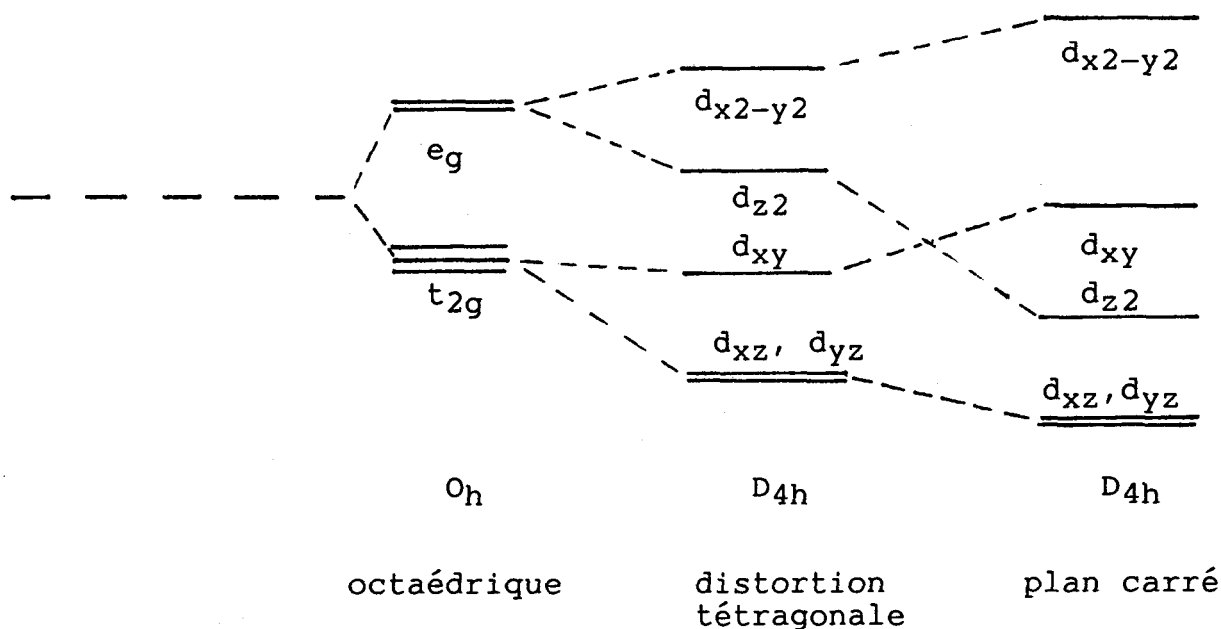
a - Transitions du métal

Les métaux de transition sont caractérisés par le remplissage de leurs orbitales d. Celles-ci sont au nombre de cinq et sont énergétiquement équivalentes, dans l'ion

métallique libre (solvaté), elles sont alors dites dégénérées. En présence de ligands, le métal se trouve dans un champ électrique (champ des ligands) et les niveaux énergétiques des orbitales subissent une levée de dégénérescence. Les molécules de ligands entourant l'ion métallique se trouvent impliquées dans une structure moléculaire complexe qui contribue à créer un champ cristallin dont les effets sur le cation reflètent son environnement chimique.

Cuivre(II)

L'ion cuivrique possède 9 électrons répartis sur les orbitales d. Le cuivre hexahydraté $\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ se classe dans le groupe de symétrie O_h où une seule transition est possible. Les complexes cuivriques sont sujets à une distortion considérable qui rend leur spectre d'absorption assez compliqué. Pour les complexes hexacoordinés, la symétrie octaédrique se trouve modifiée et, en pratique, la majorité des complexes du Cuivre(II) se classent dans le groupe tétragonal avec quatre liaisons courtes ligand-métal dans le plan (xy) et deux liaisons "longues" le long de l'axe z (au-dessus et en dessous de ce plan). A la limite, la molécule peut être liée quatre fois et être donc dans un plan carré de symétrie D_{4h} (36, 54).



Dans les complexes du type VO_5 , on observe les transitions :

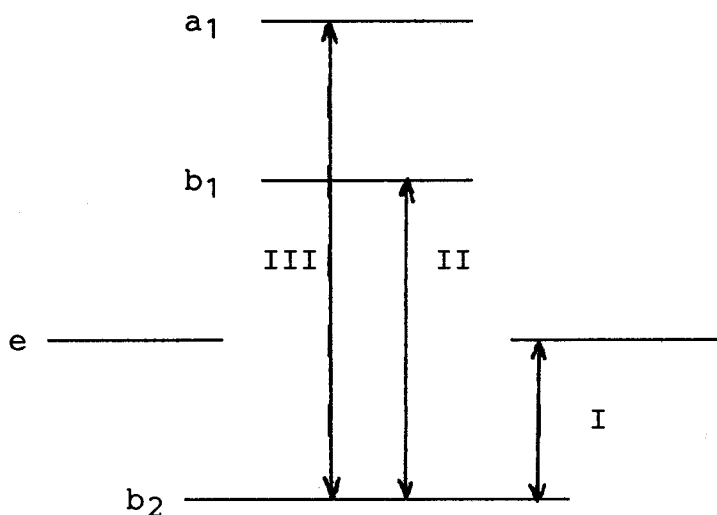


Diagramme énergétique des orbitales d de l'ion $VO(IV)$ sous l'effet du champ de ligand.

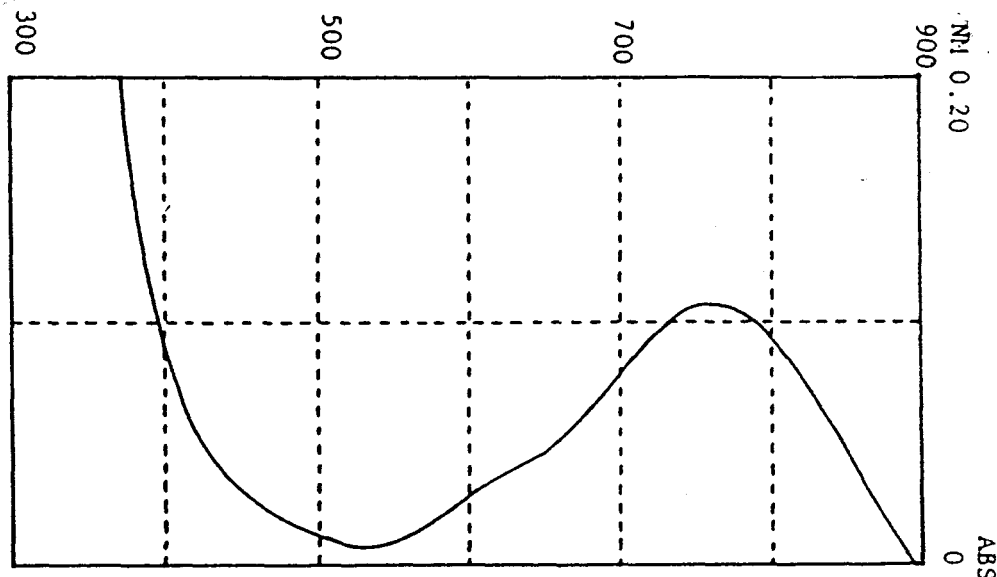
I	e	<—>	b ₂	2E	<—>	2B_2
II	b ₁	<—>	b ₂	2B_1	<—>	2B_2
III	a ₁	<—>	b ₂	2A_1	<—>	2B_2

Les deux premières transitions se situent sous la même enveloppe. Les règles de sélection dans la symétrie C_{4v} sont :

e	<—>	b ₂	permise
b ₁	<—>	b ₂	interdite
a ₁	<—>	b ₂	interdite

Ainsi les intensités relativement élevées des bandes II et III ne sont pas en accord avec les règles de sélection. Les deux premières bandes (I, II) à 745 nm et 617 nm apparaissent sous la forme d'une enveloppe unique, et la troisième à 320-440 nm est souvent cachée par la trainée d'une raie intense dans le proche U.V. (36-38)

Figure 1 : spectres d'absorption de $[\text{VO}(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$ en milieu acide.

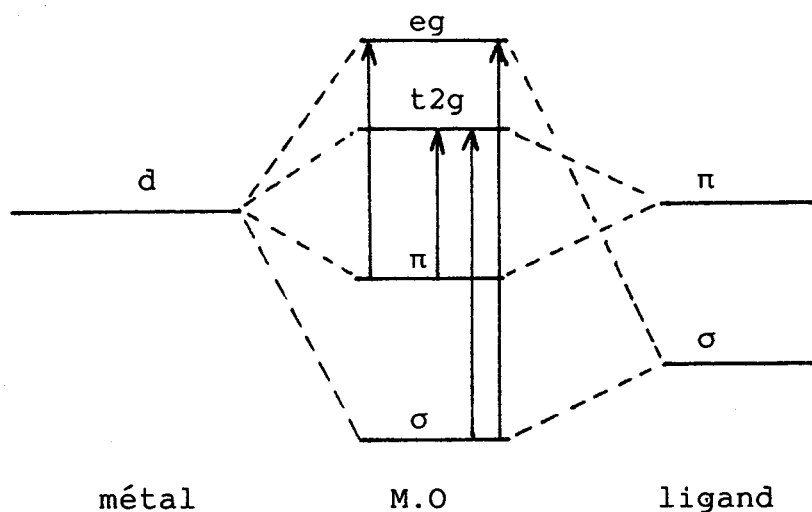


Dans un état de symétrie plus faible, le niveau ${}^2\text{E}(\text{xy}, \text{yz})$ peut subir une levée de dégénérescence (38). On observe alors quatre transitions.

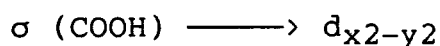
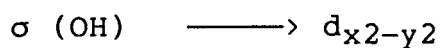
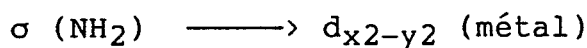
b - Transitions électroniques par transfert de charge

Elles consistent en des transferts électroniques entre une orbitale localisée sur le ligand et une orbitale localisée sur le métal ($\text{L} \longrightarrow \text{M}$) ou inversement (37). Les énergies et les intensités de ces transitions sont généralement beaucoup plus élevées que celles des transitions d-d. Toutes les transitions par transfert de charge sont permises. Les bandes sont très intenses. Les coefficients d'absorption molaire sont en général de l'ordre de 10^3 à $10^4 \text{ l mole}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Ces transitions apparaissent entre 230 nm et 400 nm.

Le diagramme simplifié des orbitales moléculaires illustrant les transitions de transfert de charge possibles entre un ligand et un métal est représenté ci-dessous.



Les molécules auxquelles nous nous intéressons renferment des groupes aminés, acides et hydroxyles, donnant trois types de transfert de charge.



2. Dichroïsme circulaire (39,40)

Lorsqu'une onde électromagnétique linéairement polarisée traverse un milieu comportant des chromophores optiquement actifs, ses deux composantes E_G et E_D présentent une biréfringence circulaire. Elle provient de la différence entre les vitesses des deux composantes, les indices de réfraction n_G et n_D étant différents. On observe une rotation du plan de polarisation d'un angle α . C'est le phénomène de dispersion optique rotatoire. Dans la région spectrale où apparaît une bande d'absorption optiquement active, le coefficient d'extinction de chacune des composantes sera différent. La longueur du vecteur E_D ne correspond plus à celle de E_G , et la résultante E décrit une ellipse (fig 2). On dit que le milieu présente le phénomène de Dichroïsme circulaire. L'activité optique est donc liée à l'anisotropie optique du milieu étudié.

La valeur de l'ellipticité est reliée aux amplitudes des constituants émergeant du milieu actif, P_D et P_G

$$\operatorname{tg} \psi = (P_D - P_G)/(P_D + P_G)$$

La mesure de l'ellipticité caractérise un échantillon donné. Elle est reliée aux coefficients d'extinction molaire ϵ_G et ϵ_D . Elle dépend de la nature du milieu et de la longueur d'onde de la lumière qui le traverse. On utilise plus généralement l'ellipticité molaire Θ , définie par la relation:

$$\Theta = \frac{3300 (A_G - A_D) M S}{l c} = 3300 \Delta\epsilon \quad (1)$$

Θ s'exprime en degrés cm^{-1} décimole $^{-1}$

c est la concentration de l'échantillon en g/l

l le trajet optique en cm

S la sensibilité de l'appareil en mm^{-1}

$(A_G - A_D)$ est mesurée sur le spectre en mm. $\Delta\epsilon = \epsilon_G - \epsilon_D$ est appelée absorption différentielle dichroïque. L'effet conjugué de l'absorption différentielle et de la différence de la vitesse de transmission de la lumière polarisée optiquement active, est appelé "effet Cotton". Les courbes dichroïques représentent les variations de $\Delta\epsilon$ ou de Θ en fonction de la longueur d'onde. On obtient des courbes de dichroïsme sur lesquelles on peut observer des effets Cotton positifs ou négatifs. La région spectrale balayée correspond aux transitions d-d du métal et aux transitions par transfert moléculaire de charge. Un changement de polarité de l'effet Cotton indique une modification dans la structure du métal (39,41).

3 - Résonance paramagnétique électronique

La résonance paramagnétique électronique permet de détecter les phénomènes de paramagnétisme propres aux électrons célibataires (42). Le cuivre (II) dont la configuration électronique est $(4s^0 3d^9)$ et l'oxovanadium (IV)

(3d¹) sont dans ce cas. Il est possible par R.P.E., d'obtenir des renseignements sur l'environnement moléculaire de ces ions métalliques, dans les complexes où ils sont impliqués. Nous nous limiterons à quelques rappels sur le principe de la R.P.E. et à la définition des paramètres spectroscopiques g et A . Le moment magnétique $\vec{\mu}_e$ s'obtient grâce à $\vec{\mu}_e = -g_e \beta \vec{S}$. Dans cette formule, g_e est le facteur spectroscopique de l'électron libre, β le magnéton de Bohr et \vec{S} le vecteur spin électronique. En l'absence de champ extérieur les moments magnétiques de chaque électron s'orientent de façon aléatoire. Sous l'effet d'un champ magnétique orienté d'amplitude H , ces moments s'orientent selon la direction de \vec{H} de façons parallèles et anti-parallèles. L'énergie correspondante est alors :

$$E = -\vec{\mu}_e \cdot \vec{H} = g_e \beta \vec{S} \cdot \vec{H}$$

\vec{S} pouvant prendre les valeurs $+1/2$ ou $-1/2$ pour un électron, la différence d'énergie ces deux états de spin est donc :

$$\Delta E = g_e \beta H$$

Sous l'effet d'un champ électromagnétique de fréquence ν dans le domaine des micro-ondes, les électrons célibataires peuvent subir une transition d'état d'énergie absorbant un quantum d'énergie $h\nu$, c'est le phénomène de résonance.

$$\Delta E = h\nu = g_e \beta H$$

h = constante de Planck

ν = fréquence de résonance

H = intensité du champ magnétique (GAUSS)

On travaille sur des systèmes où l'électron est engagé dans un environnement moléculaire caractérisé par une symétrie donnée. L'électron est alors caractérisé par un facteur spectroscopique g différent de g_e (électron isolé de tout environnement). L'ion cuivrique (4s⁰, 3d⁹) possède un seul

électron célibataire de spin $1/2$. Sous l'action d'un champ magnétique et sans couplage hyperfin, on observerait une seule transition entre les niveaux énergétiques, donc une seule raie de résonance. En phase liquide, dans un milieu isotrope où les mouvements sont rapides, on observerait une seule raie d'absorption de forme gaussienne dont la dérivée observée sur les spectres est extrêmement simple. En phase solide, à la température de l'azote liquide (77°K), les ions Cu(II) prennent place dans un réseau cristallin ou sont répartis dans une matrice amorphe, la forme de la raie n'est plus gaussienne.

Les paramètres des spectres R.P.E.

Le facteur g permet d'apprécier le degré de localisation des électrons célibataires qui provoquent l'absorption R.P.E., la valeur de g renseigne sur la symétrie et la nature des ligands complexants l'ion métallique. g se décompose selon les trois axes (g_x , g_y et g_z). Expérimentalement, le champ magnétique \vec{H} est colinéaire à l'un des axes, par convention, on choisit l'axe O_z

$$g_x = g_y = g_{\perp} \quad \text{et} \quad g_z = g_{//}$$

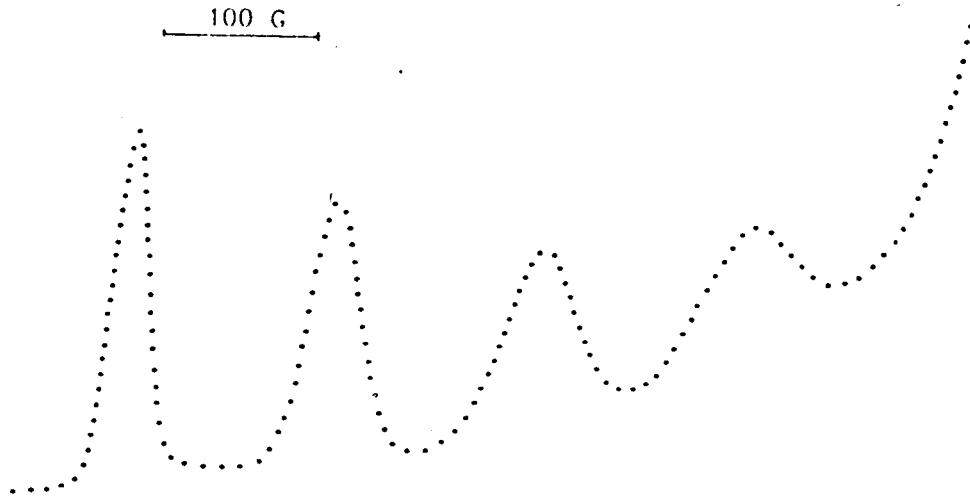
En l'absence d'interaction électron-noyau, l'absorption d'énergie se traduit par une seule raie d'absorption. Le couplage hyperfin est un couplage de type magnétique entre l'électron et le noyau de l'atome. Dans ce cas, le nombre de spin nucléaire I est non nul et peut par effet de couplage diviser chaque sous niveau électronique en $2I + 1$ sous niveaux nucléaires. En accord avec les règles de sélection $S = \pm 1$ et $I = 0$ on observe $2I + 1$ raies. L'écartement entre deux raies consécutives a pour valeur A , paramètre de couplage hyperfin.

Le couplage hyperfin étant anisotrope, A se décompose selon les trois directions :

$$A_x = A_y = A_{\perp} \quad \text{et} \quad A_z = A_{//}$$

Dans le cas de l'ion Cu(II) ($S = 1/2$, $I = 3/2$), la structure hyperfine entraîne l'existence de quatre raies équidistantes sur le spectre R.P.E. (Fig.3).

Figure 3 : spectres R.P.E. de $\text{Cu(H}_2\text{O)}^{2+}$ en milieu acide.



La valeur de g correspond à la valeur du champ existant au milieu des raies 2 et 3 et se calcule à l'aide des deux relations :

$$h\nu = g_{//} \beta H_{//}$$

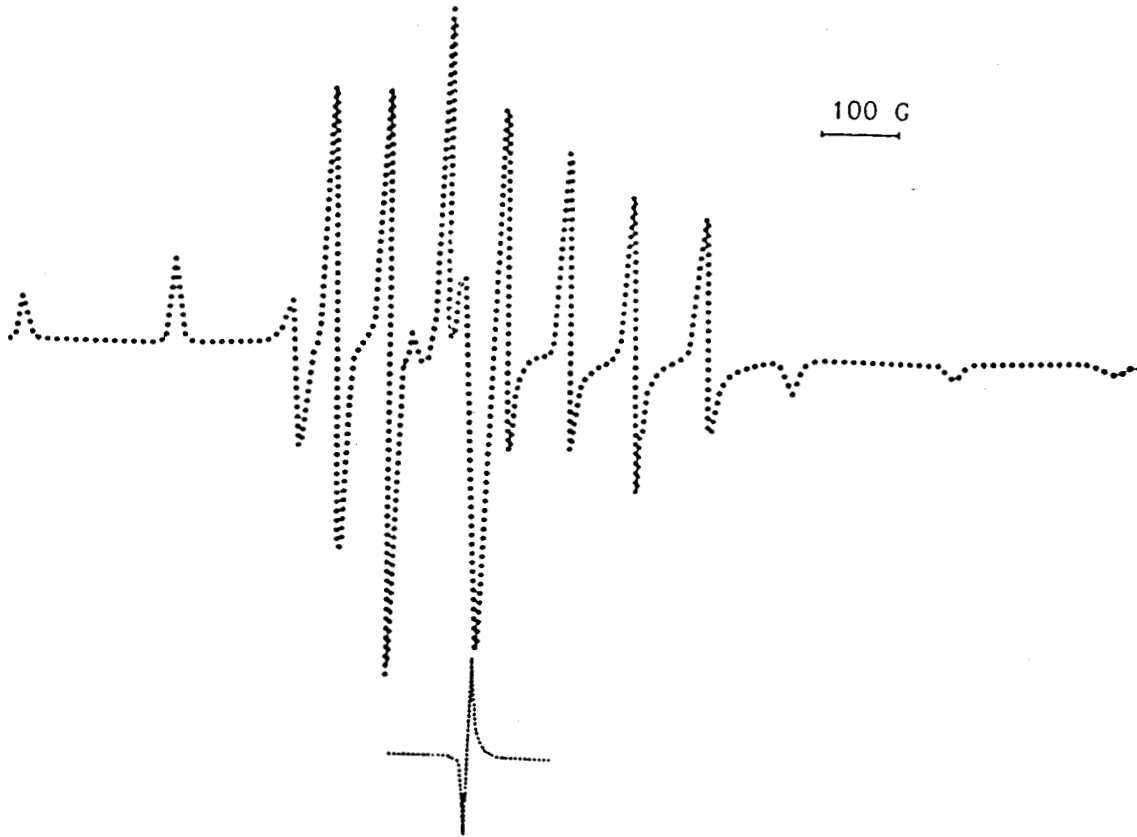
$$\text{et } h\nu = g_0 \beta H_0$$

H_0 est la valeur du champ de référence de l'échantillon étalon. On peut alors en déduire $g_{//}$

$$g_{//} = \frac{g_0 H_0}{H_{//}} \quad (2)$$

L'ion VO(IV) est caractérisé par $S = 1/2$ et $I = 7/2$. Le couplage hyperfin détermine 8 raies sur le spectre R.P.E. (Fig. 4).

Figure 4 : spectres R.P.E. de $[VO(H_2O)_5]^{2+}$ à 77 K en milieu acide



La détermination des paramètres spectroscopiques $g_{//}$, g_{\perp} , $A_{//}$ et A_{\perp} est riche d'informations pour l'étude de la complexation des ions métalliques. Par exemple pour l'ion cuivrique en solution aqueuse, $A_{//}$ varie de 168,6 G à 175 G et $g_{//}$ de 2.235 à 2.223 suivant que Cu(II) est lié à un ou deux atomes d'azote (43).

II - Potentiométrie

1. Rappels

Soit l'équilibre chimique



Les vitesses des réactions s'écrivent en fonction des activités des réactifs ou des produits :

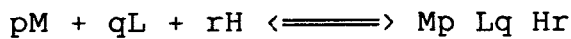
$$v_1 = k_1 a_A a_B \dots\dots\dots$$

$$v_2 = k_2 a_C a_D \dots\dots\dots$$

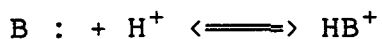
L'équilibre sera atteint lorsque les deux vitesses seront égales : $v_1 = v_2$ soit,

$$\frac{k_1}{k_2} = \frac{a_C \times a_D \times \dots\dots}{a_A \times a_B \times \dots\dots} = K \quad (3)$$

Dans cette expression, K est la constante d'équilibre de la réaction. Elle est reliée directement aux activités des réactifs et des produits à l'équilibre. Sa valeur permet d'obtenir la proportion des réactifs et des produits après que l'équilibre soit établi. La formation du complexe entre un ion métallique et un ligand procède d'un équilibre qui peut s'écrire :

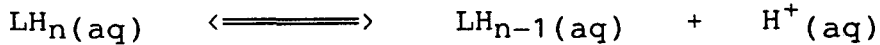


Dans ce type de liaison dite de coordination, le ligand est considéré comme un atome donneur de doublet électronique (base de Lewis). Le métal est considéré comme accepteur de cette paire d'électrons (acide de Lewis). Le même type de liaison intervient entre un doublet électronique libre d'une base et un proton. La protonation d'un ligand peut donc être traitée de manière identique à la formation d'un complexe métallique :



La force d'un acide repose sur sa capacité à se déprotoner. Elle se mesure par sa ou ses constantes de dissociation K_D . Par analogie avec la formation du complexe métallique, on se réfère aux constantes de formation de l'acide $k_F = 1/k_D$. Il est intéressant de noter que $\log k_F$ est égal à pK_D ($-\log k_D$).

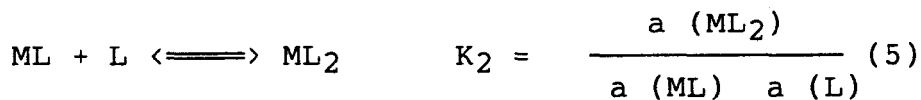
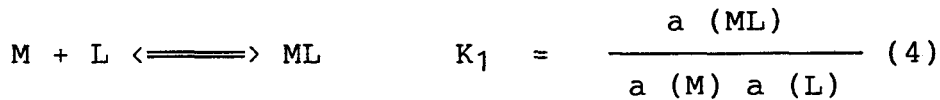
Le ligand est généralement noté L sous sa forme complètement déprotonée. Considérons les systèmes acido-basiques :



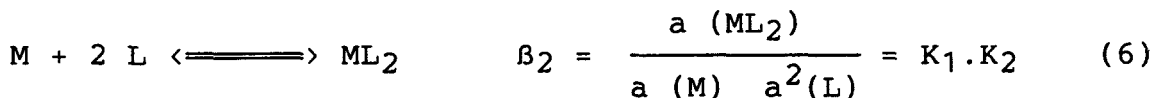
Les constantes d'acidité sont définies de manière classique :

$$K_{an} = \frac{a(\text{LH}_{n-1}) \times a(\text{H}^+)}{a(\text{LH}_n)}$$

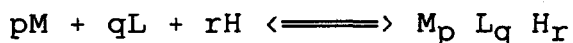
Un complexe métallique se forme à partir d'un ion métallique et d'une ou plusieurs molécules de ligand. Il s'agit alors de déterminer sa constante d'équilibre appelée constante de formation ou constante de stabilité de l'espèce formée. Si plusieurs molécules de ligand sont liées au métal, les espèces formées peuvent être considérées comme participant à un processus qui a lieu par étapes (les charges sont omises pour simplifier).



La constante de stabilité globale généralement notée β_n est la constante d'équilibre faisant référence à chaque élément, c'est-à-dire le métal M et le ligand déprotoné L. On obtient l'espèce ML_2 par la réaction :



D'une manière générale, pour la réaction :



la constante de stabilité globale est de la forme :

$$\beta_{pqr} = \frac{a(\text{M}_p \text{L}_q \text{H}_r)}{a^p(\text{M}) a^q(\text{L}) a^r(\text{H})} \quad (7)$$

Cette constante représente le produit des constantes intermédiaires de toutes les étapes du processus. Il faudra donc tenir compte dans le calcul de la constante de formation d'une espèce, des constantes de déprotonation de chaque site du ligand qui intervient dans la coordination avec le métal.

$$\beta_{pqr} = \prod_{i=0}^{i=q} K_{pir} \quad (8)$$

Ces constantes de stabilité thermodynamiques (β^T) sont exprimées en termes d'activités. Dans la pratique expérimentale, les solutions ne sont jamais idéales et l'on travaille sur des concentrations. Dans ce cas, les constantes de formation sont des constantes stoechiométriques (β^C). Certains auteurs proposent également des constantes de formation mixtes faisant intervenir des concentrations et des activités. L'étude des systèmes ligand-proton et ligand-proton-métal peut être réalisée par potentiométrie à électrode indicatrice. La réponse des électrodes est spécifique de l'activité de l'un des réactifs ou des produits en solution. Ces deux types de système peuvent faire intervenir des protons lors de leur formation. Les liaisons de coordination interviennent entre les doublets libres du ligand déprotoné et les orbitales vides du métal. Les équilibres de déprotonation des ligands subissent des modifications entraînant une variation de l'activité des ions $H^+(aq)$. Il est possible de suivre la réaction de complexation par la mesure du potentiel d'une électrode de verre. Les équilibres faisant intervenir le métal peuvent également être suivis par la mesure du potentiel d'électrodes dont la réponse est sélective des ions métalliques. Malheureusement, il n'existe pas d'électrodes sélectives pour tous les cations et de plus l'emploi de celles-ci s'avère assez délicat. La plupart des équilibres de formation de complexes métalliques font intervenir des groupes ionisables des ligands, ces derniers perturbent les équilibres de dissociation entraînant ainsi des variations du pH de la solution. Il est donc possible d'utiliser une électrode de verre pour étudier une réaction de complexation. Les progrès réalisés au niveau des appareillages ainsi que le

développement des moyens de calcul font que la potentiométrie est devenue la technique essentielle de toute étude d'interaction des ions métalliques avec des ligands d'intérêt biologique au cours des dernières années. Il s'agit donc de suivre la variation de pH de la solution afin d'obtenir les valeurs des constantes de formation des différents complexes.

2 - Concentration et activité

La réponse d'une électrode de verre est liée à l'activité des ions H^+ en solution, cette dernière étant directement proportionnelle à la concentration de ces ions.

Le pH est défini par : $pH = - \log \gamma [H^+]$

Le coefficient d'activité est une fonction de la force ionique I que l'on obtient grâce à l'équation $I = (\sum C_i Z_i^2)/2$, C_i et Z_i étant respectivement la concentration et la charge de chaque ion présent en solution. Selon la grandeur de la force ionique, on peut approcher la valeur du coefficient d'activité par les relations :

$$\text{pour } I < 0.02 \quad \log \gamma = 0.5 Z^2 \sqrt{I}$$

$$\text{pour } 0.02 < I < 0.2 \quad \log \gamma = \frac{0.5 Z^2 \sqrt{I}}{1 + B \sqrt{I}}$$

Au cours d'un dosage la concentration varie ainsi que la force ionique. Théoriquement, il est possible de calculer ces deux variables à chaque instant. En pratique, le problème de l'effet du changement de concentration d'une espèce sur son coefficient d'activité est minimisé par l'ajout à la solution d'un large excès d'électrolyte inerte (KNO_3), ce qui assure une force ionique et un coefficient d'activité constants. Ainsi pour la réaction de formation de l'espèce ML :

$$M + L \rightleftharpoons ML \quad \beta^T_1 = \frac{a(ML)}{a(M) a(L)} = \frac{\gamma_{ML} [ML]}{\gamma_M [M] \gamma_L [L]}$$

$$\log \beta^T_1 = \log \beta^C_1 + \log \frac{\gamma_{ML}}{\gamma_M \gamma_L} \quad (9)$$

Le second terme de cette dernière relation pourra alors être considéré comme constant. Nous travaillerons en concentration exprimée en moles par litre, celles-ci étant dépendantes de la température.

3 - Principe de calcul des constantes de stabilité

Le calcul des constantes de formation β^C nécessite la connaissance des concentrations des différents ions libres en solution. Ces concentrations sont déterminées à partir des concentrations totales et de celles des ions complexés. Lors de la titration par une base forte de la solution contenant le ligand et l'ion métallique, pour chaque volume de soude ajouté sont connus :

- les concentrations de l'ion métallique, des ligands ainsi que le pH de la solution donc l'activité et la concentration des ions H_3O^+ ;

- le nombre de moles total d'ion métallique N_1 ;

- le nombre total de moles de chaque ligand : N_2 et N_3 ;

- le nombre total de moles de protons : N_H .

Chaque réactif en solution est sous deux formes : libre ou complexé. On peut écrire en utilisant le nombre de moles partiel n .

$$N_1 = n_1 \text{ complexé} + n_1 \text{ libre}$$

Les constantes de formation sont données pour chaque espèce A par la formule :

$$\beta_A^C = \frac{C_{P,A}}{\prod_i C_{QA,i}^{p,i}} \quad (10)$$

où :

- $C_{p,A}$ est la concentration de l'espèce A à $pH = p$
- $C_{p,i}$ est la concentration du réactif i libre
($i = 1, 2, 3$ ou 4) à $pH = p$
- $q_{A,i}$ les coefficients stoechiométriques de l'espèce A.

Exemple : la constante de formation β^C de l'espèce

$M_2 X_1 Y_2 H_{-2}$ s'écrit :

$$\beta^C = \frac{[M_2 X_1 Y_2 H_{-2}]}{[M]^2 [X] [Y]^2 [H^+]^{-2}} \quad (11)$$

Pour une solution contenant 4 réactifs, l'équation générale régissant l'équilibre de N complexes peut se mettre sous la forme :

$$T_{p,i} = C_{p,i} + \sum_{A=1}^N \beta_A^C q_{A,i} \prod_{i=1}^4 C_{p,i}^{q_{A,i}} \quad (12)$$

où $T_{p,i}$ est la concentration analytique du réactif i définie par :

$$T_i = \frac{N_i}{V_0 + V_p}$$

V_0 est le volume initial de la solution et V_p le volume de soude ajouté pour $pH = p$. A titre d'exemple, considérons un système faisant intervenir deux complexes en solution ; $M_2 X_1 Y_2 H_{-2}$ et $M X_2 Y_2$ de constantes de formation respectives β_1 et β_2 , la concentration analytique de chacun des réactifs s'écrira :

$$T_{p,M} = C_{p,M} + \frac{2\beta_1 [M]_p^2 [X]_p [Y]_p^2 [H^+]_p^{-2}}{[X]_p^2 [Y]_p^2} + \beta_2 [M]_p$$

$$T_{p,X} = C_{p,X} + \frac{\beta_1 [M]_p^2 [X]_p [Y]_p^2 [H^+]_p^{-2}}{[X]_p^2 [Y]_p^2} + 2\beta_2 [M]_p$$

$$T_{p,Y} = \frac{C_{p,Y}}{[Y]^2_p} + 2\beta_1 [M]^2_p [X]_p [Y]^2_p [H^+]^{-2} + 2\beta_2 [M]_p$$

$$T_{p,H} = C_{p,H} - K_w/C_{p,H} - 2\beta_1 [M]^2_p [X]_p [Y]^2_p [H^+]^{-2}$$

Le programme SUPERQUAD (44) utilise les équations (10) et (12). Il effectue la minimisation de toutes les inconnues $C_{p,i}$, β_A^C de l'équation (12). Leur nombre est supérieur au nombre d'équations. Un traitement par moindres carrés non linéaire est nécessaire pour résoudre ce système. Le programme fait une estimation préalable en ions libres, à partir des valeurs de β_A^C proposées dans la modélisation. Lors des calculs, les valeurs négatives de β_A^C ne sont pas rejetées. En fin de convergence, l'espèce dont la constante β^C présente une erreur supérieure à une limite fixée est éliminée. Un nouveau cycle d'itération commence alors avec les espèces conservées. L'utilisation de ce logiciel est liée à la connaissance des espèces existantes. Il faut introduire le modèle réellement existant et une approximation des valeurs de β^C de chaque espèce. On peut, en introduisant un modèle incorrect, obtenir une convergence "correcte". Il faut donc utiliser prudemment ce logiciel.

B. METHODOLOGIE POTENTIOMETRIQUE ET SPECTROSCOPIQUE

I. Techniques spectroscopiques

1 - Appareillage

L'étude par spectroscopie électronique est effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre KONTRON UVIKON 810 P piloté par un ordinateur IBM.PC. Les cellules de mesure en quartz ont un trajet optique de 10 mm. L'introduction de la solution à analyser peut être assurée par une pompe péristaltique, ce qui

permet d'équilibrer le pH et surtout de pouvoir garder l'échantillon sous atmosphère d'argon.

Les spectres dichroïques sont enregistrés sur un dichographe Jobin et YVON MARK III piloté par un micro ordinateur Apple IIe. Les cellules de quartz ont un trajet optique compris entre 0.05 et 2 cm. Une méthode de traitement informatique élaborée au laboratoire nous permet d'obtenir par simple lecture la longueur d'onde et le $\Delta\epsilon$ de chaque effet Cotton.

Le spectromètre VARIAN E 109 à double cavité résonante est utilisé pour les mesures de R.P.E. Il est étalonné avec un échantillon en D.P.P.H. (1.1 Diphényl - 2 picrylhydrazyl) pour lequel $g// = 2.0023$. Les spectres sont enregistrés à la température de l'azote liquide (77°K) en présence d'éthylène glycol. Les complexes du cuivre (II) sont étudiés à une fréquence de 9.30 GHz et à un champ centré sur 3000 G. Ceux de l'oxovanadium (IV) sont étudiés à la même fréquence, le champ étant centré sur 3500 G.

2 - Mode opératoire

Les spectres U.V., D.C. et R.P.E. sont enregistrés pour différentes valeurs de pH. Les concentrations des solutions en métal est de $2 \cdot 10^{-3}$ ou $5 \cdot 10^{-3}$ mole.l⁻¹. Selon le système étudié, la concentration en ligand dépend du rapport utilisé :

- rapports 1/3 et 1/5 pour les systèmes Cu(II) acide lactobionique et VO(IV) - acide lactobionique ;
- rapport 1/3 pour le système Cu(II)-D-glucosamine ;
- rapport 1/1/7 pour le système ternaire Cu(II)-D-glucosamine-acide lactobionique.

Le métal est introduit sous forme de chlorure de cuivre et de perchlorate de vanadyle. Les différentes solutions sont préparées dans de l'acide 0.1 M.

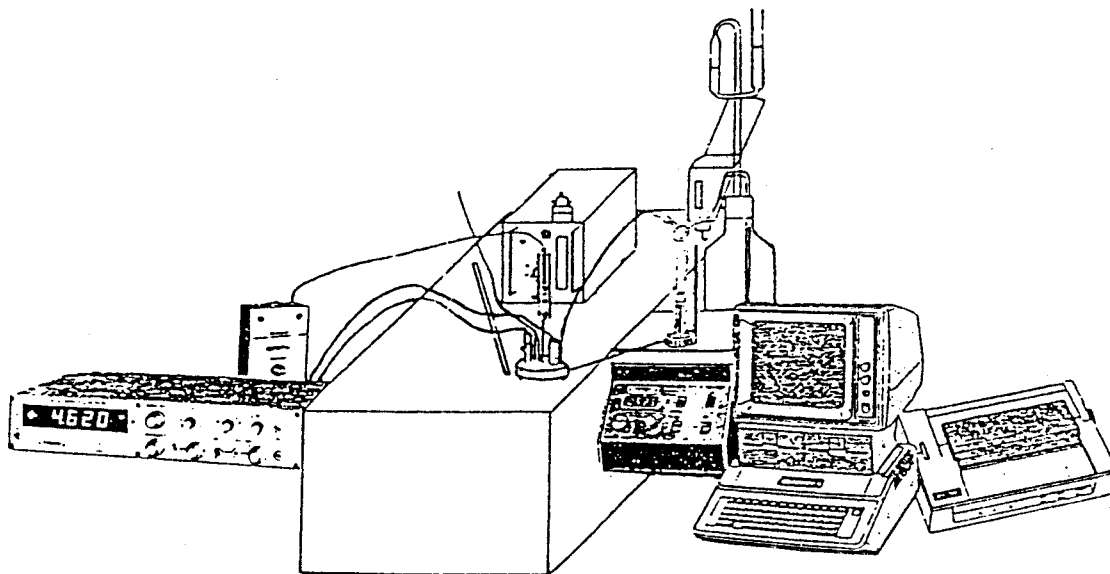
II - Technique potentiométrique

La potentiométrie peut apparaître comme une technique simple tant dans son principe que dans ses applications. Cependant, les résultats expérimentaux sont influencés par de nombreux facteurs. Nous avons effectué une étude minutieuse de tous les éléments susceptibles de faire varier les résultats expérimentaux. Nous avons particulièrement étudié l'influence de l'appareillage et de l'étalonnage des électrodes. Le système Ni(II)-glycine a été largement étudié ces dernières années, il a été proposé comme standard de référence en potentiométrie et fait actuellement l'objet d'une recommandation de l'I.U.P.A.C. Il constitue donc une bonne base de comparaison pour tester notre appareillage et les méthodes de calcul utilisées dans ce travail.

1 - Appareillage.

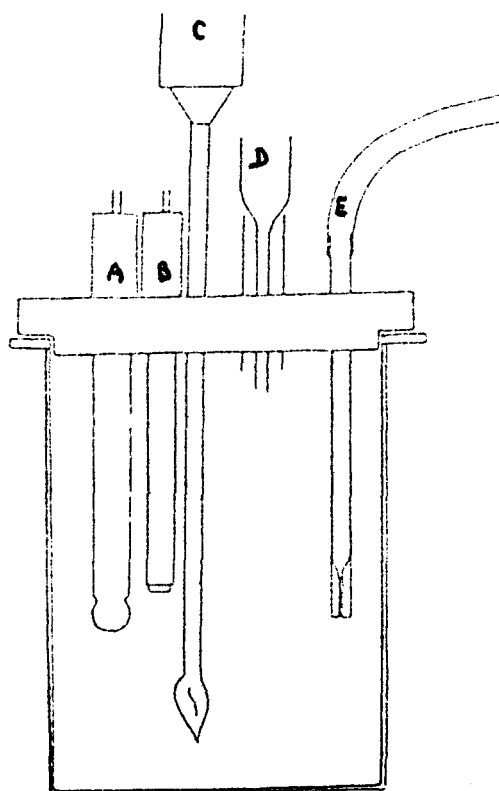
La chaîne de mesure est constituée d'un pH mètre TACUSSEL ISIS 20000 permettant de mesurer des variations au millième de pH, d'une burette automatique ELECTROBUREX d'une contenance de 2 cm³ et d'une cellule de mesure. L'ensemble peut être piloté par un micro ordinateur Apple IIe (fig5).

Figure 5 : banc potentiométrique



Les cellules de mesure en verre d'une contenance de 50 cm³ (fig 6) sont plongées directement dans un bain d'eau thermostatée à 25 ° C ± 0.01°C. Elles sont recouvertes d'un disque en téflon percé de cinq orifices. Ceux-ci permettent d'introduire : le capillaire (E) pour les ajouts de titrant stocké dans un flacon maintenu sous argon, les électrodes de mesure (A) et (B), le système d'agitation (C) et l'arrivée d'argon présaturé par passage dans une solution de KNO₃ 0.1 M. Ce disque permet de garder la solution sous atmosphère inerte pendant toute la durée de la titration.

Figure 6 : cellules de mesure potentiométriques



Les électrodes de mesure TACUSSEL sont de type TG 100 pour l'électrode de verre et XR 100 pour l'électrode de référence au calomel saturé en KCL. L'agitation est assurée par une hélice en verre entraînée par un moteur asservi à un régulateur de vitesse, celle-ci est fixée à 2000 tours par minute.

Lorsque l'utilisation de quantités réduites de produits s'avère nécessaire, un banc potentiométrique adapté à l'étude de faibles volumes de solution (0,8 à 3 ml) est utilisé. L'électrode double de mesure TACUSSEL est alors du type TCTB 11/HC. L'homogénéité de la solution est obtenue par agitation magnétique.

2 - Solutions.

L'eau utilisée pour la préparation de toutes les solutions est désionisée à travers des résines puis bidistillée sous argon. Sa résistance est de l'ordre de 1 M Ω .

La solution de soude (NaOH), utilisée comme titrant est préparée à partir d'une solution commerciale Merck exempte de carbonates. Elle est mise en flacon en boîte à gant, et maintenue sous atmosphère d'argon pour éviter sa carbonatation. Avant l'étude de chaque système, le titrant est standardisé par le phtalate acide de potassium.

$$[\text{NaOH}] = 0.1001 \pm 0.0004 \text{ mole l}^{-1}$$

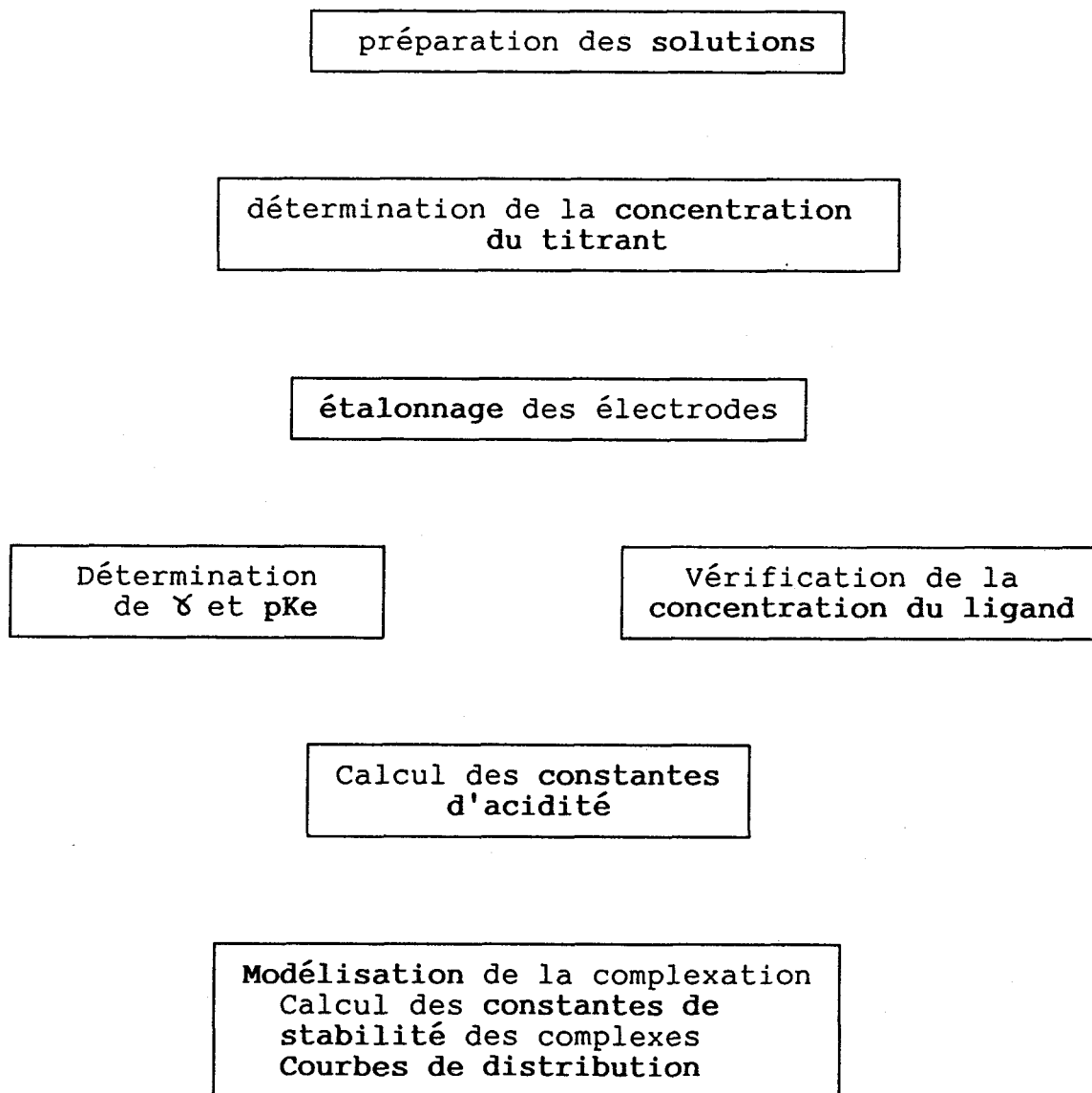
Les solutions de ligands sont préparées à partir de produits commerciaux. L'acide lactobionique est un produit Jansen Chimica d'une pureté supérieure à 97 %. Le chlorhydrate de D-glucosamine de pureté 99 % est un produit FLUKA. La force ionique de ces solutions est ajustée avant dosage à 0,1 M par addition de sel support KNO₃ de qualité SUPRAPUR. Le sulfate et le chlorure de cuivre (produits sigma de pureté supérieure à 99,999 %) sont pesés et dissous dans l'acide chlorhydrique (0.996 \pm 0.006).10⁻³ M ou de l'acide sulfurique (0.010 \pm 0.002) M pour obtenir des solutions métalliques. Le titre exact de ces solutions est ensuite déterminé par plusieurs titrations par l'E.D.T.A. préalablement standardisée par du tétraiodate de magnésium de concentration connue.

La solution de perchlorate de vanadium est préparée par dissolution de sulfate de vanadium tetrahydraté dans de

l'acide perchlorique $2 \cdot 10^{-2}$ mole $^{-1}$. On ajoute du perchlorate de Baryum $Ba(ClO_4)_2$ en solution perchlorique en quantité stoechiométrique pour faire précipiter le sulfate de Baryum $Ba(SO_4)$. Le mélange est filtré sous vide. La solution de $VO(ClO_4)_2$ obtenue est maintenue à pH acide (≈ 1) afin d'éviter l'hydrolyse du métal, et sous atmosphère inerte, pour empêcher son oxydation

3 - Conduite d'une mesure.

L'organigramme représente la conduite d'une mesure potentiométrique.



a - Etalonnage des électrodes

La valeur du $p[H]$ en terme de concentration diffère de la valeur lue pH . La relation liant ces grandeurs s'exprime dans les conditions expérimentales par :

$$pH = p[H] + \gamma \quad (45)$$

La grandeur γ est liée aux effets dûs au potentiel de jonction et à la différence entre l'activité et la concentration. Elle est considérée constante en première approximation. On la détermine expérimentalement à partir des courbes de neutralisation de l'acide fort HNO_3 par la base forte $NaOH$. La valeur de γ est la différence entre pH et $p[H]$ calculée dans la zone de la courbe de neutralisation où la réponse de l'électrode de verre est linéaire ($2 < pH < 3$). Un bon fonctionnement des électrodes et un étalonnage valable se traduisent par une valeur de γ de l'ordre de 0.07 unité de pH . Ce terme correctif résulte de calculs sur plusieurs titrations acido-basiques. Son obtention précède l'étude de chaque système de coordination. Deux solutions tampons sont utilisées pour étalonner les électrodes. Une solution de phtalate acide de potassium KHP à 0.05 M de $pH = 4.005$ et une solution de BORAX ($Na_2B_4O_7$) à 0.01 M de $pH = 9.183$ à $25^\circ C$. La force ionique des deux solutions est ajustée à 0.1 mole l^{-1} par ajout de KNO_3 . Pour déterminer les valeurs de γ et de P_{ke} , on doit déterminer le titre de l'acide fort. Pour cela, on utilise le programme DERIVATION. Connaissant la concentration d'acide fort en solution, le programme PH VISUE permet d'accéder aux valeurs de γ et de P_{ke} .

b - Programmes DERIVATION et PH VISUE

Le programme DERIVATION est basé sur la méthode de GRAN (46, 47). Il permet de tracer la courbe dV/dpH en fonction du volume de soude ajouté (fig.7, 8)

Au voisinage de l'équivalence, cette fonction est assimilable à deux droites, dont l'intersection correspond au volume équivalent.

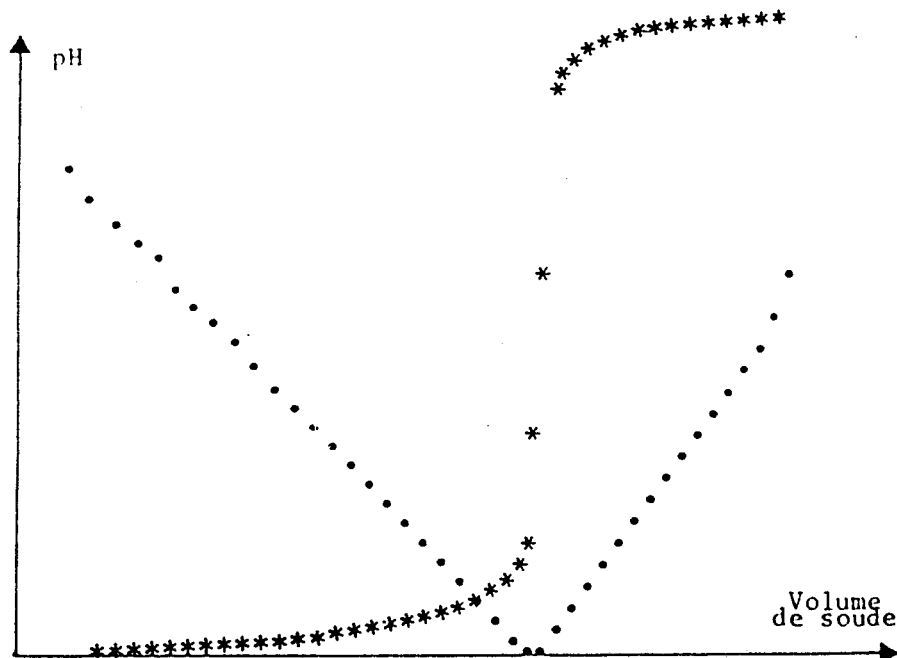
Programme PH VISUE

La comparaison des titrations théoriques et expérimentales d'un acide fort par une base forte permet de déterminer le terme correctif γ dans la zone de pH acide ($2 < \text{pH} < 3$). Ce programme permet en outre d'accéder à la valeur du pK_e en milieu alcalin ($10.8 < \text{pH} < 11.2$).

c - Contrôle des concentrations de ligand.

Après chaque courbe potentiométrique, la concentration de la solution de ligand contenu dans la cellule de mesure, est vérifiée par la méthode de GRAN à l'aide du programme DERIVATION. pour un monoacide, la courbe $dV/d\text{pH} = f(V_{\text{soude}})$ présente un minimum au volume équivalent (Fig 7)

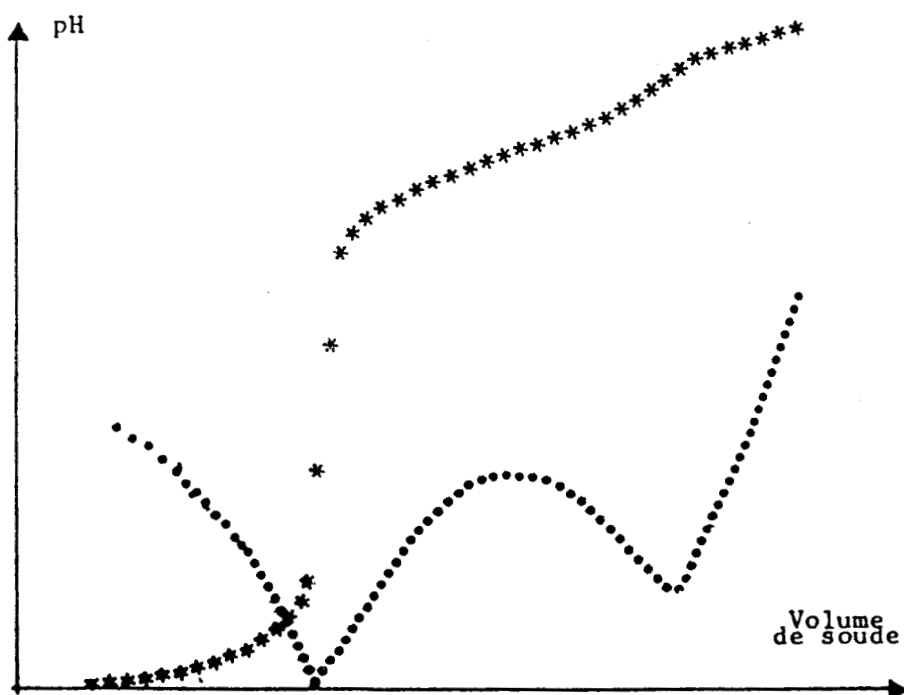
Figure 7 : neutralisation d'un acide fort par NaOH et visualisation de la dérivation.



Dans le cas d'un diacide dont les pK_a sont suffisamment différents, cette courbe présente deux minima. Ceci est le cas pour la glycine complètement protonée (Fig 8). Le premier point équivalent correspond à la neutralisation de la fonction

acide, le second à la neutralisation de la fonction amine. La différence entre les nombres d'équivalents basiques pour chaque point équivalent correspond au nombre de moles de ligand titrées. Le nombre d'équivalents basiques à la deuxième équivalence correspond au nombre total de protons titrables dans la solution. La pureté du ligand est ainsi vérifiée et calculée en opérant avec différentes dilutions de la même solution.

Figure 8 : neutralisation d'une solution de glycine par NaOH et visualisation de la dérivation.



d - Calcul des constantes

Les courbes $\text{pH} = f(V_{\text{NaOH}})$ pour le ligand seul permettent de déterminer la constante d'acidité du ligand et le produit ionique de l'eau à l'aide du programme SUPERQUAD. Ce programme utilise ensuite les concentrations de chaque réactant, les constantes d'acidité du ou des ligands, le jeu d'espèces proposées ainsi que leur β^c approchés pour calculer les constantes de formation des complexes et tracer la courbe de distribution correspondante. Le choix des espèces retenues est

lié au calcul par affinement mais également à la compatibilité chimique.

4 - Système Nickel (II) - glycine

Il est utilisé comme système de référence pour tester l'appareillage et les méthodes de calcul. Les valeurs des constantes de formation des trois complexes 1 1 0 ; 1 2 0 et 1 3 0 obtenues (colonne a) sont en bon accord avec les résultats tirés de la littérature.

Tableau 1 : constantes de formation des complexes $N_i(II)$ -glycine.

référence	(a)	(48)	(49)	(44)	(50)
B 1 1 0	5.66 (0.03)	5.58	5.57	5.63	5.55
B 1 2 0	10.43 (0.03)	10.30	10.29	10.43	10.31
B 1 3 0	13.97 (0.04)	13.75	13.74	13.99	13.85

5 - Méthodologie de l'étude cinétique

Les titrations potentiométriques de l'acide lactobionique par la soude ont été réalisées avec des solutions différentes et après l'établissement de l'équilibre.

Le phénomène de cinétique apparaît simultanément à la mise en solution du produit pesé. Nous avons introduit l'acide lactobionique δ -lactone en poudre dans une solution aqueuse de KNO_3 , de telle manière que la solution finale soit de force ionique $I = 0.1$ (et ceci en déclenchant le chronomètre dès le début de la mise en solution).

La concentration de la solution préparée est de $2.10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$. Après homogénéisation, nous avons introduit 50 cm^3 de cette solution dans une cellule thermostatée à 25° (± 0.01) sous atmosphère d'argon. La solution est soumise à

une agitation continue. Le pH de la solution a alors été suivi en fonction du temps.

III - Dosage des métaux par spectrophotométrie

Le principe repose sur la loi de Beer-Lambert $A = \text{Log}(I/I_0) = \epsilon lC$, qui donne la densité optique d'une substance absorbante en fonction de sa concentration. Afin de minimiser les erreurs sur la concentration en ions métalliques, nous avons réalisé l'étude à plusieurs longueurs d'onde, en utilisant l'équation Absorbance = $\epsilon lC + b$ où b est une mesure de l'erreur.

Le sulfate de cuivre CuSO_4 moins hygroscopique que CuCl_2 , nous a permis de préparer une solution étalon de concentration 0.0246 M/l. Ce titre a été déterminé après dosage par l'E.D.T.A. Les spectres d'absorption électronique de différentes solutions obtenues par dilution de la solution étalon ont été réalisés entre 600 nm et 850 nm (transition d-d du cuivre) (fig. 9).

Un traitement informatique élaboré au laboratoire permet d'obtenir l'absorption A et le coefficient d'extinction molaire ϵ pour chaque concentration et à différentes longueurs d'onde. Il permet aussi de tracer les courbes et en particulier la variation de ϵ en fonction de la longueur d'onde (Fig. 10). Cette dernière courbe est un test. Elle doit montrer que le coefficient d'extinction molaire est indépendant de la concentration.

Figure 9 : spectroscopie d'absorption pour les solutions de CuSO_4 à différentes concentrations.

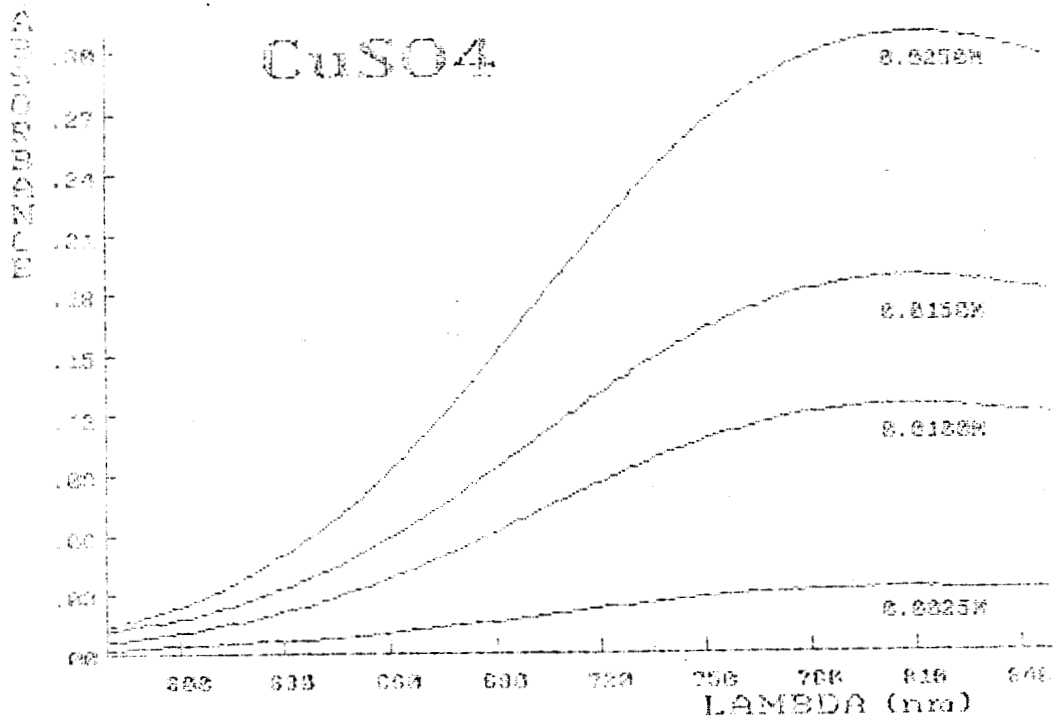
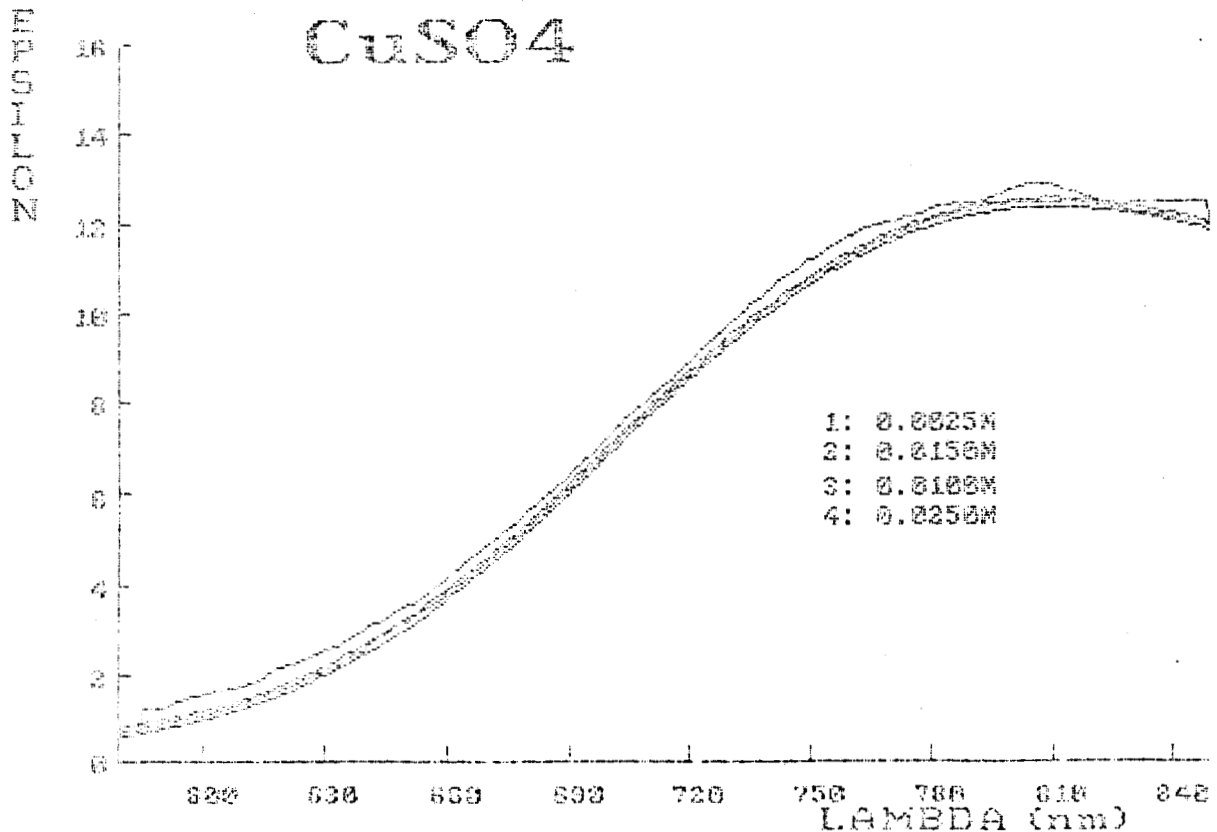


Figure 10 : coefficient d'extinction molaire ϵ en fonction de la longueur d'onde pour différentes concentrations de CuSO_4 .

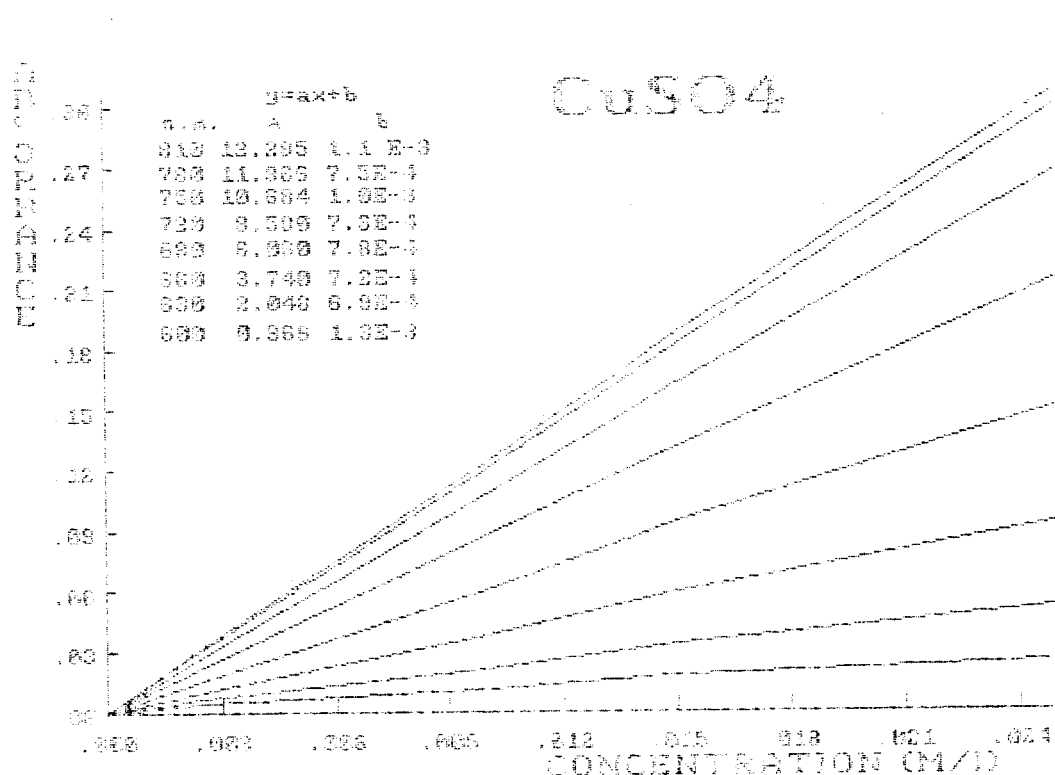


Les résultats sont utilisés dans un calcul statistique basé sur la méthode des moindres carrés, prenant en compte la loi de Beer-Lambert sous la forme $A = \epsilon l C + b$.

Les droites représentant la variation de l'absorbance en fonction de la concentration pour différentes longueurs d'onde sont tracées (fig.11) en tenant compte du terme correctif b.

Le spectre de la solution inconnue de CuCl_2 représentant l'évolution de l'absorption électronique est enregistré entre 600 et 850 nm. La concentration de cette solution peut être recalculée à chaque longueur d'onde, pour laquelle le coefficient d'extinction molaire ϵ et le terme correctif b ont été déterminés.

Figure 11 : absorbance en fonction des concentrations pour des solution de CuSO_4 .



La moyenne est alors effectuée sur les valeurs des concentrations obtenues pour chaque longueur d'onde. La concentration moyenne de CuCl_2 est égale à $1.29 \cdot 10^{-1}$ M. Le dosage de la solution de $\text{VO}(\text{ClO}_4)_2$ a été réalisée de la même

manière en utilisant une solution de sulfate de vanadium (VOSO_4) comme solution étalon (fig. 12). Les droites de moindres carrés utilisant l'équation $A = \epsilon l C + b$ ont alors pu être tracées, et regroupées (fig. 13).

L'enregistrement de la variation de l'absorbance de la solution de perchlorate de vanadium de titre inconnue, est réalisé pour des longueurs d'onde comprises entre 550 et 850 nm. La concentration de cette solution est alors calculée comme précédemment pour une série de longueurs d'onde. Le titre de la solution de $\text{VO}(\text{ClO}_4)_2$ est de $0.098 \pm 0.001 \text{ M}$.

Figure 12 : spectres U.V. de solutions de VOSO_4 .

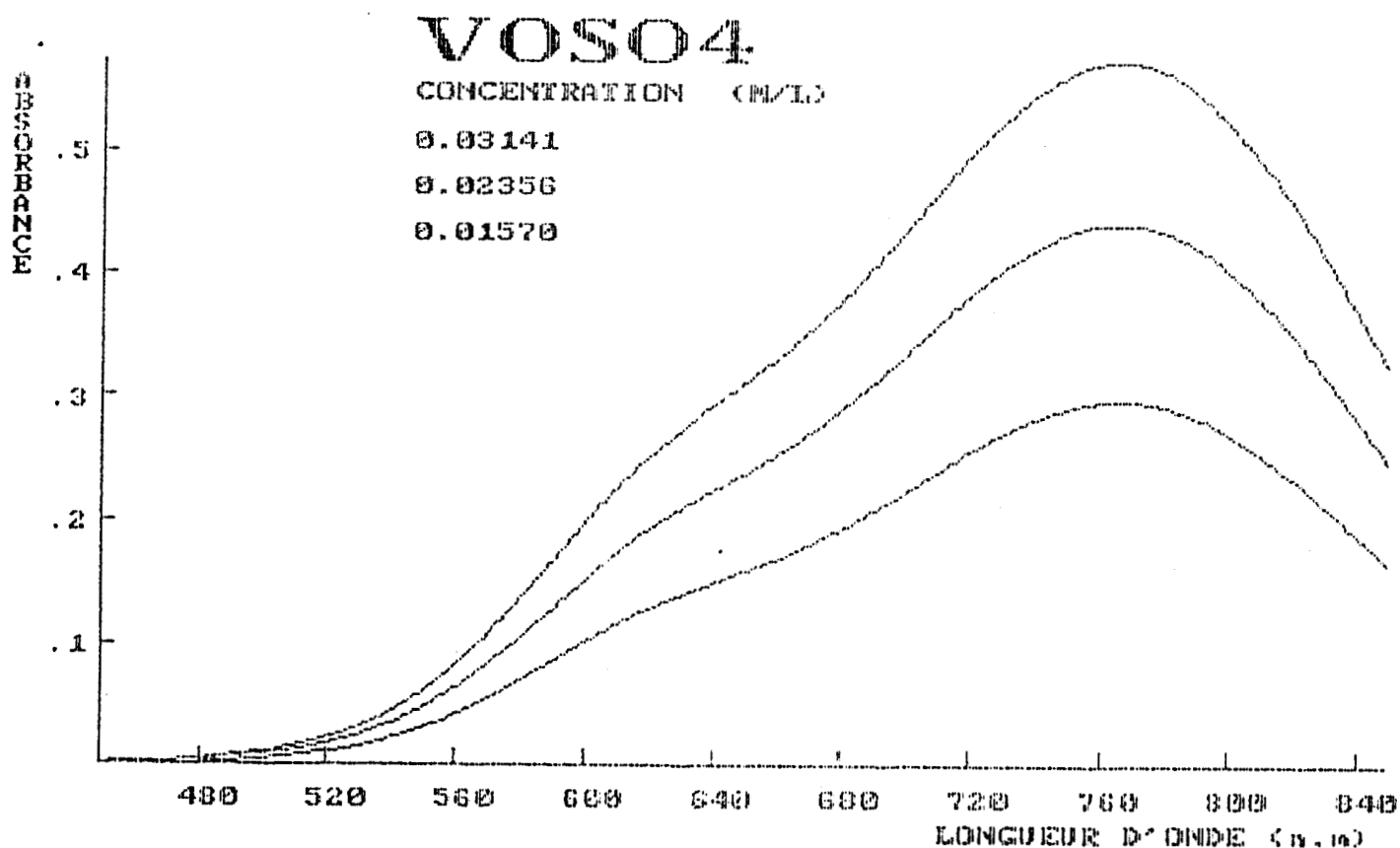
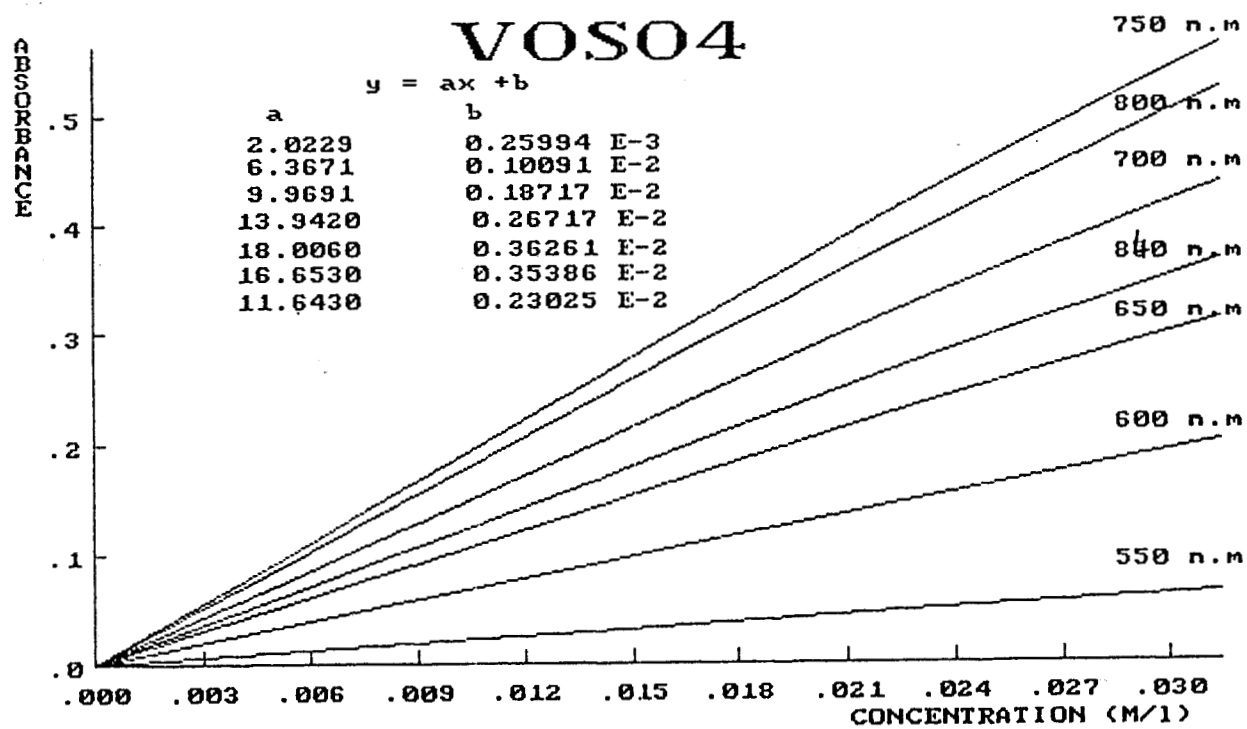


Figure 13 : absorbance en fonction de la concentration pour des solutions de VOSO_4 .



CHAPITRE II

ETUDE DE LA CINETIQUE D'EQUILIBRE DE L'ACIDE LACTOBIONIQUE AVEC LA δ - LACTONE

Pour étudier la complexation d'un ligand par des ions métalliques, il est impératif de déterminer ses constantes d'acidité. L'acide lactobionique ne subit, dans la gamme de pH étudiée, qu'une seule déprotonation, celle du groupement carboxylique. Un phénomène d'équilibre nous est apparu, dont il a été nécessaire de déterminer les caractéristiques pour pouvoir accéder à la valeur de cette constante d'acidité.

En effet, au moment de l'hydrolyse, ainsi que durant la titration de l'acide lactobionique par l'hydroxyde de sodium, le pH de la solution déchoit pendant une durée approximative de trois heures. Il s'agit d'un équilibre lent d'hydrolyse de la lactone en acide lactobionique.

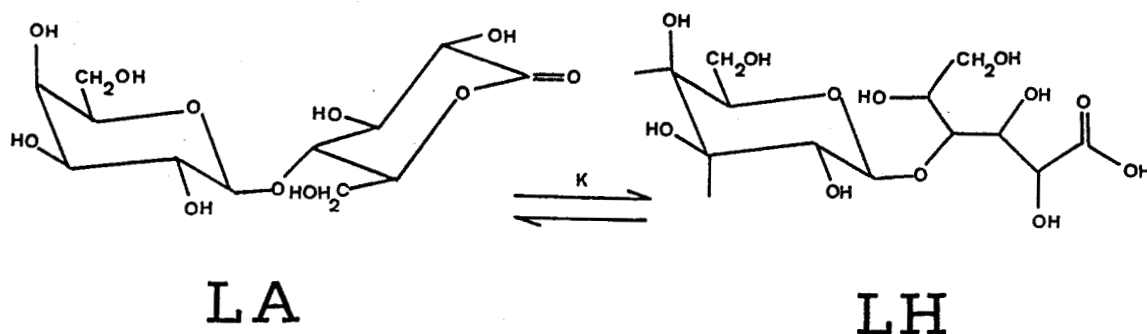
Peu de travaux ont été effectués pour étudier l'équilibre de la lactone avec son sel d'acide ainsi que sa cinétique d'hydrolyse. D.T. Sawyer et coll. ont, en 1959, étudié l'équilibre de l'acide gluconique avec ses lactones (51) en solution aqueuse. L'étude de ce système se complique par la formation de la δ et de la γ lactone. Ce n'est pas le cas du système qui fait l'objet de nos travaux, où seule la δ lactone se forme. L'équilibre acide-D-lactobionique- δ -lactone n'a cependant fait l'objet que d'une étude en 1971 par S.K.DUTTA et coll. (52). Ces auteurs ont basé leurs investigations sur des mesures de rotation spécifique, de conductance et de pH des solutions d'acide lactobionique à l'équilibre avec la lactone et le lactobionate de sodium.

Nous nous proposons de réaliser cette étude par potentiométrie. Cette technique étant celle que nous utilisons pour étudier les systèmes de coordination.

I. Etude théorique

1. Calcul des constantes d'équilibre

Figure 14 : schéma de l'équilibre entre l'acide lactobionique et la lactone.



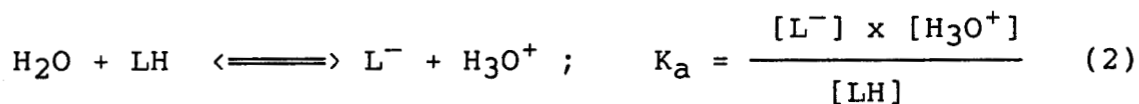
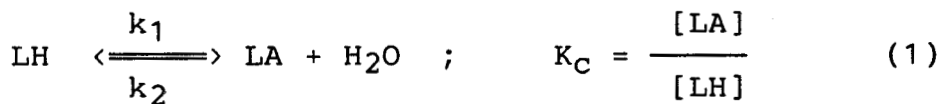
a - Calcul théorique

Nous utiliserons les écritures simplifiées suivantes :

LA = Lactone ;

LH = Acide lactobionique ;

L^- = Acide lactobionique déprotoné ou lactobionate ;



L'équation de la conservation de masse s'écrit :

n_0 = nombre de mole de (LA + LH + L^-) initial introduit par pesée ;

V = Volume initial de la solution ;

N_B = concentration de la base utilisée ;

V_B = Volume de base ajouté.

$$C = \frac{n_0}{V + V_B} = [L^-] + [LH] + [LA] \quad (3)$$

l'équation d'électroneutralité de la solution s'écrit :

$$[L^-] + [OH^-] = [H_3O^+] + [Na^+] \quad (4)$$

à partir des équations (1) et (2) utilisées sous les formes :

$$[LA] = K_C [LH] \quad (5) \quad \text{et} \quad [LH] = \frac{[L^-] [H_3O^+]}{K_a} \quad (6)$$

Nous pouvons écrire :

$$[LA] = \frac{K_C}{K_a} [L^-] [H_3O^+] \quad (7)$$

que l'on peut introduire dans l'équation (3) :

$$C = \frac{n_0}{V + V_B} = [L^-] + \frac{1}{K_a} [L^-] [H_3O^+] + \frac{K_C}{K_a} [L^-] [H_3O^+]$$

soit :

$$C = \frac{n_0}{V + V_B} = [L^-] \left[1 + \frac{[H_3O^+]}{K_a} (1 + K_C) \right]$$

et nous pouvons écrire alors :

$$[L^-] = \frac{n_0}{V + V_B} / \left[1 + \frac{[H_3O^+]}{K_a} (1 + K_C) \right] \quad (8)$$

Les ions sodium proviennent de la base ajoutée :

$$[Na^+] = N_B V_B / (V + V_B) ;$$

et, en utilisant en outre le produit ionique de l'eau :

$$K_e = [OH^-] [H_3O^+]$$

l'équation (4) donne :

$$[L^-] = [H_3O^+] - \frac{K_e}{[H_3O^+]} + \frac{N_B V_B}{V + V_B} \quad (9)$$

En utilisant les équations (8) et (9) nous pouvons écrire :

$$\frac{\frac{n_0}{V + V_B}}{1 + \frac{[H_3O^+]}{K_a} (1 + K_C)} = [H_3O^+] - \frac{K_e}{[H_3O^+]} + \frac{N_B V_B}{V + V_B}$$

on pose :

$$X = [H_3O^+] - \frac{K_e}{[H_3O^+]}$$

cela nous permet d'écrire :

$$n_0 = [X (V + V_B) + N_B V_B] \left[1 + \frac{[H_3O^+]}{K_a} (1 + K_C) \right]$$

$$n_0 = XV + XV_B + N_B V_B + XV \frac{[H_3O^+]}{K_a} (1 + K_C) + XV_B \frac{[H_3O^+]}{K_a} (1 + K_C) + N_B V_B \frac{[H_3O^+]}{K_a} (1 + K_C)$$

$$n_0 = V_B \left[X + N_B + X \frac{[H_3O^+]}{K_a} (1 + K_C) + N_B \frac{[H_3O^+]}{K_a} (1 + K_C) \right] + XV \left[1 + \frac{[H_3O^+]}{K_a} (1 + K_C) \right]$$

$$V_B = \frac{n_0 - [XV (1 + \frac{[H_3O^+]}{K_a} (1 + K_C))]}{X + N_B + X \frac{[H_3O^+]}{K_a} (1 + K_C) + N_B \frac{[H_3O^+]}{K_a} (1 + K_C)}$$

qui peut s'écrire aussi :

$$V_B = \frac{n_0 - XV \left[1 + \frac{[H_3O^+]}{K_a} (1 + K_C) \right]}{(X + N_B) \left[1 + \frac{[H_3O^+]}{K_a} (1 + K_C) \right]}$$

Nous utiliserons ce résultat sous la forme :

$$V_B = \frac{\frac{n_0}{1 + \frac{[H_3O^+]}{K_a} (1 + K_C)} - XV}{X + N_B} \quad (10)$$

En utilisant les courbes potentiométriques $pH = f(V_B)$ obtenues en dosant différentes solutions d'acide lactobionique par de la soude, nous pourrions accéder aux valeurs des constantes d'acidité K_a et d'équilibre K_C à partir de l'équation (10). L'affinement est effectué par la méthode du simplexe.

b - Programme $K_a K_C$ simplexe

L'algorithme de ce programme repose sur la méthode du simplexe (53) et sur la minimisation de chaque volume de base théorique et expérimental ajouté.

$$R_j = \sqrt{[\sum_{pH} (V_{Bexp} - V_{Bthéo})^2]} \quad (11)$$

l'indice j représente un jeu de paramètres

$V_{Bthéo}$ est obtenu à partir de l'équation (10).

Avec le programme $K_a K_C$ simplexe, toutes les grandeurs K_a , K_C , K_e , n_0 , V et N_B peuvent être théoriquement affinées simultanément.

Un simplexe est une figure géométrique définie dans un hyper espace de dimensions égales au nombre de variables plus une. Un simplexe à deux dimensions (deux grandeurs à affiner)

$$V_B = \frac{n_0 - XV \left[1 + \frac{[H_3O^+]}{K_a} (1 + K_C) \right]}{(X + N_B) \left[1 + \frac{[H_3O^+]}{K_a} (1 + K_C) \right]}$$

Nous utiliserons ce résultat sous la forme :

$$V_B = \frac{\frac{n_0}{1 + \frac{[H_3O^+]}{K_a} (1 + K_C)} - XV}{X + N_B} \quad (10)$$

En utilisant les courbes potentiométriques $pH = f(V_B)$ obtenues en dosant différentes solutions d'acide lactobionique par de la soude, nous pourrions accéder aux valeurs des constantes d'acidité K_a et d'équilibre K_C à partir de l'équation (10). L'affinement est effectué par la méthode du simplexe.

a. Programme $K_a K_C$ simplexe

L'algorithme de ce programme repose sur la méthode du simplexe (53) et sur la minimisation de chaque volume de base théorique et expérimental ajouté.

$$R_j = \sqrt{\left[\sum_{pH} (V_{Bexp} - V_{Bthéo})^2 \right]} \quad (11)$$

l'indice j représente un jeu de paramètres

$V_{Bthéo}$ est obtenu à partir de l'équation (10).

Avec le programme $K_a K_C$ simplexe, toutes les grandeurs K_a , K_C , K_e , n_0 , V et N_B peuvent être théoriquement affinées simultanément.

Un simplexe est une figure géométrique définie dans un hyper espace de dimensions égales au nombre de variables plus une. Un simplexe à deux dimensions (deux grandeurs à affiner) est un triangle. L'objectif de la méthode consiste à diriger le plus rapidement possible le simplexe vers le lieu de

est un triangle. L'objectif de la méthode consiste à diriger le plus rapidement possible le simplexe vers le lieu de l'espace où R_j est minimum. Pour cela, il existe plusieurs règles à respecter :

Règle 1 : après chaque calcul de R_j , le simplexe doit bouger.

Règle 2 : le point qui a le R_j le plus élevé est remplacé par son image par rapport au centre de symétrie défini par les autres points.

Règle 3 : Si pour ce point réfléchi, R_j est supérieur à celui de son point objet, la règle 2 n'est pas appliquée. La règle 2 est alors utilisée pour un autre point.

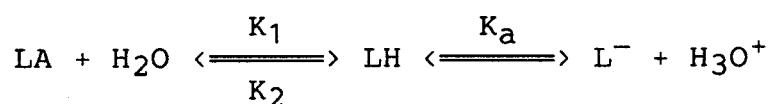
Règle 4 : Lorsqu'un minimum est obtenu pour R_j , il faut refaire une nouvelle progression du simplexe en partant d'autres paramètres initiaux. Cette procédure a pour but d'éviter les minima secondaires.

Règle 5 : il est possible d'accélérer ou de ralentir la progression du simplexe en ajoutant aux opérations de réflexion des expansions ou des contractions.

2. Calcul des constantes vitesse

Afin de déterminer les concentrations des différents produits en solution par l'étude de la cinétique d'équilibre, nous avons émis l'hypothèse que la cinétique est d'ordre 1. Cette hypothèse a été vérifiée par Sawyer (51) dans le cas de l'équilibre cinétique de la D-glucono-lactone avec l'acide gluconique.

Reprenons l'écriture de cet équilibre :



l'équation de vitesse s'écrit dans l'hypothèse d'une cinétique d'ordre 1 :

$$v = - \frac{d[\text{LA}]}{dt} = K_1 [\text{LA}] - K_2 [\text{LH}] \quad (12)$$

Dans l'équation (3)

$$C = \frac{n_0}{V + V_B} = [\text{LA}] + [\text{LH}] \left(1 + \frac{K_a}{[\text{H}_3\text{O}^+]} \right)$$

$$\text{posons : } D = 1 + \frac{K_a}{[\text{H}_3\text{O}^+]}$$

nous pouvons écrire :

$$[\text{LH}] = \frac{C - [\text{LA}]}{D}$$

l'équation de vitesse (12) devient :

$$v = - \frac{d[\text{LA}]}{dt} = K_1 [\text{LA}] - K_2 \frac{C - [\text{LA}]}{D}$$

Lorsque l'équilibre s'établit,

$$v = - \frac{d[\text{LA}]}{dt} = 0 ; \quad [\text{LA}] = [\text{LA}]_{\text{eq}}$$

$$\text{en posant : } T = \frac{[\text{LA}]_{\text{eq}}}{C - [\text{LA}]_{\text{eq}}},$$

l'équation (12) peut s'écrire :

$$v = K_1 [\text{LA}] - K_2 T \frac{D_{\text{eq}}}{D} C + K_2 T \frac{D_{\text{eq}}}{D} [\text{LA}]$$

On admet que :

$$\frac{D_{\text{eq}}}{D} \approx 1$$

En posant $[\text{LA}] = x$, l'équation (12) devient :

$$- \frac{dx}{dt} = K_1 [x (1 + T) - TC]$$

soit :

$$\frac{dx}{x (1 + T) - TC} = - K_1 dt$$

dont l'intégration donne :

$$\frac{1}{1 + T} \text{Ln} \frac{x (1 + T) - TC}{x_0 (1 + T) - TC} = - K_1 t$$

on peut donc écrire :

$$\text{Ln} \frac{[[LA] (1 + T) - TC]}{[[LA]_0 (1 + T) - TC]} = - K_1 (1 + T) t \quad (13)$$

En remplaçant T par sa valeur, l'expression peut être modifiée en :

$$\frac{(1 + T) [LA] - TC}{(1 + T) [LA]_0 - TC} = \frac{\left(1 + \frac{[LA]_{eq}}{C - [LA]_{eq}}\right) [LA] - \frac{[LA]_{eq}}{C - [LA]_{eq}} C}{\left(1 + \frac{[LA]_{eq}}{C - [LA]_{eq}}\right) [LA]_0 - \frac{[LA]_{eq}}{C - [LA]_{eq}} C} =$$

$$\frac{(C - [LA]_{eq} + [LA]_{eq}) [LA] - C[LA]_{eq}}{(C - [LA]_{eq} + [LA]_{eq}) [LA]_0 - C[LA]_{eq}} = \frac{[LA] - [LA]_{eq}}{[LA]_0 - [LA]_{eq}}$$

l'équation (13) peut alors s'écrire plus simplement :

$$\text{Ln} \frac{[LA] - [LA]_{eq}}{[LA]_0 - [LA]_{eq}} = - (1 + T) K_1 t \quad (14)$$

que l'on utilise sous la forme :

$\text{Ln} \{ [LA] - [LA]_{eq} \} = - (1 + T) K_1 t + \text{Ln} \{ ([LA]_0 - [LA]_{eq}) \}$

sachant que :

$$[LA] = C - [L^-] - [LH]$$

et en utilisant l'équation (2), on obtient:

$$[LA] = C - [L^-] \left(1 + \frac{[H_3O^+]}{K_a} \right)$$

Dans l'équation précédente, on introduit :

$$[L^-] = [H_3O^+] + \frac{N_B V_B}{V + V_B} - \frac{K_e}{[H_3O^+]}$$

[LA] peut donc être calculée pour chaque pH en utilisant l'équation suivante :

$$[LA] = C - \left([H_3O^+] + \frac{N_B V_B}{V + V_B} - \frac{K_e}{[H_3O^+]} \right) \left(1 + \frac{[H_3O^+]}{K_a} \right) \quad (15)$$

que l'on exprime sous la forme :

$$[LA] = C - \left(\frac{N_B V_B}{V + V_B} + 10^{-pH} - \frac{K_e}{10^{-pH}} \right) \left(1 + \frac{10^{-pH}}{K_a} \right) \quad (16)$$

$[LA]_{eq}$ est calculée en utilisant le pH à l'équilibre. On peut tracer à partir des concentrations [LA] et $[LA]_{eq}$:

$$\ln \{ [LA] - [LA]_{eq} \} = f(t)$$

Si nous obtenons une droite, ceci confirmera notre hypothèse selon laquelle la cinétique d'équilibre de l'acide lactobionique et de la S-lactone est d'ordre 1. De ce graphe, nous pourrions déduire la valeur de la constante vitesse K_1 . La pente de la droite est égale à $-K_1 (1 + T)$, avec :

$$T = \frac{[LA]_{eq}}{C - [LA]} \quad T \text{ est calculé connaissant } pH_{eq}.$$

On peut obtenir la valeur de K_2 ($K_2 = K_1 / K_C$). On peut utiliser la valeur de l'ordonnée à l'origine de la droite ($\ln \{ ([A]_0 - [LA]_{eq}) \} = f(t)$) pour accéder à la valeur de

$[LA]_0$, la concentration initiale en lactone. Ce résultat est nécessaire pour utiliser les programmes de modélisation permettant d'établir les constantes thermodynamiques de formation des complexes. L'utilisation du logiciel nécessite de connaître les quantités exactes de métal, de proton et de ligands présents en solution. En déterminant la quantité initiale de lactone en solution, on peut en déduire la quantité d'acide lactobionique et de lactobionate susceptible de participer aux équilibres de coordination avec le métal.

III. Résultats

Une étude préliminaire effectuée sur plusieurs heures a permis de limiter l'étude de la cinétique d'équilibre à trois heures, qui est le temps nécessaire à l'établissement de l'équilibre (fig. 15). Nous avons également suivi l'évolution du pH de la solution après ajout de base (fig. 16). Cela a consisté à introduire un certain volume de soude de titre connu dans une solution d'acide-lactobionique- δ -lactone à l'équilibre, le temps initial est celui correspondant à l'introduction de la soude.

Les constantes K_C et K_a sont calculées en utilisant les courbes de neutralisation $pH = f(V_B)$ et à l'aide des calculs théoriques développés précédemment.

Les valeurs des concentrations en protons $[H_3O^+]$ pour chaque volume V_B de base ajouté sont introduites dans l'équation (10). Les valeurs moyennes des constantes obtenues à l'aide de l'affinement (simplexe) sont :

$$K_a = (2.94 \pm 0.03) 10^{-4} \quad \text{soit} \quad pK_a = 3.531$$

$$K_C = 0.117 \pm 0.006$$

L'étude cinétique a permis de construire les fonctions $\ln \{ [LA] - [LA]_{eq} \} = f(t)$ (fig. 17, 18). Le pH_{eq} correspond au pH de la solution lorsque l'équilibre est atteint.

Nous obtenons des droites, ce qui confirme l'hypothèse d'une cinétique d'ordre 1.

Figure 15 : variation du pH d'une solution d'acide lactobionique δ -lactone en fonction du temps immédiatement après hydrolyse.

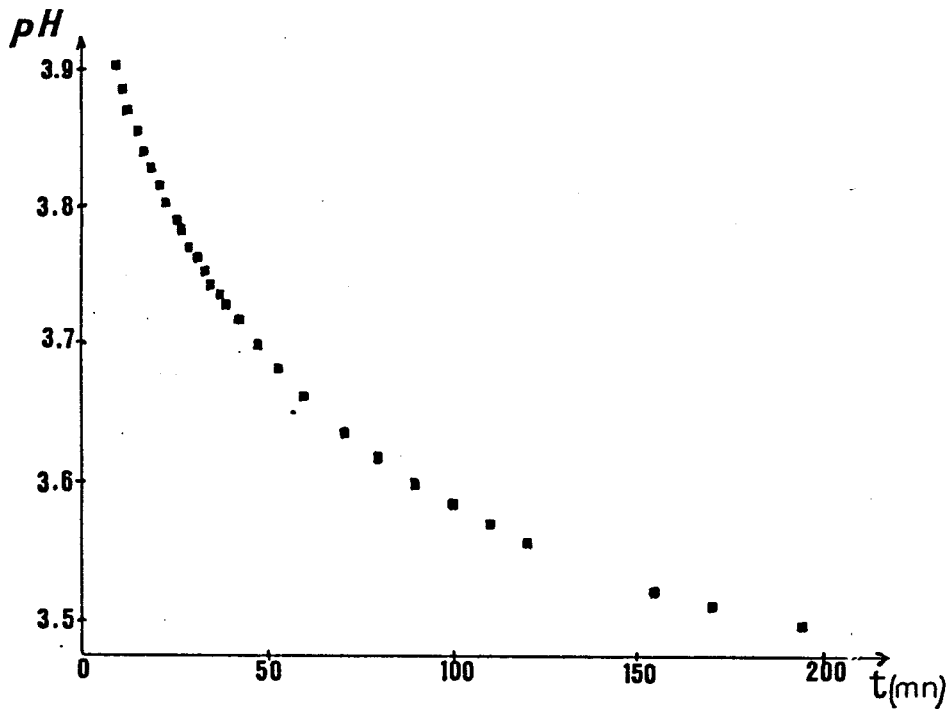


Figure 16 : variation du pH d'une solution d'acide lactobionique δ -lactone en fonction du temps après ajout de base

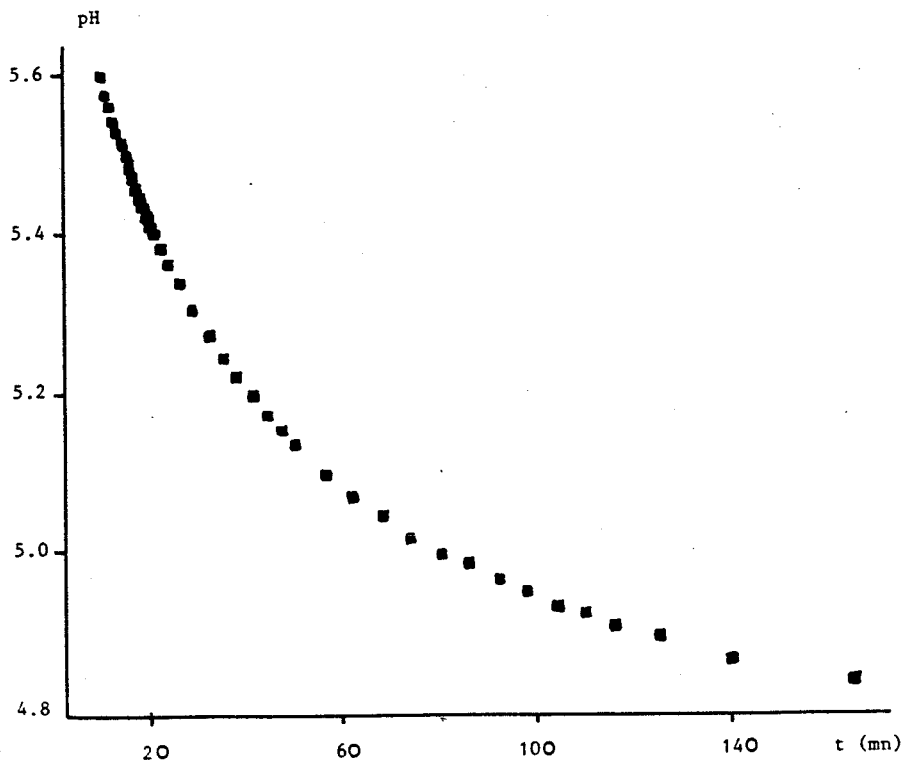


Figure 17 : cinétique d'équilibre immédiatement après hydrolyse.

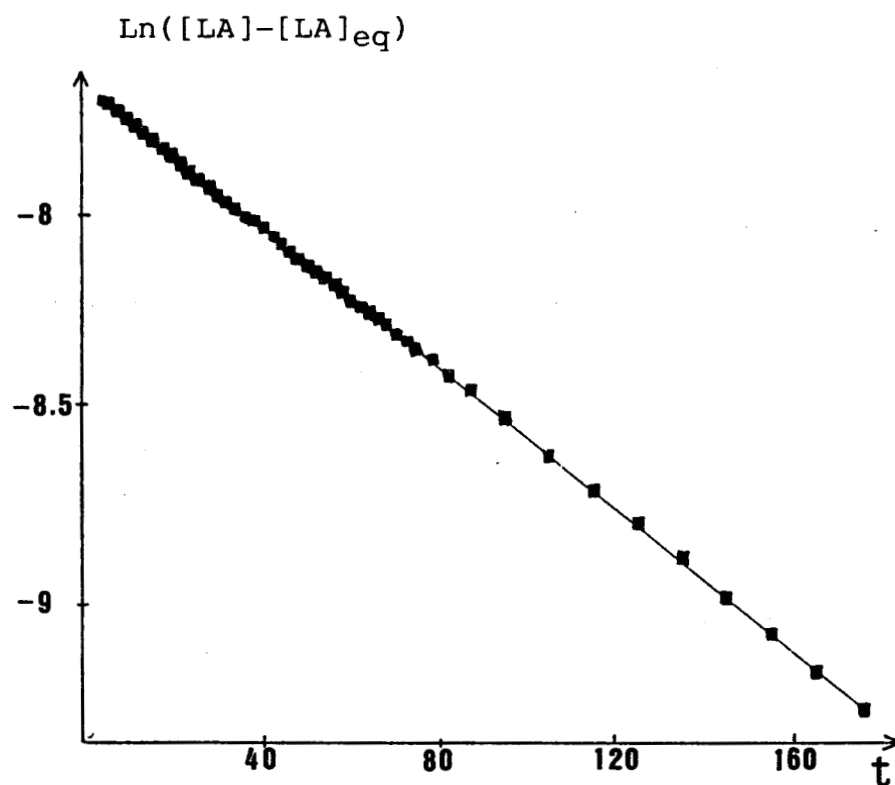
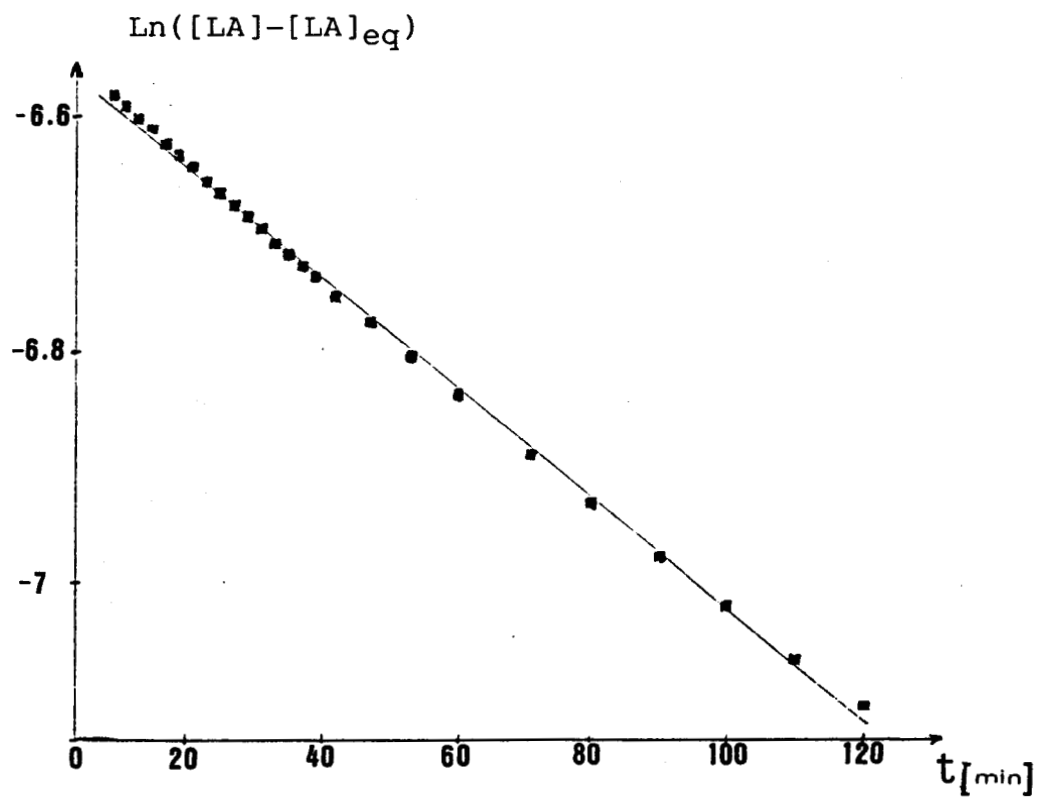


Figure 18 : cinétique d'équilibre en cours de dosage



La constante vitesse K_1 est calculée à l'aide de la relation $K_1 = -p (c - [LA]_{eq}) / c$ où p est la pente de la droite et c la concentration en acide lactobionique et lactone introduite par pesée. La valeur moyenne trouvée pour K_1 est :

$$K_1 = (1.48 \pm 0.03) \cdot 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$$

La concentration initiale en lactone est recalculée par extrapolation des droites au temps initial ($t = 0$). Celle-ci varie de 9 % de la concentration totale du soluté à un pH initial de 3.3 à 0.15 % de cette concentration à un pH initial de 5.6.

Ces résultats sont assez différents de ceux déterminés par DUTTA et coll. Ces auteurs ont en effet trouvé une constante d'acidité K_A légèrement inférieure ($pK_a = 3.6$), une constante vitesse peu différente $K = 2.14 \cdot 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$ mais une constante d'équilibre supérieure $K_C = [LA] / [LH] = 0.191$. Cette dernière valeur indique qu'à l'équilibre la solution aqueuse d'acide lactobionique et de δ -lactone se trouve composée de 84 % de forme acide et de 16 % de lactone.

En ce qui concerne nos résultats, la constante d'équilibre indique des proportions de 89.5 % d'acide et 10.5 % de lactone, ce qui correspond aux valeurs trouvées à partir de l'étude cinétique par extrapolations des droites (fig 17, 18).

Les résultats obtenus indiquent la présence de lactone jusque $pH \approx 6$. Le pK_a de l'acide lactobionique (3.53) permet de prévoir sa déprotonation à partir de $pH \approx 2.5$. Le calcul de cette constante de dissociation est donc influencé par cet équilibre.

L'étude de la coordination de l'acide lactobionique avec un ion métallique nécessite de connaître la quantité exacte du ligand en solution. Dans la zone de pH inférieure à 4, la lactone représente encore 5 % de la quantité de soluté, l'équilibre ne peut donc pas être négligé. Au-delà de ce pH, la quantité de soluté n'intervenant pas dans la coordination,

est très faible (inférieure à 2 %). L'étude de la complexation peut être réalisée de manière classique, c'est-à-dire par titration continue entre pH 4.5 et pH 12, l'équilibre acide lactobionique-lactone n'interférant plus ou très peu avec les équilibres de coordination.

CHAPITRE III

**ETUDE DE LA COMPLEXATION DE
L'ACIDE LACTOBIONIQUE AVEC LE
CUIVRE(II) ET L'OXOVANADIUM(IV)**

Les carbohydrates sont connus pour être des acides très faibles. La première acidité se situe dans l'intervalle 10^{-14} - 10^{-12} mol.l⁻¹ (55). La caractérisation quantitative des équilibres de coordination des ions des métaux de transition avec les polyalcools et les sucres ne contenant pas d'atomes donneurs, autres que les oxygènes des groupements hydroxyles, aldéhydes ou cétones, est délicate, du fait de la faible stabilité des complexes en solution aqueuse acide ou neutre. Ceci n'est pas dû uniquement à la faible densité électronique des oxygènes donneurs du sucre qui, de ce fait, ne se substituent pas ou peu aux molécules d'eau dans la première sphère de coordination de l'ion métallique. Ces carbohydrates en solution sont en équilibre anomérique et conformationnel. Seuls les isomères qui ont des groupements hydroxyles convenablement positionnés, peuvent interagir spécifiquement avec les ions métalliques.

Les ions métalliques ayant un degré d'oxydation 3 ou 4 présentent une plus grande affinité à l'égard des atomes donneurs que les cations dont la charge est plus faible. En solution aqueuse de pH 2.5, l'ion ferrique forme des complexes stables avec les sucres simples comme le Fructose (56).

Les sucres acides ont une fonction carboxylique qui est complètement déprotonée à pH physiologique (pka \approx 3) en solution aqueuse. Ces ligands sont donc en général des complexants beaucoup plus forts que les sucres.

Des travaux effectués au laboratoire sur les sucres uroïques (11) et les sucres aminés (16,57), ont montré que les premiers sont des ligands peu complexants des ions Cu (II) et

VO (IV). Les sucres aminés sont par contre des agents de coordination efficaces des ions cuivriques.

Pour comprendre le rôle potentiel de l'acide lactobionique en tant qu'agent chélatant des ions métalliques, nous avons réalisé l'étude des systèmes, acide lactobionique-Cu(II) et acide lactobionique-VO(IV), en utilisant pour cela des méthodes spectroscopiques et potentiométriques. La polarographie a permis de déterminer les constantes de formation des complexes cuivriques n'ayant pu être calculées à l'aide des titrations potentiométriques.

A - ETUDE DE LA COMPLEXATION DE L'ACIDE LACTOBIONIQUE PAR LE CUIVRE (II).

I - Intervention de la cinétique d'équilibre.

Durant l'étude de la réaction de coordination de l'ion métallique avec l'acide lactobionique, nous avons observé des baisses de pH en début de titration et après ajouts de base. La coordination du cuivre avec un ligand est, en général, un processus extrêmement rapide. Il faut admettre que la variation du pH dépend d'une réaction chimique impliquant l'acide lactobionique. En effet, nous avons démontré dans le chapitre précédent que ce processus résulte d'une réaction de délactonisation (lactone \rightarrow acide lactobionique) qui a lieu en milieu acide (pH < 6).

En présence de cuivre(II), l'équilibre pourrait être modifié. En effet, en complexant la forme acide, l'ion cuivrique pourrait intervenir en tant que catalyseur et déplacer ainsi l'équilibre vers la formation de l'acide. L'étude cinétique de l'équilibre qui a été effectuée en présence de cuivre(II) montre qu'il n'en est rien.

Figure 20 : pH de la solution ligand-métal en fonction du temps en cours de dosage.

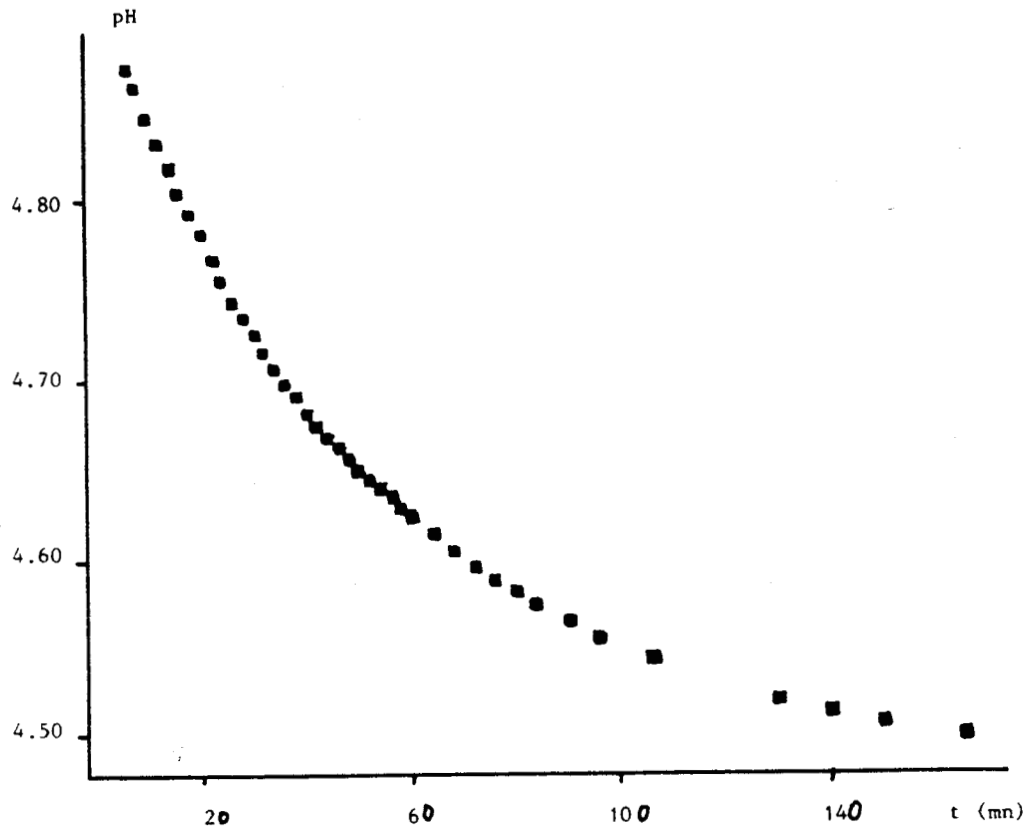


Figure 21 : $\ln \{[LA] - [LA]_{eq}\}$ en fonction du temps immédiatement après hydrolyse pour une solution métal-ligand.

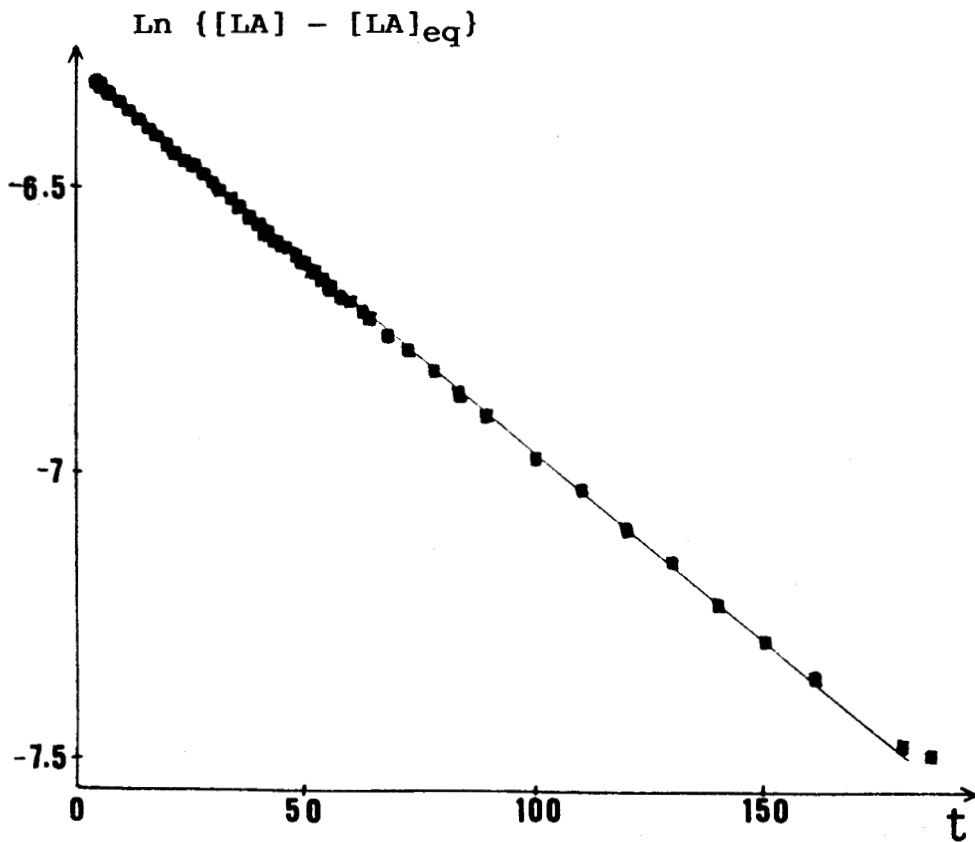
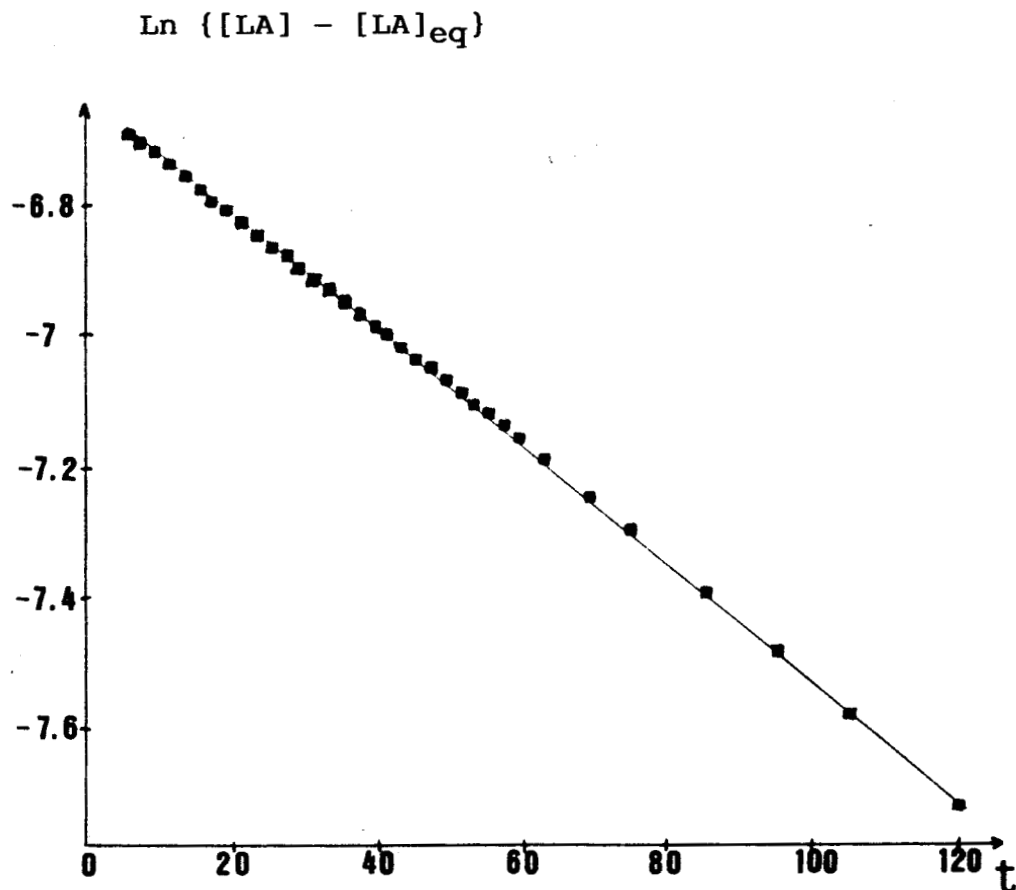


Figure 22 : $\text{Ln} \{[\text{LA}] - [\text{LA}]_{\text{eq}}\}$ en fonction du temps en cours de titration pour une solution métal-ligand



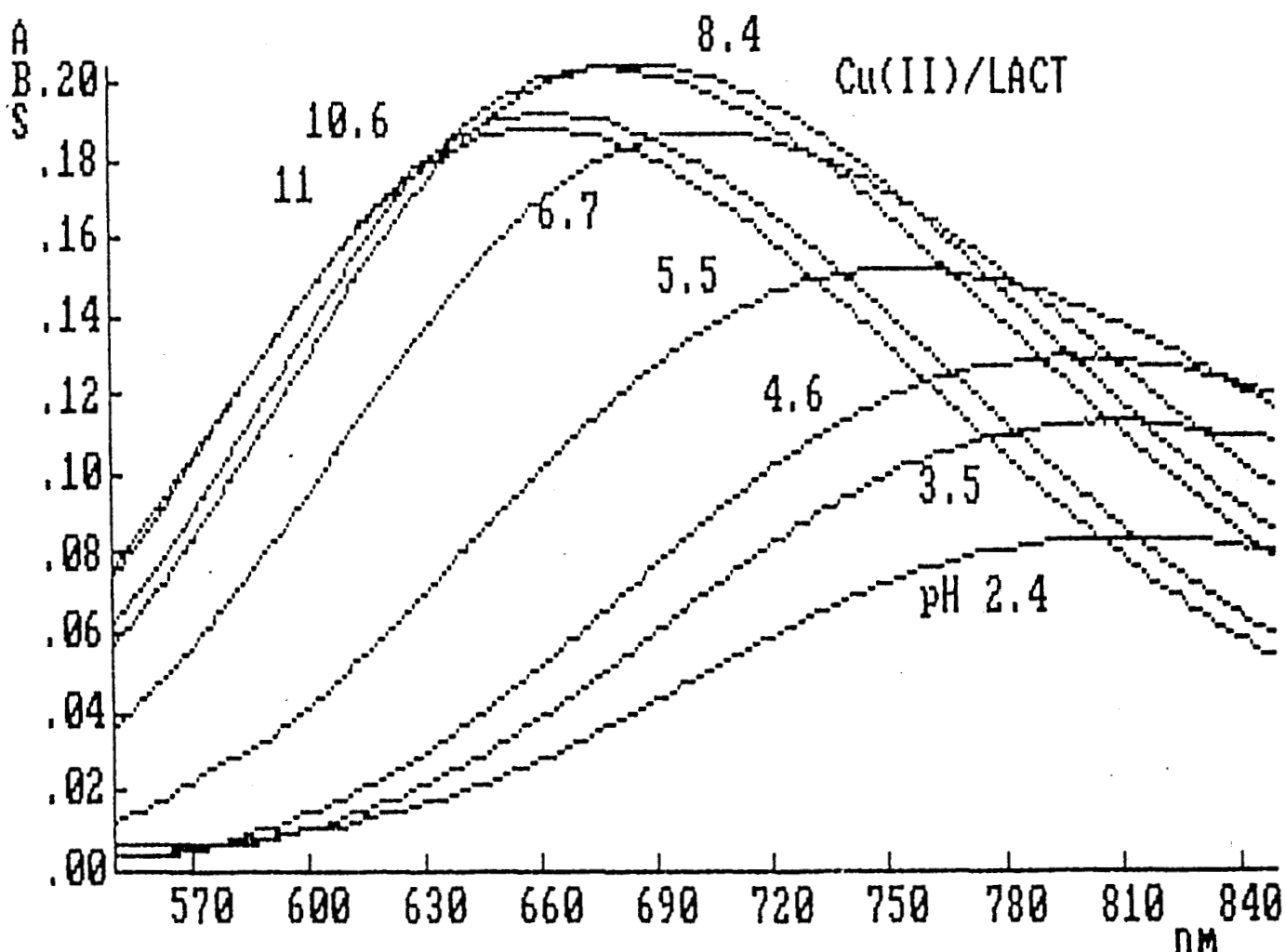
II. Résultats spectroscopiques.

Dans les études spectroscopiques [spectroscopie électronique (U.V-Visible), dichroïsme circulaire (D.C) et résonance paramagnétique électronique (R.P.E)] les rapports Cu(II)/ligands utilisés sont de 1/3 et 1/5 avec une concentration en cuivre de $5 \cdot 10^{-3}$ mole l^{-1} . Pour ces deux rapports les résultats sont très voisins. Les spectres ont été enregistrés après l'établissement de l'équilibre pour chaque pH.

1. Spectroscopie U.V-Visible

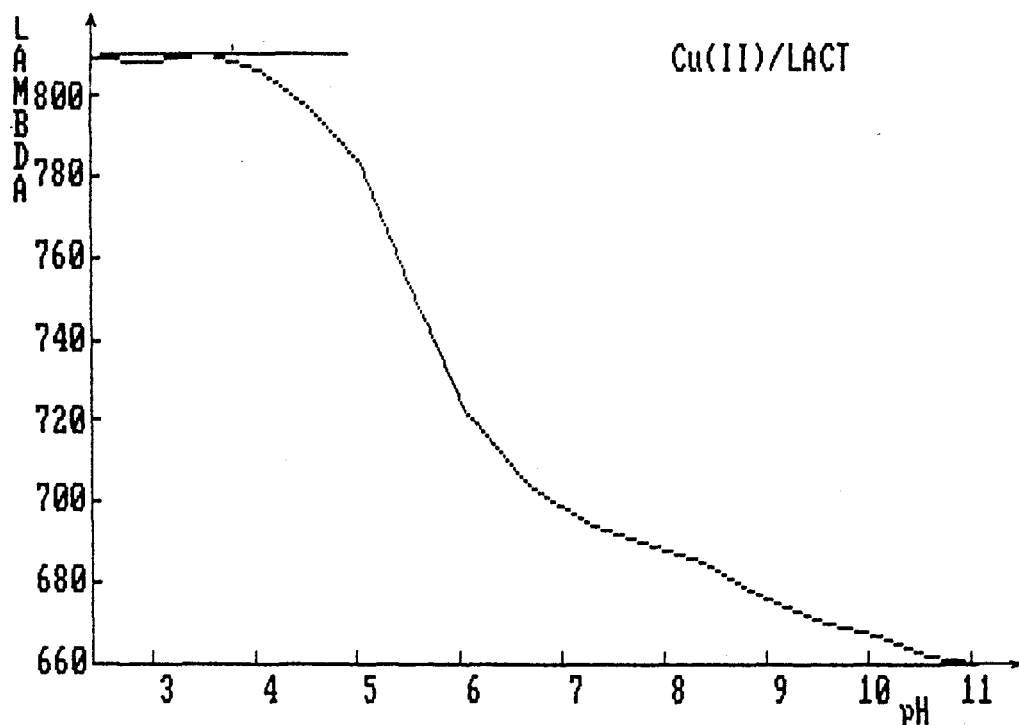
Les spectrogrammes du système acide lactobionique-Cu (II) en solution aqueuse, obtenus à différents pH (fig. 23) montrent la présence de cuivre complexé puisque la longueur d'onde du maximum d'absorption évolue de 830 nm (cuivre solvaté dans l'eau) à 660 nm.

Figure 23 : Spectres U.V du système Cu(II)-acide lactobionique



La courbe λ_{max} en fonction du pH (fig. 24) permet de prévoir l'existence de quatre espèces complexées différentes. En effet, on observe la présence de quatre changements de pentes qui indiquent donc quatre changements dans le mode de coordination du cuivre.

Figure 24 : Evolution de la longueur d'onde du maximum d'absorption en fonction du pH pour le système Cu(II)-acide lactobionique



2. Dichroïsme circulaire

L'évolution des spectres dichroïques en fonction du pH est représentée sur les figures 25 dans la zone des transitions d-d du cuivre, et 26 dans la zone des transitions par transfert de charge. Les spectres obtenus pour des fréquences correspondant à la bande d-d du cuivre s'interprètent sur la base de l'existence de quatre espèces différentes.

- Sur les spectres enregistrés à pH = 2.9 et 4.1, on observe une transition à effet Cotton négatif centrée sur 700 nm.

- Sur celui correspondant à pH = 5.7, il y a apparition de deux transitions dont les effets Cotton sont, l'un négatif, centré sur 777 nm, l'autre positif à 660 nm. Les mêmes effets apparaissent sur les spectres enregistrés à pH = 6.7.

Figure 25 : spectres dichroïques pour le système Cu(II)-acide lactobionique dans la bande d-d du cuivre.

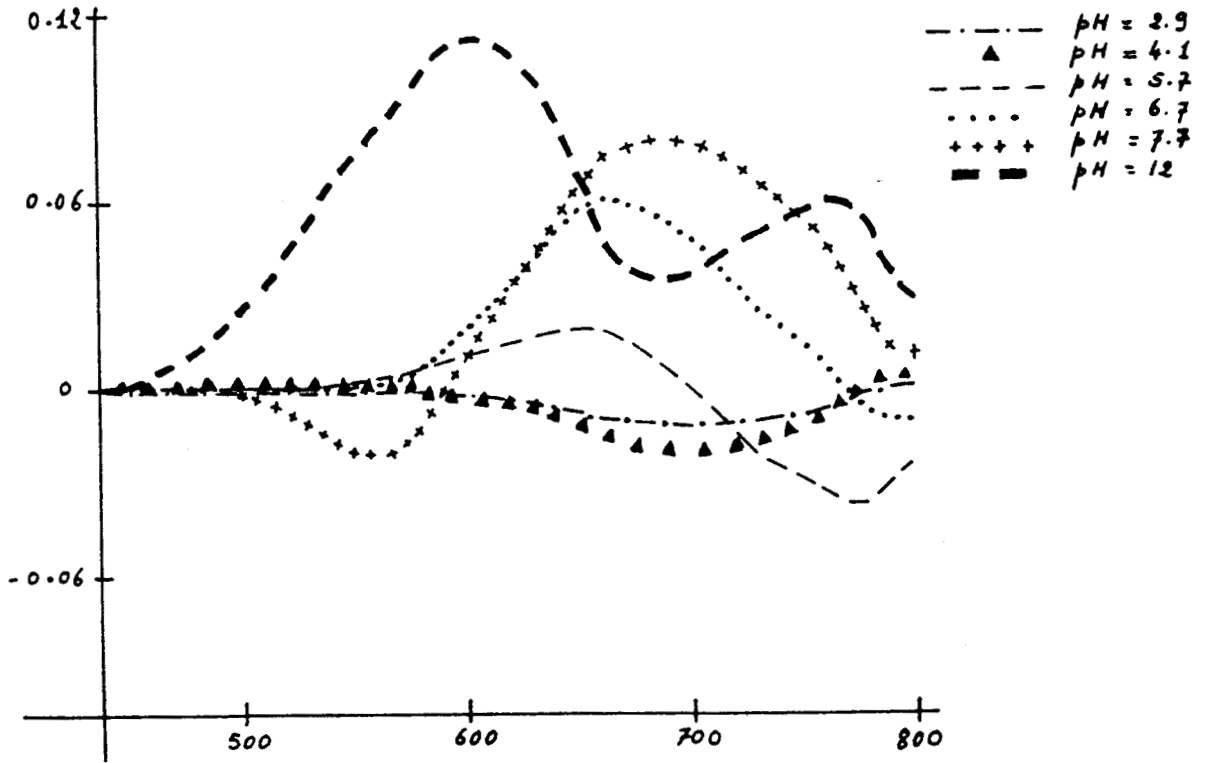
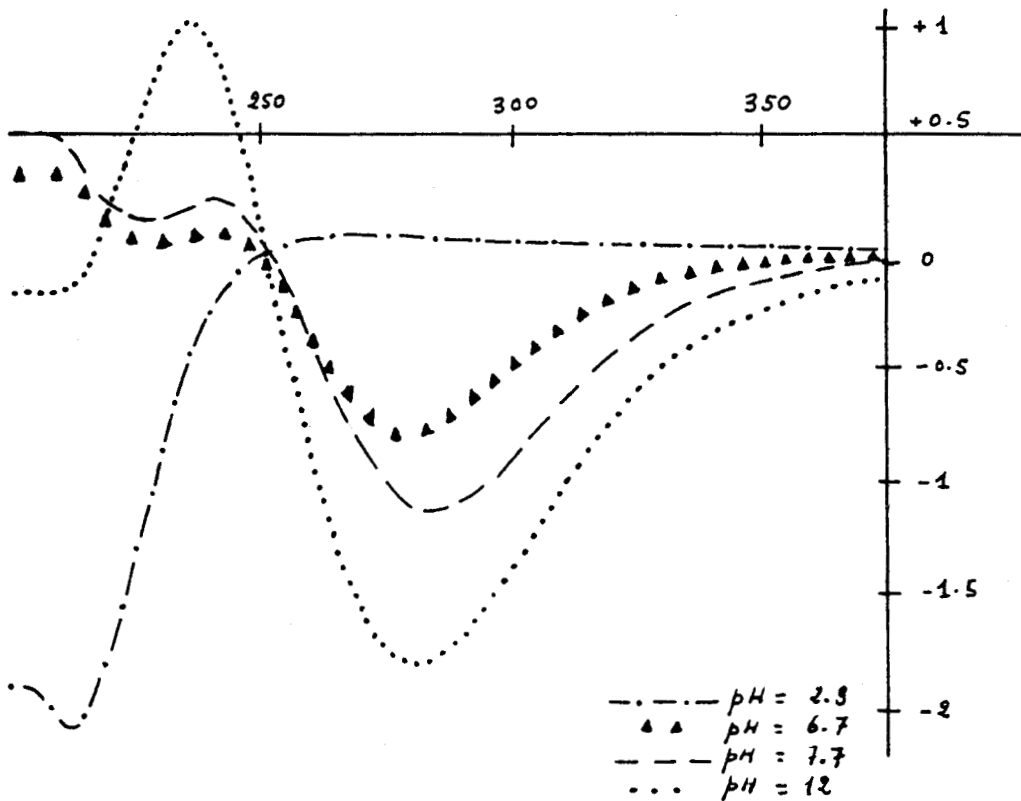


Figure 26 : spectres dichroïques pour le système Cu(II)-acide lactobionique dans la région de transferts de charges.



- le spectre obtenu à pH = 7.7 indique une conformation différente autour du cuivre, se caractérisant par deux effets Cotton, l'un positif à 690 nm, l'autre négatif à 560 nm.

- A pH = 12, on peut observer sur le spectre que les effets Cotton sont tous les deux positifs, l'un centré sur 760 nm et l'autre plus intense à 600 nm.

Dans la zone des transitions de transfert de charge, on constate à partir de pH 6.7 l'apparition d'une bande intense centrée sur 280 nm. Elle pourrait correspondre au transfert de charge du ligand vers le métal (O^- vers Cu).

L'ensemble de ces résultats est regroupé dans le tableau 2 qui donne pour chaque espèce la longueur d'onde λ des transitions et la valeur du $\Delta \epsilon$ correspondante.

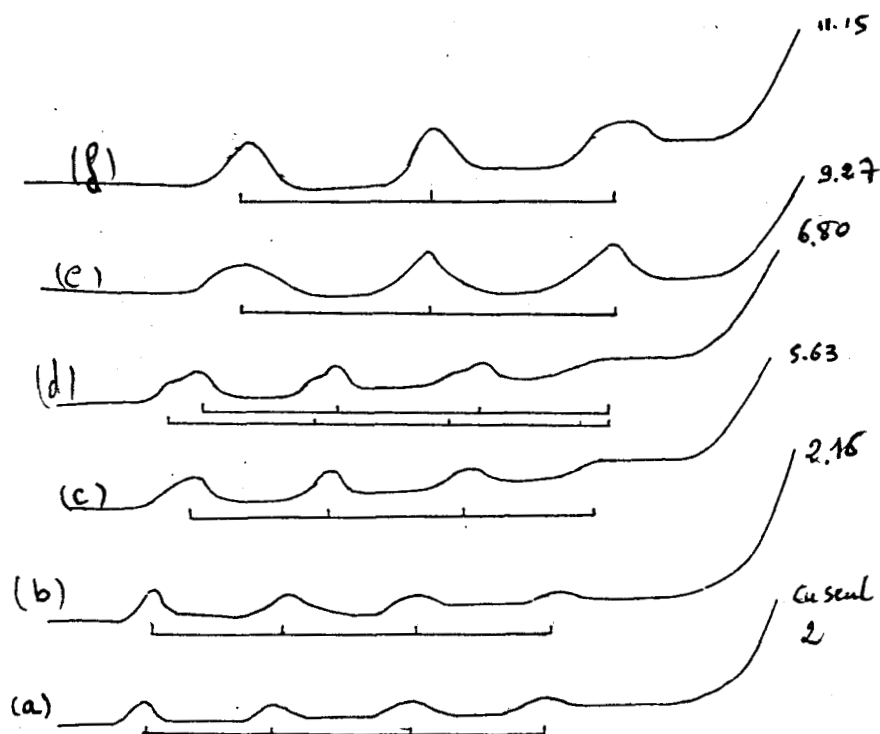
Tableau 2 : Résultats de dichroïsme circulaire du système Cu(II)-acide lactobionique en fonction du pH.

pH	λ nm	$\Delta \epsilon$
2.9	700	- 0.02
5.7	777	- 0.04
	657	+ 0.02
	278	- 0.85
7.7	700	+ 0.08
	560	- 0.02
	284	- 1.15
12	765	+ 0.06
	600	+ 0.11
	280	- 1.80

3. Spectroscopie R.P.E.

Les spectres R.P.E. de l'ion cuivrique enregistrés en fonction du pH sont représentés sur la figure 27.

Figure 27 : Spectres R.P.E. du système
Cu(II)-acide lactobionique



La courbe (a) obtenue pour $\text{pH} = 2$ représente le spectre du Cu(II) hexahydraté non complexé ($A// = 135$ Gauss, $g// = 2.404$). A $\text{pH} 2.16$ (courbe b), apparaissent les transitions d'une espèce I dont les paramètres spectroscopiques sont $A// = 138$ G et $g// = 2.369$. La proximité des valeurs de $A//$ obtenues pour les espèces I et $\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ nous laisse supposer que l'environnement de l'ion cuivrique pour chacune des deux espèces est de "même nature". En effet l'espèce I correspond au Lactobionate ou au dilactobionate de cuivre qui présentent un caractère ionique très marqué. Les liaisons ainsi formées sont de nature électrostatique, donc du même type de liaison qu'avec les molécules de solvant (H_2O). Lorsque le pH augmente (courbe c), le spectre d'une nouvelle espèce (II) apparaît, la valeur de $A//$ est égale à 127 G. Elle est nettement différente de celle de l'espèce I. Ceci laisse penser qu'il y a intervention d'un groupement différent du carboxylate dans la coordination, soit un groupement hydroxyle déprotoné. Sur la courbe (d) le spectre de l'espèce II, est présent en même temps que celui d'une troisième espèce caractérisée par les

paramètres $A// = 158 \text{ G}$ et $g// = 2.290$. A haut pH (f) les paramètres $A// = 184 \text{ G}$ et $g// = 2.283$, que nous avons déterminés, indiquent l'existence d'une espèce différente des précédentes.

III. Etudes potentiométriques

La potentiométrie est une technique qui ne s'avère intéressante que dans le cadre des études de modélisation. En effet, contrairement aux techniques spectroscopiques, l'observation d'une courbe de titration ne donne pas de renseignements sur les espèces présentes dans la solution. Il existe des techniques potentiométriques utilisées en particulier par notre groupe de recherche (F.I.C.S), qui permettent d'évaluer la probabilité d'existence des espèces que l'on propose, sans avoir à réaliser l'affinement global.

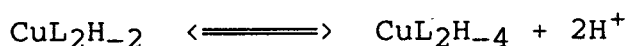
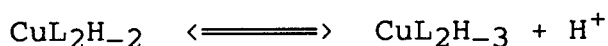
Nous n'avons pas pu utiliser cette technique dont les contraintes expérimentales se sont avérées impossibles à respecter dans nos travaux, du fait de l'existence de l'équilibre lent de délactonisation. Il a fallu mettre en oeuvre un protocole expérimental nouveau qui s'est avéré très limitatif quant au choix des techniques potentiométriques à utiliser. nous l'exposons en détail dans le paragraphe suivant.

Il nous faut proposer des modèles de coordination, à partir des résultats spectroscopiques et vérifier leur validité par simulation.

1. Modèles de coordination possibles

La fonction carboxylate peut être considérée comme site d'ancrage en milieu acide. Il pourrait donc se former dans la zone de $\text{pH} < 5$ les sels CuL et CuL_2 . Les modes de coordination feraient intervenir le groupement COO^- . Lorsque le pH devient supérieur à 5, un complexe se formerait par déprotonation de CuL ou CuL_2 . L'espèce $\text{CuL}_2\text{H}_{-1}$ pourrait faire intervenir le groupement hydroxyle du carbone 2. Le cycle à cinq chaînons

Formé par chélation de l'ion cuivrique avec la fonction acide du sucre et avec l'oxygène du groupement hydroxyle en C₂ (COO⁻, O⁻) serait thermodynamiquement favorisé. L'espèce suivante résulterait de la déprotonation du second ligand (CuL₂H₋₁). CuL₂H₋₂ ainsi formée serait doublement chélatée 2 x (COO⁻, O⁻). Au-delà de pH = 10 apparaît une dernière espèce qui ferait intervenir une ou deux déprotonations, suivant les équilibres



Ceux-ci ne peuvent pas s'expliquer par la déprotonation d'une ou deux molécules d'eau sur la position apicale de l'ion cuivrique. En effet, les paramètres spectroscopiques $g_{//}$ et $A_{//}$ varient de façon importante pour $\text{pH} > 10$, et l'évolution des courbes dichroïques indiquent un mode de coordination différent autour du cuivre. Il faut donc admettre l'intervention d'un second groupement hydroxyle du sucre aux dépend du groupement carboxyle. La liaison Cu-COO⁻ se romprait pour permettre la formation d'une liaison Cu-O⁻, résultant de la déprotonation de l'hydroxyle en C₃. Les cycles formés seraient toujours des cycles à cinq chaînons stabilisants. La dernière espèce serait donc CuL₂H₋₃ [(COO⁻, O⁻), (O⁻, O⁻)] ou CuL₂H₋₄ [2 x (O⁻, O⁻)].

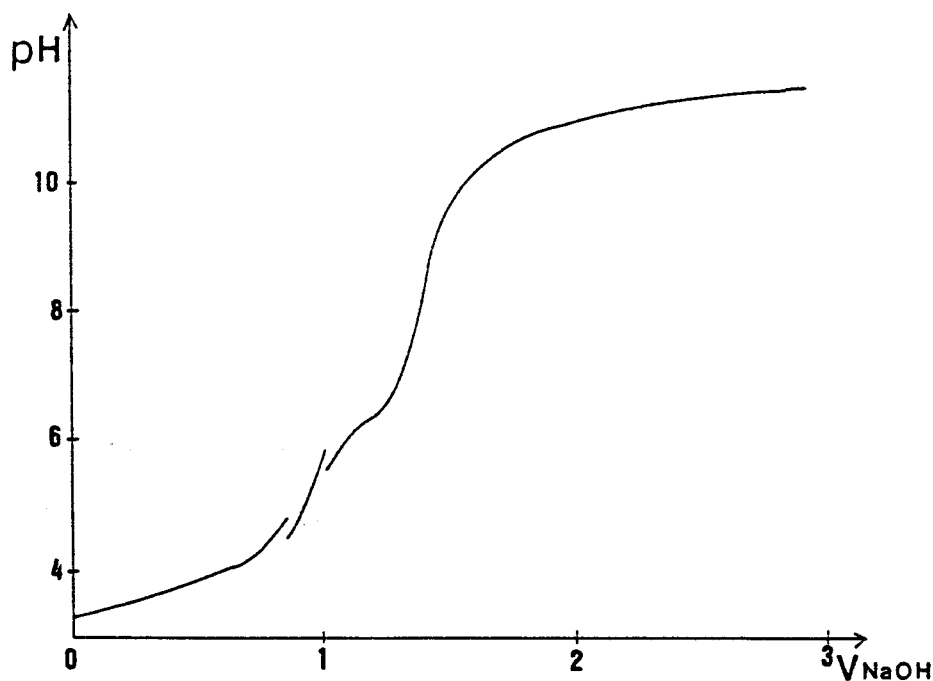
2 - Protocole expérimental.

Les titrations potentiométriques du système Cu(II)-acide lactobionique ont été réalisées de deux manières différentes. Dans la première, nous avons tenu compte de l'équilibre acide lactobionique- δ -lactone en milieu acide. Dans la seconde, nous minimisons l'effet de cet équilibre, en nous plaçant à un pH moins acide et après que l'équilibre se soit établi.

a - méthode séquentielle

La première méthode a consisté en des titrations sur des petits intervalles de pH (3.8 \rightarrow 3.9 ; 3.87 \rightarrow 4.85 ; 4.57 \rightarrow 5.88 ; 5.59 \rightarrow 7.51 et 7.21 \rightarrow 10.5). Ces titrations ont été réalisées sur des temps très courts avec des solutions de pH initialement stables, c'est-à-dire après que l'équilibre lactone-acide lactobionique se soit établi. Le temps d'attente est de plus de trois heures, après mélange des réactants en début de titration potentiométrique, ainsi qu'entre deux titrations consécutives (fig28).

Figure 28 : Neutralisation par parties d'une solution d'acide lactobionique-lactone-Cu²⁺.



Nous avons procédé ainsi en considérant que dans chaque intervalle de pH, l'équilibre ayant été atteint, la concentration en ligand (acide lactobionique), est connue et reste constante sur tout l'intervalle. Cette approximation est réaliste puisque les équilibres de déprotonation et de coordination du ligand par l'ion cuivrique sont des processus

quasi instantanés. Les titrations ont été effectuées rapidement pour minimiser l'impact de l'hydrolyse de la lactone en acide lactobionique. L'augmentation de la concentration en ligand intervenant dans la coordination avec le métal peut de la sorte être négligée. La concentration en ligand a été recalculée pour chaque pH initial en utilisant les paramètres cinétiques obtenus dans le chapitre III.

Les valeurs obtenues données en mole.l^{-1} sont :

$$1.805 \cdot 10^{-3} \text{ à pH} = 3.3$$

$$1.887 \cdot 10^{-3} \text{ à pH} = 3.87$$

$$1.95 \cdot 10^{-3} \text{ à pH} = 4.57$$

$$1.973 \cdot 10^{-3} \text{ à pH} = 5.59$$

pour une quantité totale de ligand pesée et solubilisée équivalente à $1.976 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$. La forme lactone n'intervenant pas dans la complexation représente donc, par rapport à la quantité totale du ligand dissoute :

$$8.65 \% \text{ à pH } 3.3.$$

$$4.5 \% \text{ à pH } 3.87$$

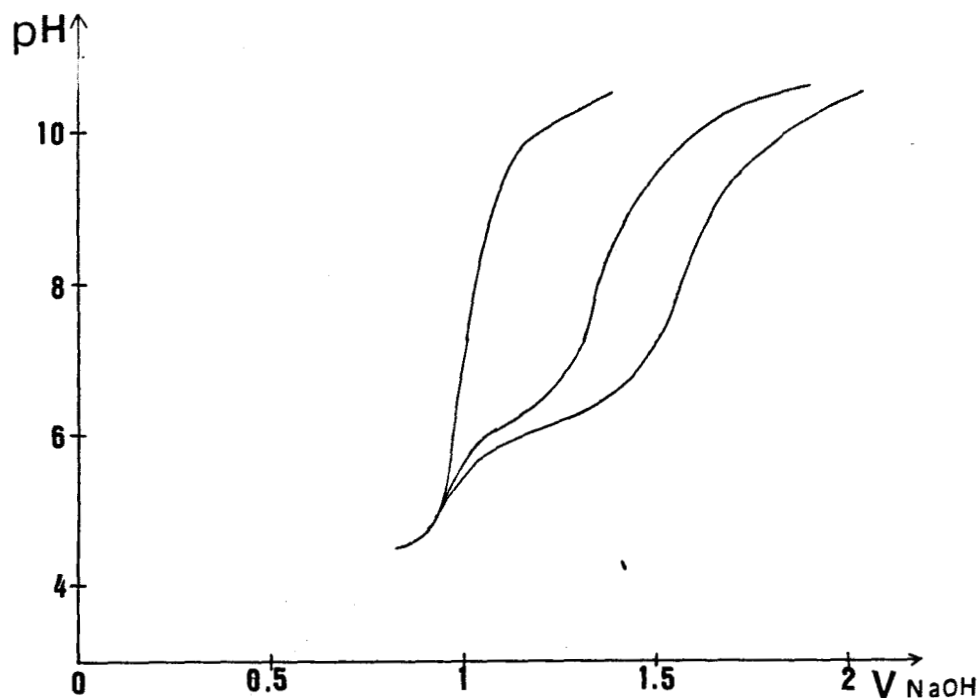
$$1.32 \% \text{ à pH } 4.57$$

$$0.25 \% \text{ à pH } 5.59$$

b - Méthode directe

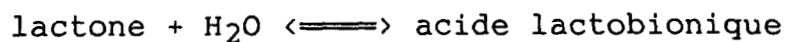
La seconde méthode a consisté en des titrations en continu à partir de $\text{pH} \approx 4.5$ jusque $\text{pH} \approx 12$ de manière rapide. c'est la méthode classique utilisée pour étudier la coordination d'un ion métallique avec un ligand. La concentration de la forme acide du ligand, dans ce cas, est recalculée pour $\text{pH} = 4.5$. La forme lactone ne représente à ce pH que 1.3 % de la quantité totale dissoute. On constate, en opérant de cette manière, que le pH de la solution reste stable au cours de la titration (fig29).

Figure 29 : Titrations directes à partir de pH = 4.5.



3 - Résultats

Dans la zone de pH étudiée, le sucre acide se déprotone une seule fois. Il est considéré comme un ligand LH. La valeur du pKa déterminée par le programme SUPERQUAD, $pK_a = 3.53$, est identique à celle obtenue par la méthode du simplex utilisée pour calculer la constante d'équilibre de la réaction :



Les données expérimentales (fig. 28 ; 29) exploitées à l'aide du programme SUPERQUAD pour les deux méthodes décrites concourent à valider le même modèle.

Tableau 3 : Constantes de formation ($\log\beta$) des complexes du Cu(II) avec l'acide lactobionique.

ESPECES	$\log\beta$ méthode 1	$\log\beta$ méthode 2
0 1 1	3.531(0.001) ⁽¹⁾	3.53
1 1 0		3.10 ^(a)
1 2 0	5.33(035) ⁽¹⁾	5.90 ^(a)
1 2 -1	-0.61(0.08) ⁽¹⁾	-0.43(0.11) ⁽¹⁾
1 2 -2	-7.28(0.06) ⁽¹⁾	-7.05(0.08) ⁽¹⁾
1 2 -4	-27.51(0.12) ⁽¹⁾	-27.06(0.13) ⁽¹⁾

(a) : valeurs polarographiques

(1) : déviations standards

Ce modèle inclue les espèces $\text{CuL}_2\text{H}_{-1}$, $\text{CuL}_2\text{H}_{-2}$ et $\text{CuL}_2\text{H}_{-4}$. Les résultats pour les deux méthodes sont regroupés dans le tableau 3. Les déviations standards indiquées ont été calculées par SUPERQUAD. La première méthode (titrations par parties après attente de trois heures) a permis de calculer la constante de formation du dilactobionate (CuL_2), $\log_e \beta = 5.33$. Les titrations ayant débuté vers pH 3 (milieu suffisamment acide), il nous a été possible de déterminer la constante de formation présente dans l'intervalle de pH inférieur à 5. Le fait que l'on ne puisse pas obtenir la valeur de la constante de formation du lactobionate de cuivre par potentiométrie ne signifie pas que cette espèce n'existe pas en solution. En effet, le programme ne distingue pas deux espèces lorsqu'elles sont majoritaires sur le même intervalle de pH. Une étude polarographique du système Cu(II) acide lactobionique effectuée à $\text{pH} < 5$ confirme la formation de deux sels. Les résultats polarographiques sont exploités par la méthode FORD-HUME (60). Les constantes de formations calculées par polarographie sont $\log_e \beta = 3.10$ pour l'espèce CuL (1 1 0) et $\log_e \beta = 5.90$ pour l'espèce CuL_2 (1 2 0).

Les premières études de modélisation ont abouti à deux possibilités de coordination, l'une prenant en compte la série

d'espèces ($\text{CuL}_2\text{H}_{-1}$; $\text{CuL}_2\text{H}_{-2}$ et $\text{CuL}_2\text{H}_{-4}$), la seconde acceptant l'espèce $\text{CuL}_2\text{H}_{-3}$ à la place de $\text{CuL}_2\text{H}_{-4}$ et ceci avec des erreurs tout-à-fait comparables (tableau 4).

Tableau 4 : Constantes de formation des complexes cuivriques de l'acide lactobionique.

ESPECES	$\log\beta$
0 1 1	3.53
1 1 0	3.1(a)
1 2 0	5.9(a)
1 2 -1	-0.12(0.09)(1)
1 2 -2	-6.28(0.08)(1)
1 2 -3	-15.47(0.11)(1)

(a) : valeur polarographique

(1) : déviation standard

La courbe de distribution des complexes cuivriques de l'acide lactobionique en fonction du pH est représentée sur la figure 30 pour le modèle incluant la série d'espèces (CuL , CuL_2 , $\text{CuL}_2\text{H}_{-2}$, $\text{CuL}_2\text{H}_{-4}$).

La courbe de distribution des espèces en fonction du pH dans le cas du modèle prenant en compte le complexe $\text{CuL}_2\text{H}_{-3}$ à la place de $\text{CuL}_2\text{H}_{-4}$ est représentée sur la figure 31. Seuls les résultats de la seconde méthode (titrations directes) ont été utilisés. Les résultats figurent dans le tableau 4.

4. Choix du modèle de coordination

Une étude approfondie des spectres R.P.E. et dichroïques du système Cu(II) -acide lactobionique en fonction du pH, a permis de choisir entre ces deux modèles. En observant les courbes de distribution des espèces (fig. 30 ; 31).

On peut remarquer que la formation du complexe CuL_2H_3 aurait lieu à un pH inférieur d'une unité à celle de l'espèce CuL_2H_4 . Les résultats R.P.E font apparaître la dernière espèce, de paramètres $g// = 2.283$ et $A// = 184 \text{ G}$ à partir de pH 10, l'espèce précédente étant toujours présente à ce pH. Ceci n'est pas en accord avec la distribution des espèces (fig. 31) qui montre qu'à ce pH, le complexe CuL_2H_3 est majoritaire ($\approx 90 \%$). Les mesures de dichroïsme circulaire s'interprètent également en faveur du modèle incluant l'espèce CuL_2H_4 . En comparant les courbes de distribution des deux modèles, on observe que l'espèce CuL_2H_2 est majoritaire ($\approx 100 \%$) sur le même intervalle de pH (7 \rightarrow 9) dans les deux cas. L'espèce CuL_2H_3 commence à apparaître à pH ≈ 7.5 pour se retrouver majoritaire dès pH = 10 ($\approx 90 \%$). L'espèce CuL_2H_4 quant à elle, commence à se former à pH ≈ 9 (fig. 30) mais n'est réellement isolée qu'aux pH supérieurs à 11 (disparition de l'espèce CuL_2H_2). Les spectres de dichroïsme circulaire montrent que la dernière espèce CuL_2H_4 ou CuL_2H_3 commence à apparaître vers pH ≈ 10 pour ne subsister seule qu'à partir de pH = 12 où apparaissent clairement deux effets Cotton positifs ($\lambda = 765 \text{ nm} \rightarrow \epsilon = + 0.06$) et ($\lambda = 600 \text{ nm} \rightarrow \epsilon = + 0.11$). Le spectre obtenu à pH = 10.5 (fig. 32) peut être considéré comme étant celui de la dernière espèce perturbé par le spectre de l'espèce présente à pH ≈ 8 . On observe clairement l'existence d'un épaulement vers $\lambda \approx 760 \text{ nm}$. Ces arguments plaident en faveur du modèle impliquant le complexe CuL_2H_4 .

Un dernier argument nous est fourni par les paramètres R.P.E. caractérisant la dernière espèce. Ils sont exactement les mêmes que ceux obtenus avec les complexes cuivriques de l'acide galacturonique (11) pour l'espèce ayant le mode de liaison $2(\text{O}^-, \text{O}^-)$ comparable au complexe CuL_2H_4 de l'acide lactobionique.

figure 32 : Spectres dichroïques du système Cu(II)-acide lactobionique obtenus à haut pH.

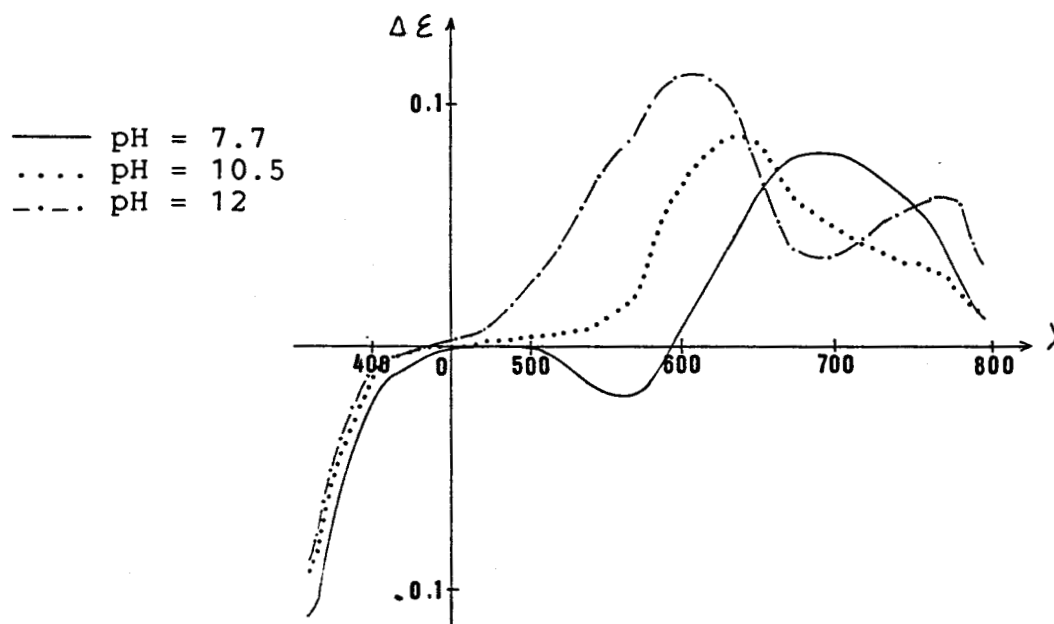


Tableau 5 : Tableau récapitulatif des résultats spectroscopiques des complexes Cu(II)-acide lactobionique

ESPECES			SPECTRES DC		R.P.E.	
Cu	L	H	λ nm	($\Delta \epsilon$)	g//	A// GAUSS
1	2	0	700	(-0.02)a	1.369	138
1	2	-1	777	(-0.04)b	2.370	127
			657	(+0.02)c		
			278	(-0.85)d		
1	2	-2	700	(+0.08)b	2.290	158
			560	(-0.02)c		
			284	(-1.15)d		
1	2	-4	765	(+0.06)b	2.283	184
			600	(+0.11)c		
			280	(-1.80)d		

a : B + E transition (d-d)

b : B transition (d-d)

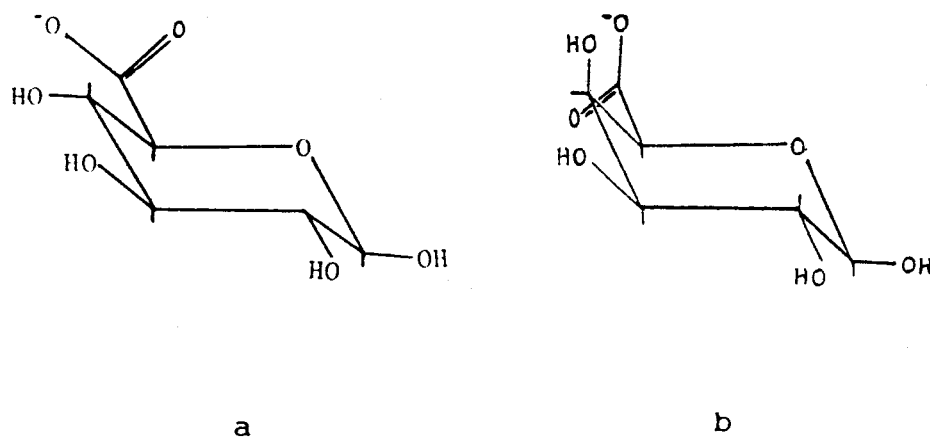
c : E transition (d-d)

d : transition de transfert de charge $O^- \rightarrow Cu(II)$

IV. DISCUSSION

La constante d'acidité de l'acide lactobionique est légèrement supérieure à celle trouvée par K. Burger et coll. ($pK_a = 3.37$) (58), lors d'une étude sur la coordination du Mn(II) et du Mn(IV) en milieu alcalin. Signalons que Burger ne tient pas compte de l'équilibre lent entre le ligand et sa lactone. On attribue cette constante de dissociation à l'équilibre de déprotonation du groupement carboxylique. Les valeurs des constantes de dissociation des groupements alcool ($pK_a \approx 12.5$) ne peuvent être obtenues avec précision par potentiométrie en raison du manque de fiabilité de la réponse des électrodes de verre en milieu très basique. On peut comparer la constante d'acidité de l'acide lactobionique à celle d'autres sucres acides tels que les sucres uroniques : 3.06 pour l'acide glucuronique et 3.28 pour le galacturonique (11). La différence peut s'expliquer par le fait que dans les sucres uroniques, la fonction carboxylique est fixée sur le cycle (en position C₅) (fig. 33), tandis que dans l'acide lactobionique elle se trouve en bout de chaîne.

Figure 33 : Représentation moléculaire des acides D-glucuronique (a) et D-galacturonique (b).



Les degrés de liberté des groupements hydroxyles dans l'acide lactobionique leur permet d'accéder plus facilement à l'environnement du groupement carboxylique. ceci se traduit par une stabilisation du proton plus importante que dans le cas des sucres uroniques, et par conséquent une constante d'acidité plus faible (pKa plus élevé).

La stabilité des complexes CuL et CuL_2 peut être évaluée à partir des résultats polarographiques, avec une précision plus grande que celle obtenue par potentiométrie, dans le cas où la concentration de ces espèces est faible (11, 61, 62) ou, comme dans notre cas, lorsque la gamme de pH est très étroite. La constante de stabilité de l'espèce CuL_2 a été déterminée par potentiométrie selon la première méthode. La valeur obtenue est proche de celle déterminée par polarographie. Les résultats spectroscopiques ainsi que les attributions des paramètres aux différents complexes, sont présentés dans le tableau 5. Les résultats de dichroïsme circulaire indiquent que l'apparition de la liaison entre l'ion cuivrique et le groupement hydroxyle déprotoné du ligand (formation des espèces $\text{CuL}_2\text{H}_{-1}$ et $\text{CuL}_2\text{H}_{-2}$) induit une transition de transfert de charge aux environs de 280 nm. Les transitions énergétiques à ces fréquences sont caractéristiques de la bande de transfert de charge de l'azote d'un groupement aminé vers le Cu(II) (63, 64). Les complexes cuivriques des acides aminés se caractérisent par la présence de plusieurs transitions dans ce domaine de longueur d'onde (59). Les résultats montrent clairement que la bande à 280 nm peut être attribuée à la transition de transfert de charge de O^- vers Cu(II) . Elle indique la formation d'une liaison métal-sucré faisant participer l'oxygène d'une fonction hydroxyle déprotonée. Les transitions correspondantes ($\text{NH}_2 \longrightarrow \text{Cu(II)}$) des carbohydrates aminés sont centrées à une énergie distinctement plus faible (320-300 nm) (59, 66). Les bandes de transfert de charge centrées à 300 nm observées lors de l'étude du système $\text{Cu(II)}-\text{D}$ glucosamine (59) sont relativement larges et présentent un épaulement nettement visible vers 280 nm. La dernière transition peut être attribuée, sans risque d'erreur, à la transition de transfert de charge du ligand(O^-) vers le Cu(II) . Les

paramètres R.P.E sont riches d'enseignement quant à l'intervention particulière des ligands donneurs dans la liaison avec l'ion métallique. La valeur de $A//$ pour l'espèce $1\ 2\ -\ 1$ (CuL_2H_{-1}) est très faible comparée à celle obtenue pour le complexe $1\ 2\ 0$ (CuL_2). Cela implique une distorsion considérable du plan de la molécule complexe. Une des molécules de ligand dans le complexe CuL_2H_{-1} est liée deux fois (COO^-, O^-), l'autre une seule fois par l'intermédiaire du carboxylate. Dans ce cas, l'interaction stérique entre les deux molécules de ligand est nécessaire pour stabiliser le complexe métallique. Ceci peut être réalisé uniquement par l'intervention d'un autre donneur protoné de la molécule monodentée pour amener la molécule volumineuse d'acide lactobionique au niveau de l'ion métallique.

L'ensemble des complexes obtenus, ainsi que leurs modes de coordination, sont identiques à ceux trouvés pour le système Cu(II)-acide galacturonique (11). Cette similitude était prévisible, puisque les deux ligands ont le même type de donneurs ; une fonction carboxylique et des groupements hydroxyles ayant une basicité similaire. cependant les constantes de stabilité obtenues pour les complexes cuivriques de ces deux ligands sont considérablement différents (tableau 6) malgré les mêmes conditions de travail et le même programme de calcul utilisé. Pour le système Cu(II)-Acide lactobionique, ces constantes sont beaucoup plus importantes que celles des complexes correspondants de l'acide galacturonique. Dans le second cas, les titrations ont été réalisées pour un très large excès de ligand (30 fois) par rapport au métal pour éviter de faire précipiter le cuivre, alors qu'avec l'acide lactobionique le rapport 3 ou un rapport plus faible peut être utilisé pour effectuer la titration.

Tableau 6 : Constantes de formation des espèces ($\log\beta$) pour les systèmes Cu(II)-acide lactobionique et Cu(II)-acide galacturonique.

ESPECES			$\log_e \beta$	
Cu	L	H	Cu(II)-LAC	Cu(II)-GAL
0	0	1	3.53	3.28
1	1	0	3.1	1.80
1	2	0	5.9	3.00
1	2	-1	-0.43	-3.02
1	2	-2	-7.05	-10.06
1	2	-3	-27.06	-29.69

Une des raisons de la plus grande stabilité des complexes de l'acide lactobionique pourrait être sa grande flexibilité par rapport à la structure cyclique (fig. 33) de l'acide galacturonique. La mobilité de la chaîne permet la déprotonation stériquement plus facile des groupements hydroxyles et apportent ainsi une influence stabilisante aux espèces formées.

Cette interaction permet de stabiliser CuL (1 1 0), elle est plus stable de 1.2 unité de \log_e que le complexe correspondant dans les sucres uroniques. Les interaction entre ligands, par l'intermédiaire des groupements hydroxyles, sont aussi probables. Ce phénomène a aussi été observé dans le cas de l'espèce CuL₂ où chaque coordinat monodenté par l'intermédiaire du carboxylate, intervient par ses groupements hydroxyles pour stabiliser le complexe. Le dilactobionate de cuivre est ainsi 100 fois plus stable que le digalacturonate. Dans chaque cas les valeurs des pKa des groupes carboxyliques sont très proches.

La participation des groupements hydroxyles protonés dans la stabilisation des complexes métalliques des sucres a déjà été suggérée pour les systèmes Cu(II)-Sucres Aminés(66). L'effet de stabilisation est néanmoins, dans ce cas, beaucoup

moins fort que dans le cas des complexes cuivriques de l'acide lactobionique. Cette stabilisation plus importante des complexes cuivriques de l'acide lactobionique dérive probablement des effets conjugués de plus d'un groupement hydroxyle participant à la stabilisation de la structure complexe. Ceci peut s'expliquer par la flexibilité du ligand qui constitue un chélatant beaucoup plus efficace que les acides uroniques rigides par leur forme cyclique.

B. ETUDE DE LA COORDINATION DE L'OXOVANADIUM (IV) AVEC L'ACIDE LACTOBIONIQUE

L'ion vanadyle présente la particularité de n'avoir qu'une seule position apicale disponible. Il donne des spectres R.P.E intenses et caractéristiques.

Les sucres Acides sont des agents chélatants très efficaces vis-à-vis du Vanadium (IV) (11). Le groupe carboxylique agit souvent comme un site de liaison ou d'ancrage, mais le rôle principal dans la coordination avec l'ion métallique doit être joué par les oxygènes des groupements hydroxyles comme dans le cas du système Cuivre (II)- Acide lactobionique.

Bien que les sucres acides réduisent le Vanadate (V) (67, 59) en oxovanadium (IV), leurs complexes avec ce dernier n'ont été que rarement étudiés (10, 11, 68). En raison de la similitude de structure des ions Cu(II) et VO(IV), nous pouvons attendre une complexation identique pour les systèmes Cu(II)-acide lactobionique et Vo(IV)-acide lactobionique. L'étude bibliographique permet de prévoir une plus grande stabilité des complexes du Vanadium (IV) avec les sucres acides. Il a été montré en effet, une plus grande affinité de l'oxyde de Vanadium pour former des liaisons VO(IV) - O⁻ (10, 59, 65, 69).

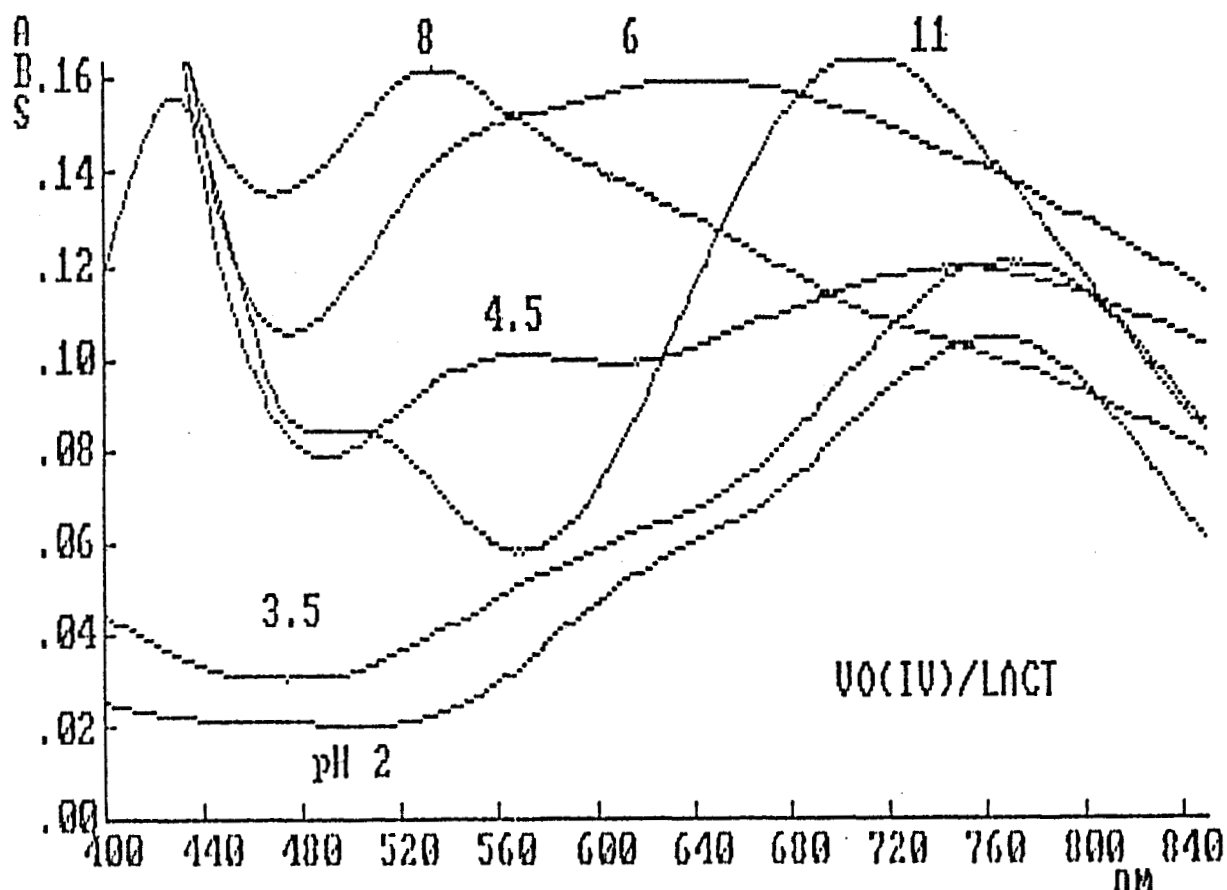
I - Résultats spectroscopiques

Les études du système VO(IV)-acide lactobionique par spectroscopie électronique et dichroïsme circulaire ont été réalisées avec une concentration de $2 \cdot 10^{-3}$ mole.l⁻¹ en Vanadium (IV) et des rapports métal-ligand de 1/3 et 1/5.

1 - Spectroscopie U.V. Visible.

L'énergie des bandes de transition du Vanadium varie en fonction du pH (fig. 34).

Figure 34 : Spectres U.V. du système VO(IV)-acide lactobionique en fonction du pH.



Il est à noter que le nombre de bandes d'absorption augmente lorsque l'on passe des complexes $\text{VO}(\text{H}_2\text{O})_5^{2+}$ et VOL_2 aux complexes $\text{VOL}_2\text{H}_{-2}$, $\text{VOL}_2\text{H}_{-3}$ et $\text{VOL}_2\text{H}_{-4}$. La symétrie de l'ion VO^{2+} se trouve donc diminuée. Les complexes $\text{VOL}_2\text{H}_{-2}$, $\text{VOL}_2\text{H}_{-3}$ et $\text{VOL}_2\text{H}_{-4}$ appartiennent au groupe de symétrie C_{2v} ou C_{2h} .

2 - Dichroïsme circulaire

Le dépouillement des spectres dichroïques dans la région des transitions d-d du Vanadium (IV) (fig. 35) permet de prévoir l'existence de cinq espèces. Ainsi, la transition d'effet Cotton positif située vers 730 nm à pH = 3.3, s'inverse à pH 4.5. Il apparaît de plus une transition à effet négatif

vers 560 nm à ce pH. A pH = 6.2, l'effet Cotton à 730 nm redevient positif et indique la présence de la troisième espèce. Le spectre obtenu pour pH = 7.8 diffère de celui obtenu pour pH = 6.2 par la large bande d'effet Cotton négatif présente entre 700 et 780 nm. A pH = 8.7 le spectre doit correspondre au mélange de deux espèces, celle existant à pH = 7.8 à laquelle se superpose une nouvelle espèce, dont la longueur d'onde et l'absorption $\Delta\epsilon$ peuvent être déterminées sur le spectre obtenu à pH = 10.6.

Figure 35 : spectres dichroïques du système VO(IV)-acide lactobionique en fonction du pH.

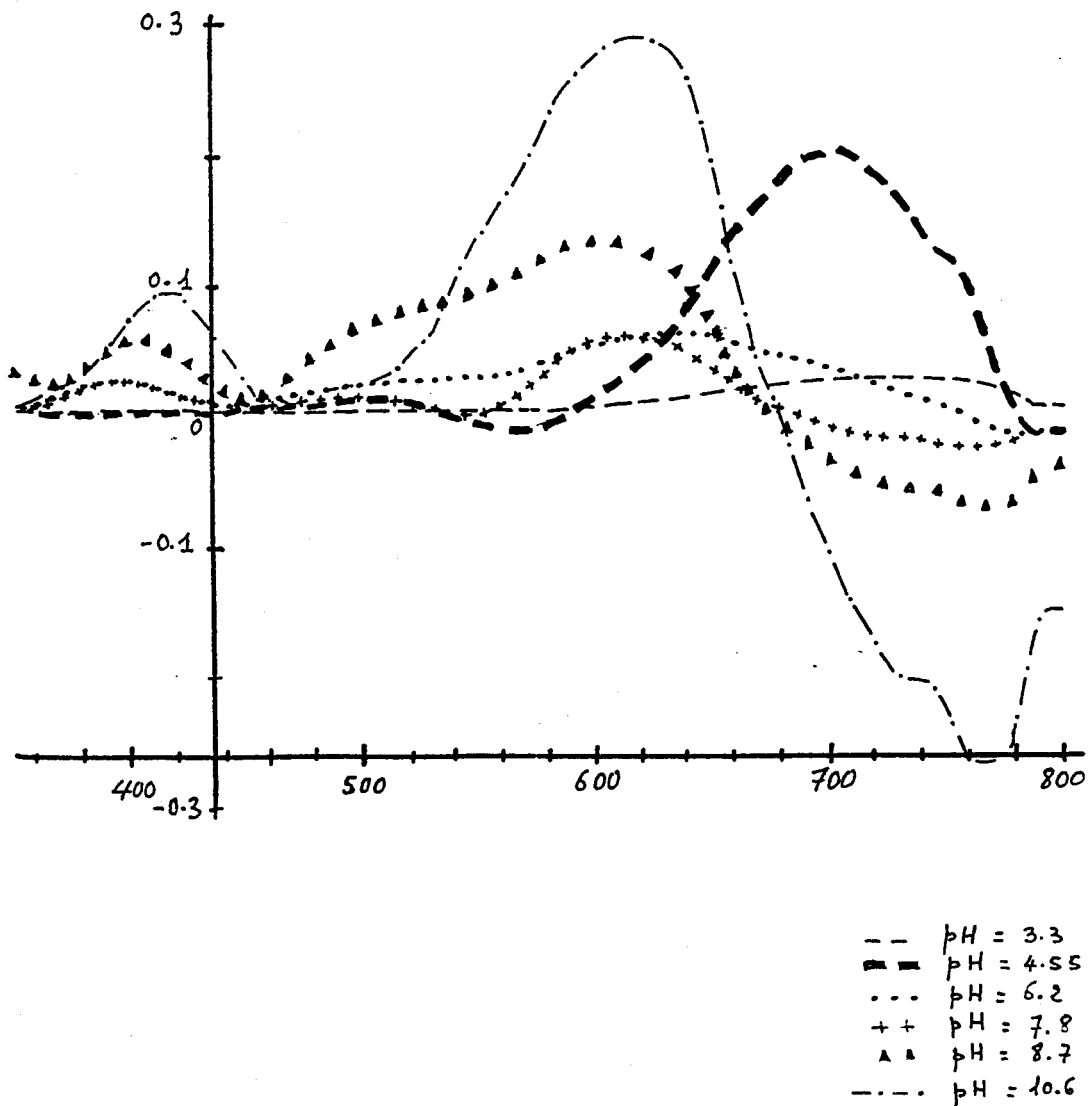


Tableau 7 : Résultats de dichroïsme circulaire pour le système VO(IV)-Acide lactobionique.

PH	λ nm	$\Delta \epsilon$
3.3	730	+ 0.022
4.55	530	+ 0.012
	765	- 0.014
	700	+ 0.200
6.2	400	+ 0.025
	520	+ 0.025
	640	+ 0.064
	780	- 0.014
8.7	400	+ 0.028
	560	+ 0.014
	610	+ 0.063
	780	- 0.023
10.6	416	+ 0.100
	615	+ 0.287
	737	- 0.200
	765	- 0.265

3 - Spectroscopie R.P.E.

En général, la variation des valeurs des paramètres spectroscopiques A et g met en évidence l'évolution de l'environnement de l'ion métallique mais ne renseigne pas sur la nature des liaisons et donc sur les espèces présentes. Dans le cas de l'ion Vanadyl(IV), il est possible de déterminer de manière théorique A// et g// pour une espèce donnée, connaissant la nature et le nombre de liaisons impliquées dans le complexe.

a - Calcul théorique des paramètres spectroscopiques R.P.E.

Les paramètres spectroscopiques A// et g// sont calculés à l'aide des équations (37) :

$$A_{\text{cal}} = \sum_i \frac{n_i A_i}{4} \quad (1)$$

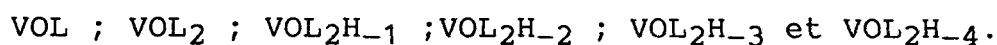
$$g_{\text{cal}} = \sum_i \frac{n_i g_i}{4} \quad (2)$$

dans lesquelles n_i est le nombre de groupements de coordination et A_i et g_i leurs paramètres spectroscopiques spécifiques. Ces derniers sont regroupés dans le tableau suivant :

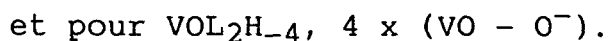
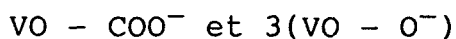
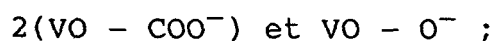
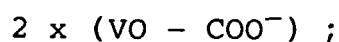
Tableau 8 : Paramètres spectroscopique R.P.E. théoriques dans les complexes VO_4 .

Groupement donneur (L)	$g//$	$A//$ (10^{-4} cm^{-1})
H_2O	1.964	106.3
$R - COO^-$	1.967	97.7
$R - O^-$	1.979	68.7

Lors du calcul, il faut considérer une structure octaédrique pour l'ion VO^{2+} . Les deux positions apicales sont réservées, l'une à la double liaison avec l'atome d'oxygène, l'autre à une molécule d'eau. Les groupements de coordination des ligands occupent les quatre positions équatoriales en formant un plan carré autour de l'ion métallique. Dans le cas de l'acide lactobionique, les groupements pouvant assurer une liaison avec l'ion métallique sont les fonctions carboxyle et hydroxyle. En utilisant les données bibliographiques (11) et les résultats obtenus avec le Cuivre, nous pouvons proposer le modèle suivant pour le système $VO(IV)$ -acide lactobionique :



Les modes de coordination en position équatoriale sont :



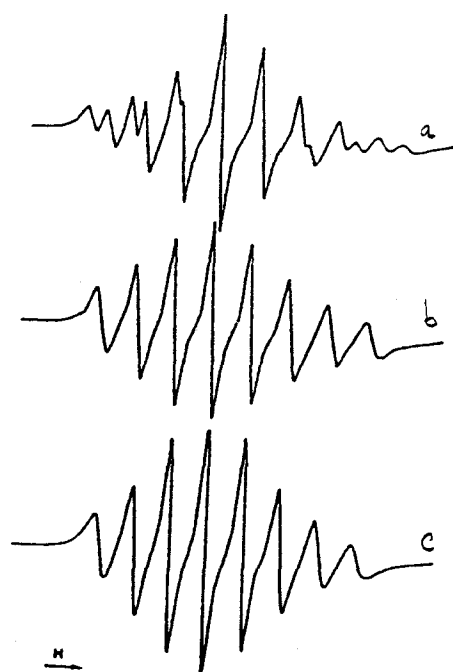
Les positions non liées aux groupements du ligand sont occupées par des molécules d'eau. Les valeurs de paramètres spectroscopiques de ces espèces calculées à l'aide des équations (1) et (2) figurent dans le tableau 9 :

tableau 9 : Paramètres R.P.E. calculés des complexes $M_pL_qH_r$ pour le système VO(IV)-acide lactobionique.

espèce	$g//\text{cal}$	$A//\text{cal}(10^{-4}\text{ cm}^1)$
VOL	1.965	104
VOL ₂	1.966	102
VOL ₂ H ₋₁	1.969	93
VOL ₂ H ₋₂	1.973	83
VOL ₂ H ₋₃	1.976	76
VOL ₂ H ₋₄	1.979	69

b - Résultats expérimentaux.

Figure 36 : Spectrogrammes R.P.E. pour le système VO²⁺ acide lactobionique à pH = 5 (a) - pH = 6.3 (b) et pH = 11.6 (c).



Les complexes ont été identifiés par comparaison de leurs paramètres spectroscopiques expérimentaux avec leurs valeurs théoriques calculées.

Vers $\text{pH} = 5$, on observe la superposition de deux spectres (Fig. 36). Les paramètres $g// = 1.968$ et $A// = 96.10^{-4}\text{cm}^{-1}$ peuvent être attribués à l'espèce $\text{CuL}_2\text{H}_{-1}$, la deuxième espèce de paramètres $g// = 1.974$ et $A// = 81 \cdot 10^{-4}\text{cm}^{-1}$ peut correspondre à l'espèce $\text{CuL}_2\text{H}_{-2}$.

Aux environs de $\text{pH} = 6$, le spectre correspond à celui d'une espèce seule, celle-ci est caractérisée par les paramètres obtenus pour le second complexe présent à $\text{pH} 5$

Pour des solutions plus basiques ($\text{pH} > 10$), les paramètres spectroscopiques déduits du spectrogramme ($g// = 1.975$ et $A// = 79.10^{-4}\text{cm}^{-1}$) indique la présence d'une nouvelle espèce. Cette dernière pourrait correspondre au complexe $\text{VOL}_2\text{H}_{-4}$.

II - Résultats potentiométriques

Nous avons vu qu'en milieu acide, l'acide lactobionique est en équilibre avec sa forme lactone. Sans le site d'ancrage carboxylique, cette dernière molécule est incapable de se lier aux ions métalliques et il faut donc l'exclure de la concentration totale de ligand. Bien que la quantité de la forme lactone soit faible (8,65 % à $\text{pH} = 3.3$ et 0,15 % à $\text{pH} = 5.6$), l'équilibre est relativement lent (environ trois heures) et il influence considérablement les pH initiaux (fig. 37). En utilisant les résultats obtenus précédemment, les véritables concentrations de la forme acide ont pu être évaluées et utilisées dans les calculs.

L'étude potentiomètre du système VO(IV) -Acide lactobionique a été effectuée en utilisant les deux méthodes préconisées dans la partie précédente dans l'étude de la coordination des ions cuivriques avec l'acide lactobionique. Le système $\text{VO} - \text{LACT}$ a été étudié avec une concentration en

ligand de $2 \cdot 10^{-3}$ M et un rapport $L/M = 3$. Les courbes de neutralisation $\text{pH} = f(V_{\text{NaOH}})$ sont présentées sur la figure 37 pour l'étude réalisée par parties et figure 38 pour l'étude directe à partir de $\text{pH} \approx 4.5$.

Figure 37 : Titrations par parties d'une solution d'acide lactobionique - lactone en présence de VO(IV).

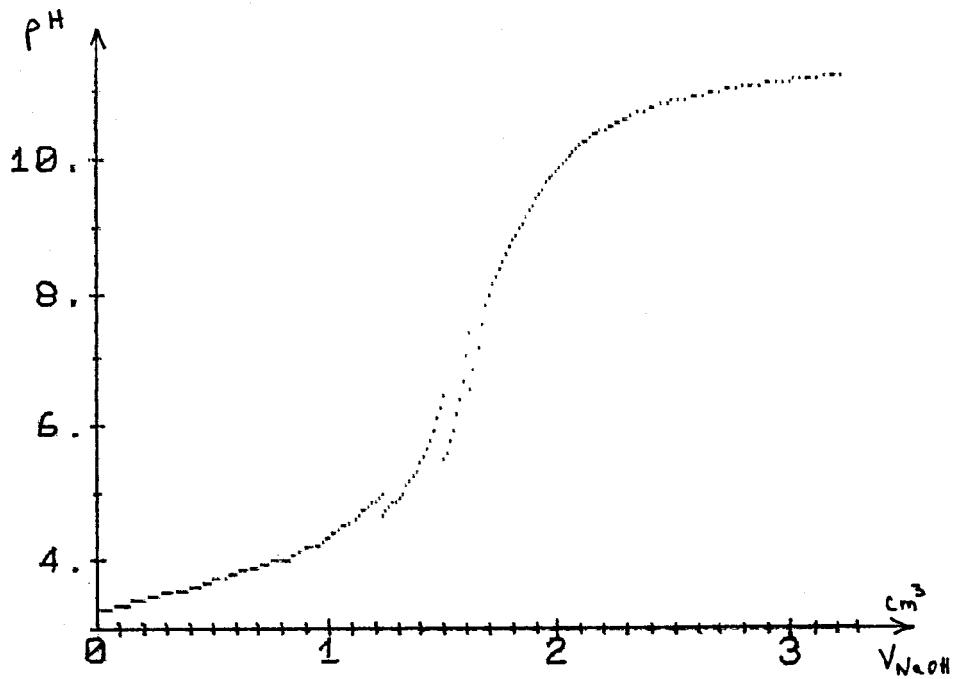
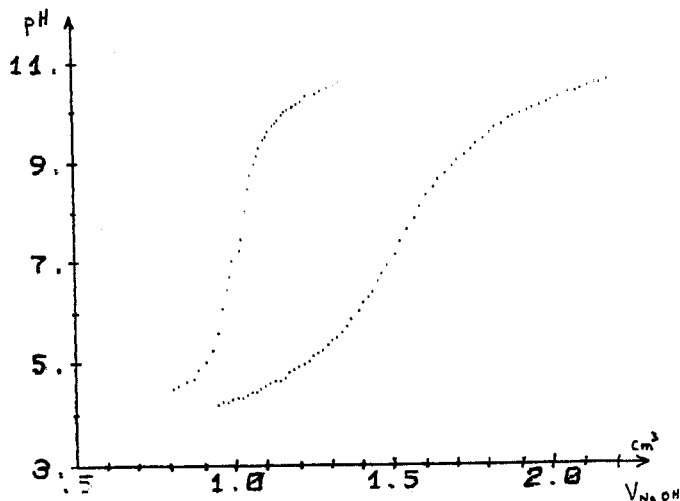


Figure 38 : Titrations directes à partir de $\text{pH} \approx 4.5$ d'une solution de ligand-métal et d'une solution de ligand seul.



L'exploitation mathématique des résultats a permis de déterminer les valeurs des constantes de stabilité suivantes (tableau 10) :

tableau 10 : constantes de formation des complexes $M_p L_q H_r$ pour le système $VO(IV)$ -Acide lactobionique.

ESPECES			log β
VO	L	H	
0	1	1	3.53
1	2	0	6.07 (0.003) ¹
1	2	-1	2.32 (0.003) ¹
1	2	-2	-1.92 (0.006) ¹
1	2	-3	-10.31 (0.040) ¹
1	2	-4	-18.56 (0.130) ¹

¹ : déviation standart

Figure 39 : Courbes de distribution des espèces en fonction du pH pour le système VO^{2+} acide lactobionique.

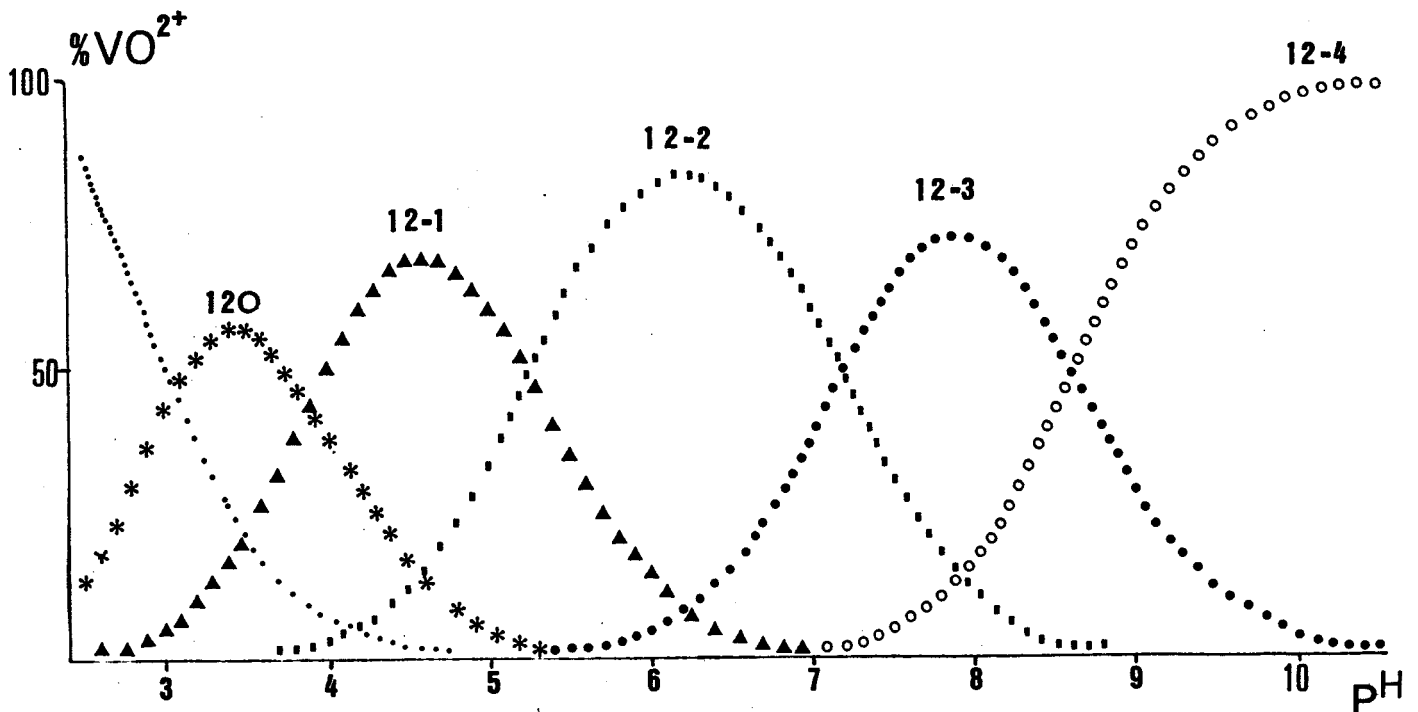


Tableau 11 : Résultats spectroscopiques du système VO(IV)-acide lactobionique.

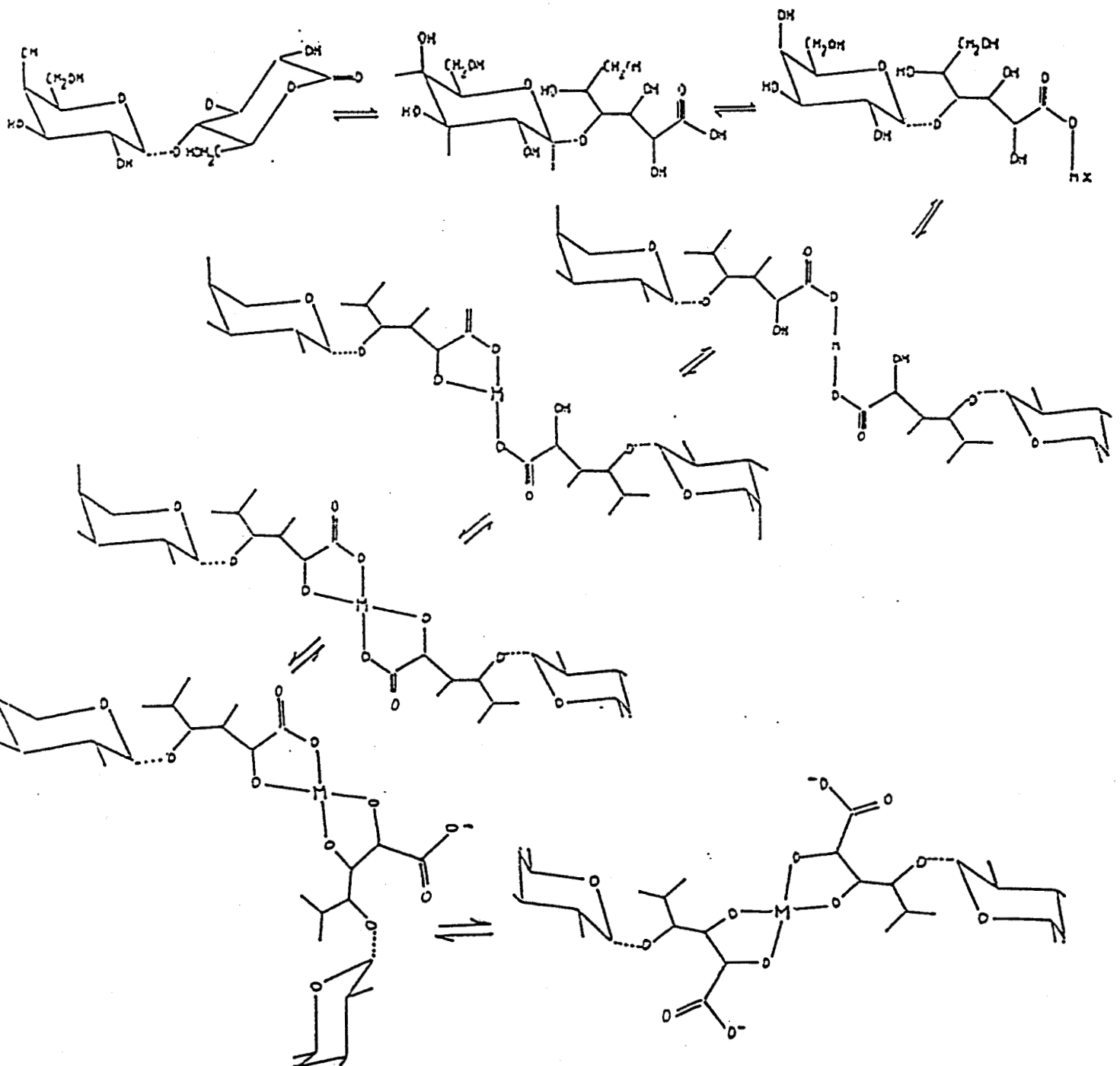
ESPECES			DC	absorption	R.P.E.	
VO	L	H	λ_{nm} ($\Delta\epsilon$)	λ_{nm} (ϵ)	g//	A// $10^{-4}cm^{-1}$
1	2	0	730 (+0.02)	780 (21) 572 (7)		
1	2	-1	700 (+ 0.2) 565 (-0.01) 530 (+0.01)	770 (19) 540 (15) 395 (14)	1.968	96
1	2	-2	780 (-0.01) 640 (+0.06) 520 (+0.025) 400 (+0.025)	760 (16) 622 (19) 532 (20) 392 (26)	1.974	81
1	2	-3	780 (-0.02) 610 (+0.06) 560 (+0.01) 400 (+0.03)	782 (15) 625 (16) 531 (16) 407 (24)		
1	2	-4	765 (-0.27) 737 (-0.20) 615 (+0.30) 560 (ep) 416 (+0.10)	717 (24) 720 (8) 425 (19)	1.975	79

A très haut pH, les ions vanadyles se complexent avec les ions hydroxyles pour donner une espèce très stable VO(OH)₄ qui peut jouer un rôle important dans le processus de coordination. Les spectres de dichroïsme montrent cependant clairement que l'acide lactobionique se lie à l'ion métallique même à haut pH (pH = 11). L'augmentation des effets Cotton aux pH compris entre 8 et 11 indique seulement la variation des sites de liaison de l'acide lactobionique. La coordination commence avec la fonction carboxylique qui agit comme un point d'ancrage. Quand le pH augmente, l'ion métallique provoque la déprotonation et se lie au groupement hydroxyle vicinal (fig. 40). La formation des complexes ML₂H₋₃ et ML₂H₋₄ résulte du fait que les ions Vanadyles sont capables d'induire la déprotonation de deux hydroxyles dans chaque molécule de ligand. La coordination de l'ion vanadyle à 4 oxygènes des groupements hydroxyles déprotonés dans le complexe VOL₂H₋₄ est

suffisamment forte pour surmonter la tendance de l'ion métallique à se complexer en $\text{VO}(\text{OH})_4$.

Les résultats spectroscopiques et potentiométriques obtenus dans l'étude du système $\text{VO}(\text{IV})$ -acide lactobionique réunis dans le tableau 11 permettent de proposer le processus de complexation (fig. 40)

Figure 40 : processus de complexation pour le système $\text{VO}(\text{IV})$ -acide lactobionique



C. CONCLUSION

Les modélisations potentiométriques et les résultats spectroscopiques concernant la coordination de l'acide lactobionique avec les ions Cu(II) et VO(IV) ont montré que cinq espèces différentes participent à l'équilibre de coordination. Tous les complexes sont formés de l'ion métallique lié à deux molécules de ligand, par l'intermédiaire des carboxylates qui constituent des sites d'ancrage, puis par les oxygènes des groupements hydroxylés déprotonés (fig. 40). Les espèces ML_2H_{-1} et ML_2H_{-2} contiennent un ou deux cycles (COO^- , O^-) alors que ML_2H_{-3} et ML_2H_{-4} sont constitués de un ou deux cycles à cinq chaînons (O^- , O^-). Le lactobionate de Vanadyle n'a pas été observé par les moyens que nous avons utilisés, ce complexe peut être un intermédiaire instable à la formation du VO_2 . Les constantes de stabilité des complexes des ions cuivre(II) et oxovanadium(IV) avec l'acide lactobionique sont considérablement plus importantes que celles des complexes correspondants des acides uroniques. En effet, les complexes cuivriques de l'acide lactobionique sont de l'ordre de 100 fois plus stables que les complexes cuivriques de l'acide galacturonique. La différence de stabilité est encore plus prononcée dans le cas des complexes du vanadyle où les constantes de formation des complexes avec l'acide lactobionique sont jusque 1000 fois plus fortes. Et ceci, pour des modes de liaisons métal-ligand identiques. La différence de stabilité entre les complexes métalliques de l'acide lactobionique et ceux des acides uroniques peut provenir du fait que ce dernier ligand avec sa structure cyclique forme un chelate beaucoup plus rigide. La différence dans la stabilité des complexes peut ainsi découler des effets d'entropie. La plus grande flexibilité de la structure du fragment linéaire de l'acide lactobionique permet, lorsque ce dernier se lie à l'ion métallique par la fonction carboxylate, le rapprochement des groupements hydroxyles. La formation d'un cycle à cinq chaînons peut alors intervenir avec moins d'empêchement, et les complexes sont alors plus stables à la fois dans le cas de l'oxovanadium(IV) et du cuivre(II). Les

complexes de l'oxovanadium(IV) sont aussi considérablement plus stables que les complexes cuivriques correspondants du même ligand (de 2 à 8 unités de loge d'écart). Ceci a déjà été vérifié dans le cas des acides uroniques (50) et montre la faible affinité du cuivre pour les liaisons Cu-O^- . Ainsi, l'acide lactobionique et ses dérivés peuvent être utilisés comme agents chélatants.

CHAPITRE IV**ETUDE DU SYSTEME TERNAIRE
ACIDE LACTOBIONIQUE - Cu(II) -D-
GLUCOSAMINE**

Ce chapitre aborde l'étude de la complexation du système Cu(II)-acide lactobionique-D-glucosamine. Cette étude nécessite une parfaite connaissance des deux systèmes binaires Cu(II)-acide lactobionique et Cu(II)-D-glucosamine. C'est pour cette raison qu'en préalable, nous allons étudier le système Cu(II)-D-glucosamine, l'autre ayant fait l'objet d'une étude au chapitre précédent.

Dans cette partie, en raison de la présence de deux ligands, nous utiliserons pour les complexes quatre coefficients stoechiométriques p q r s correspondant respectivement au cuivre, à la D-glucosamine, à l'acide lactobionique et au proton.

A - SYSTEME CU(II)-D-GLUCOSAMINE.

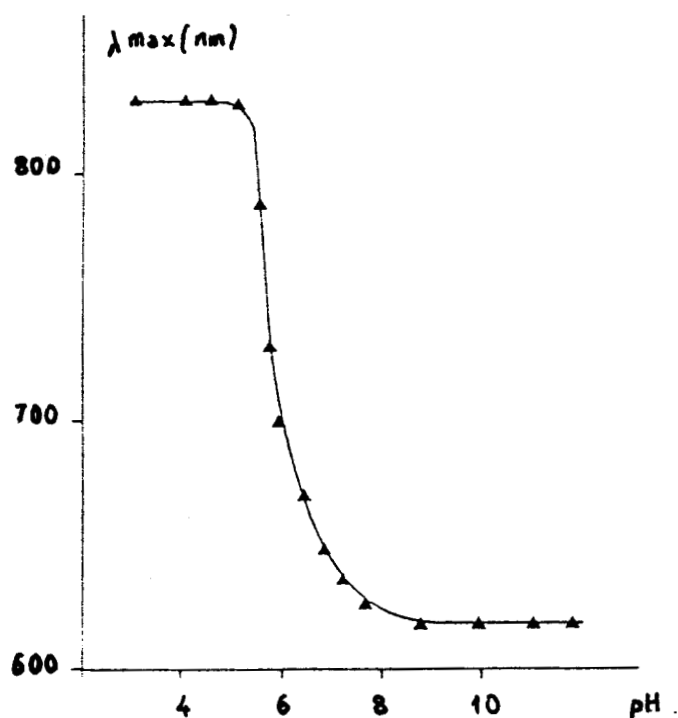
Les sucres aminés jouent un rôle important dans le milieu naturel. Ils sont présents dans les sols associés à d'autres composés organiques tels que les acides humiques (70-72). Ils interviennent ainsi dans le processus d'assimilation des métaux par les plantes. Ils constituent en même temps une partie importante des réserves azotées des sols (73, 74). Pour toutes ces raisons, le système Cu(II)-D-glucosamine a fait l'objet de nombreux travaux (12, 16, 57, 75). Il est cependant nécessaire d'effectuer l'étude de ce système dans les conditions dans lesquelles sera réalisée celle du système ternaire Cu(II)-acide lactobionique-D-glucosamine.

I - RESULTATS EXPERIMENTAUX1 - Résultats spectroscopiques

a - Spectroscopie U.V.

Les spectres d'absorption pour différents pH permettent de tracer la variation de la longueur d'onde du maximum d'absorption λ_{max} en fonction du pH (fig. 41).

Figure 41 : Spectroscopie U.V. du système Cu^{2+} D-glucosamine.



La valeur de λ_{max} décroît de 830 nm jusque 620 nm ($\epsilon = 40 \text{ mole}^{-1} \text{ l cm}^{-1}$). La forme de cette courbe suggère l'existence de deux espèces. La première apparaît dès pH = 6, la seconde vers pH = 8. La diminution de l'énergie de la bande d-d du cuivre (660 nm à pH = 8) indique clairement la participation de deux atomes d'azote dans le processus de complexation (43, 76).

b - Dichroïsme circulaire

Les spectres de dichroïsme circulaire ont été enregistrés dans la zone d-d du cuivre (fig. 42), et dans la zone de

transition de transfert de charge (fig 43) pour des pH > 6. Le spectre obtenu dans la gamme de longueurs d'onde correspondant à la bande d-d à pH = 6.5, fait apparaître une transition à effet Cotton positif centré sur 620 nm. Dès pH = 7.5, l'apparition de la transition d'effet Cotton négatif à 720 nm indique la formation d'une nouvelle espèce. A pH ≈ 10.2, on observe une modification des effets Cotton, probablement due aux réarrangements survenant lors du processus de déprotonation $ML_2 \rightarrow ML_2H_{-2}$.

Dans la zone de longueurs d'onde correspondant à la bande de transfert de charges, l'effet Cotton négatif centré sur 250 nm est attribué à la transition de transfert de charges $NH_2 \rightarrow Cu(II)$. Lorsque le pH = 10.2, le spectre dichroïque laisse apparaître une transition d'effet Cotton positif vers 295-300 nm ($\Delta\epsilon = + 0.12 \text{ mole}^{-1} \text{ l cm}^{-1}$).

Figure 42 : Spectres dichroïques pour le système Cu^{2+} D-glucosamine dans la région de la bande d-d du cuivre à pH = 6.5(Δ), pH = 7.1(\cdot), pH = 10.2($*$)

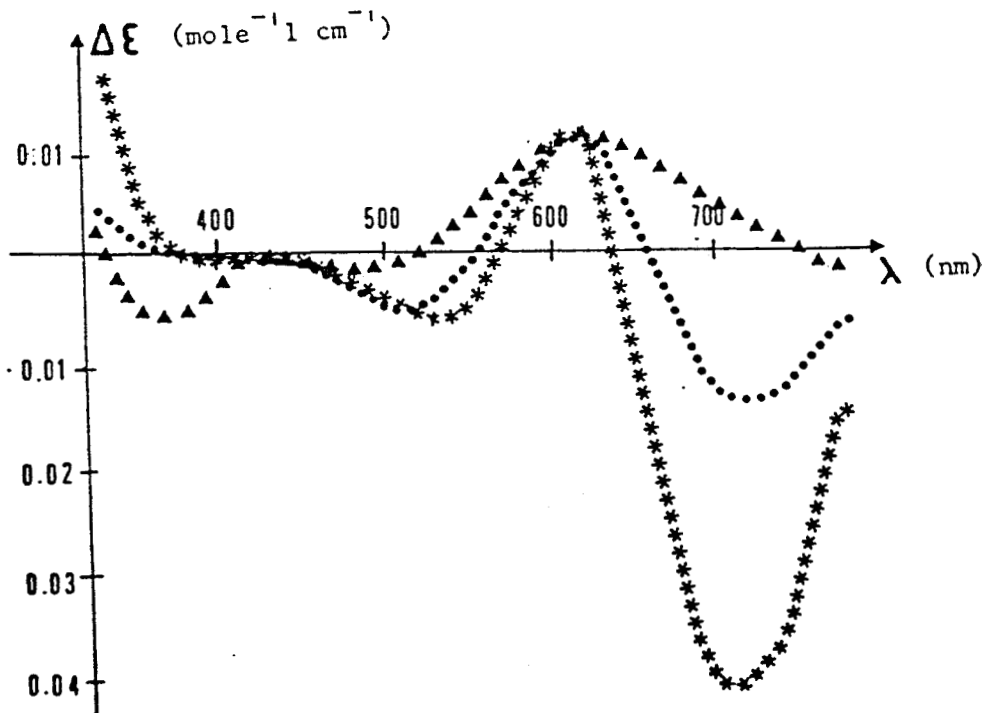
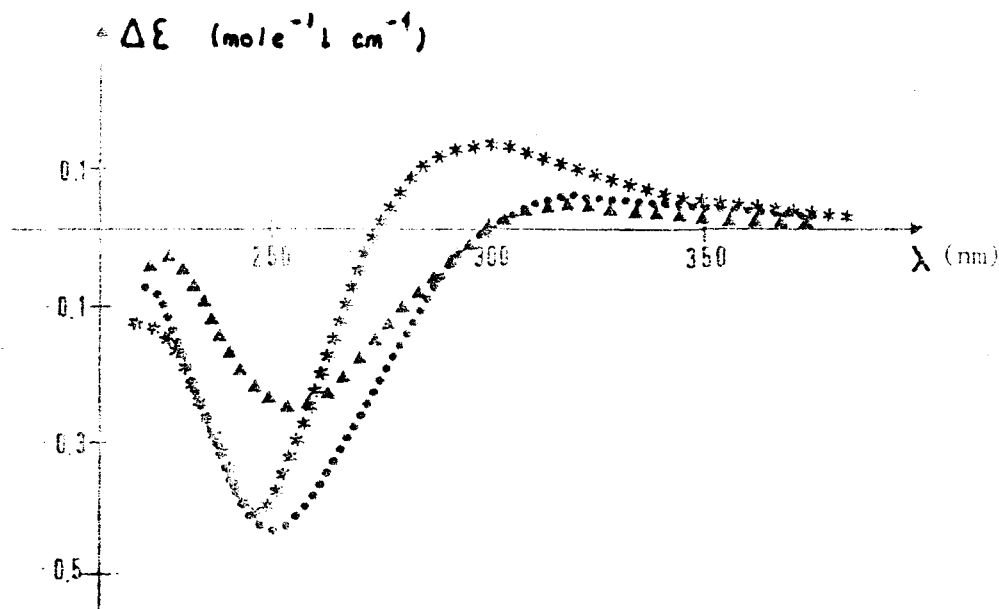


figure 43 : Spectres dichroïques pour le système Cu(II)-D-glucosamine dans la région de transferts de charges à pH = 6.5(Δ), pH = 7.1(\cdot), pH = 10.2 (*)

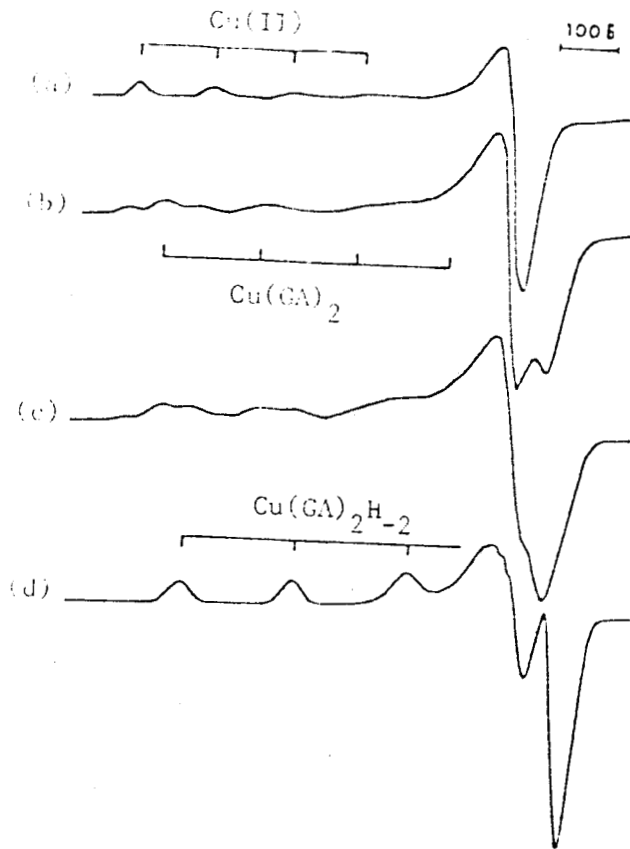


c - Résultats R.P.E.

Le dépouillement des spectres R.P.E. obtenus pour différents pH (fig. 44), nous a permis de mettre en évidence l'existence d'un complexe ($g_{\parallel} = 2.317$ et $A_{\parallel} = 175 \cdot 10^{-4} \text{cm}^{-1}$). Ces paramètres confortent les résultats de spectroscopie électronique impliquant l'existence d'un complexe formé d'un atome de cuivre lié à deux molécules de ligands par l'intermédiaire des atomes d'azote. Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature. (43, 47).

La variation des paramètres spectroscopiques R.P.E. lorsque le pH croît ($g_{\parallel} = 2.255$ et $A'_{\parallel} = 196 \cdot 10^{-4} \text{cm}^{-1}$) (fig4), montre la formation d'une nouvelle espèce dans laquelle il existe une interaction plus forte entre le ligand et le métal (43, 76, 77).

Figure 44 : spectres R.P.E. du système Cu^{2+} D-glucosamine à pH = 4.5 (a), pH = 6.8 (b), pH = 7.2 (c), pH = 8.5 (d).



II. Résultats potentiométriques.

Les résultats spectroscopiques obtenus, et ceux des travaux antérieurs de notre groupe de recherche ont permis de proposer la modélisation suivante, se caractérisant par les espèces :

- CuL_2 dans lequel l'ion cuivrique serait lié à deux atomes d'azote ;

- $\text{CuL}_2\text{H}_{-1}$ stabilisé par chélation (groupement hydroxyle déprotoné) ;

- $\text{CuL}_2\text{H}_{-2}$ qui serait un complexe dans lequel deux cycles (N, O^-) à cinq chaînons se forment par l'intermédiaire des groupements hydroxyles déprotonés ;

- CuL_2H_3 qui pourrait résulter de la déprotonation d'une molécule de solvant en milieu fortement alcalin.

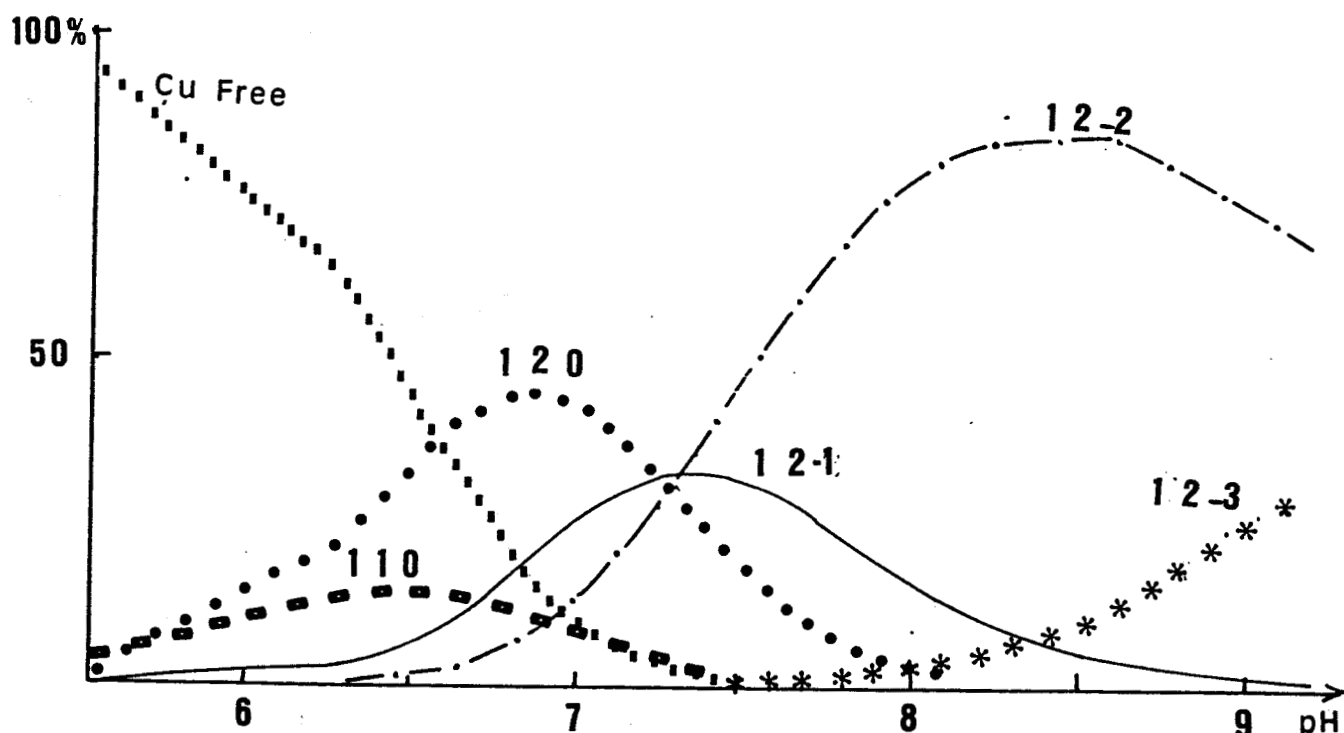
La constante d'acidité de la D-glucosamine ($\text{pK}_a = 7.57$) (tableau 12) que nous avons déterminée est proche de la valeur trouvée dans la littérature (50). Elle correspond à la dissociation du groupement aminé du sucre. Dans la zone des pH inférieurs à 11, ce ligand ne se déprotone qu'une seule fois et sera considéré comme un ligand LH. La modélisation potentiométrique et les résultats issus des techniques spectroscopiques permettent de proposer les résultats que nous avons regroupés dans le tableau suivant :

Tableau 12 : Résultats spectroscopiques du système Cu(II)-D-glucosamine.

ESPECES M L H			log β	D.C $\lambda_{\text{nm}} (\Delta\epsilon)$	g//	R.P.E. A//(10^{-4} cm^{-1})
0	1	1	7.57			
1	1	0	4.08(0.04)			
1	2	0	8.98(0.03)	620(0.011)	2.317	175G
1	2	-1	1.86(0.03)			
1	2	-2	-5.53(0.02)	720(-0.042) 620(+0.011) 518(-0.005) 242(-0.440)	2.255	196
1	2	-3	-14.78(0.04)	708(-0.042) 620(+0.011) 538(-0.005) 295(+0.120) 242(-0.410)		

La figure 45 représente la distribution des espèces du système Cu(II)-D-glucosamine en fonction du pH.

Figure 45 : Courbes de distribution des espèces pour le système Cu(II)-D-glucosamine en fonction du pH.



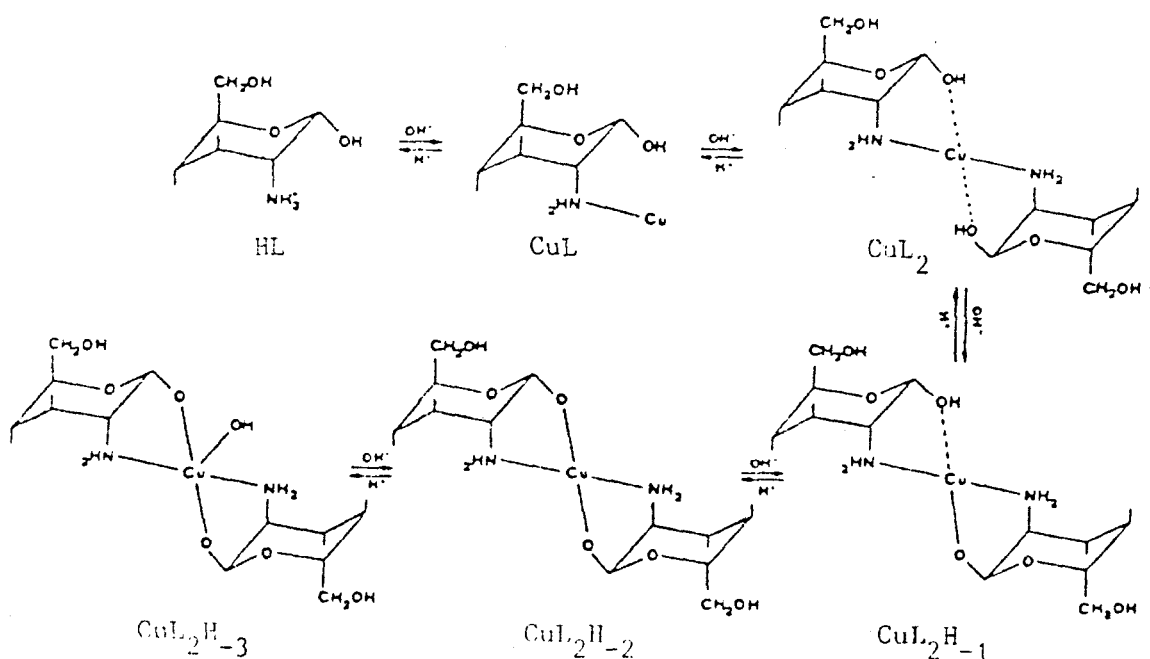
III - Discussion

- Le complexe ML_2 (fig 45 ; tableau 12) apparaît comme l'espèce majoritaire aux environs de $pH = 7$ ($\approx 50\%$). L'effet Cotton positif de la transition, observée vers 640 nm en dichroïsme circulaire ($\epsilon = + 0.011 \text{ mole}^{-1} \text{ l cm}^{-1}$), celui de la transition de transfert de charge relevée vers 252 nm, ainsi que les paramètres R.P.E. $g_{//} = 2.317$, $A_{//} = 175 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ confirment la formation d'un complexe à deux atomes d'azote liés à l'ion cuivrique.

- L'espèce CuL_2H_{-1} ($\approx 30\%$ à $pH 7.3$) n'est observée par aucune technique spectroscopique, mais il est raisonnable de penser que le processus de déprotonation d'un premier hydroxyle de la D-glucosamine, constitue l'étape intermédiaire de la formation de l'espèce CuL_2H_{-2} . Elle résulte de la déprotonation d'un deuxième hydroxyle conduisant à la

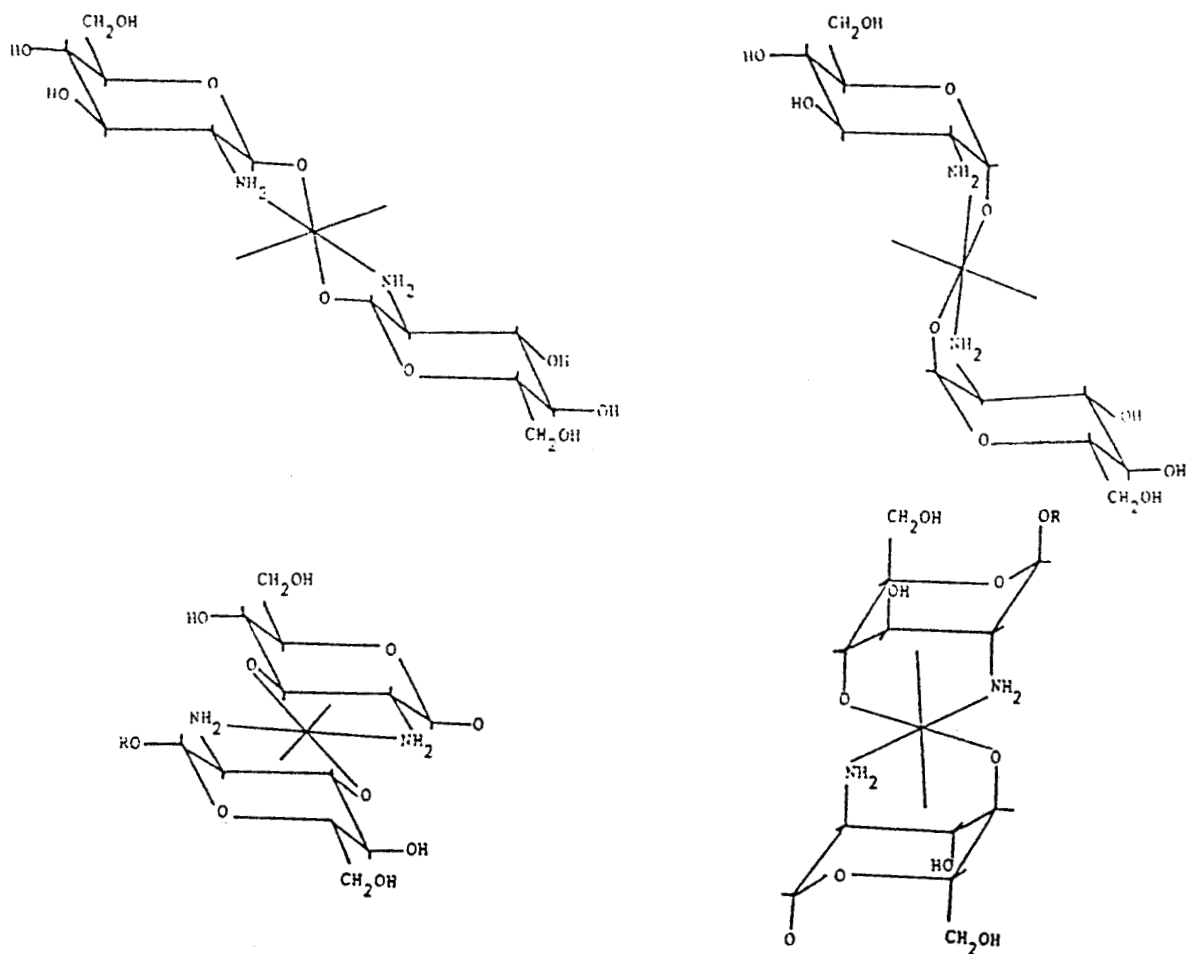
formation de deux cycles chélatés (O^- , N) à cinq chaînons. L'intensité de la transition dans la région d-d du cuivre augmente, et les paramètres R.P.E. ont alors pour valeurs $g_{\parallel} = 2.255$ et $A_{\parallel} = 196.10^{-4} \text{cm}^{-1}$. En milieu basique ($\text{pH} > 8.5$), la courbe de distribution des espèces en fonction du pH, indique la formation du complexe $\text{CuL}_2\text{H}_{-3}$ qui pourrait être impliqué pour interpréter l'effet Cotton positif apparu vers $\approx 290 \text{ nm}$ dans la région des transferts de charge. Cette espèce résulte de la déprotonation de ML_2H_{-2} . On peut invoquer l'intervention d'un groupement OH d'une molécule de ligand, ou d'une des molécules d'eau encore liée au métal en position apicale. La première hypothèse (intervention d'un second hydroxyle du sucre aminé) semble impossible du fait de la rigidité de sa structure cyclique. La formation de ML_2H_{-3} ne peut donc se produire que par la déprotonation d'une molécule d'eau. Les résultats obtenus pour l'étude du système $\text{Cu(II)-D-glucosamine}$, concernant l'existence et la stabilité de l'ensemble des complexes présents en solution sont voisins de ceux trouvés dans la bibliographie(16).

Figure 46 : Processus de complexation du système $\text{Cu(II)-D-glucosamine}$.



Dans le processus de complexation (fig. 46), nous avons choisi arbitrairement de représenter le complexe ML_2H_2 en faisant participer le groupement hydroxyle déprotoné O^- (1) en position β . Cependant, quatre possibilités plus ou moins favorisées existent. Il s'agit des groupements OH fixés en C(1) (position α ou β), C(3) et C(4) (fig. 47).

Figure 47 : structures possibles du complexe CuL_2H_2 .



Les groupements hydroxyles en position C(1), fonction réductrice du sucre, se déprotonent plus facilement que les autres. Dans ce cas, on forme un complexe CuL_2H_2 contenant deux cycles stabilisants (N, $O^-(1)$) à cinq chaîons. La participation des groupements OH en position C(3) conduit également à deux cycles à cinq chaîons (N, $O^-(3)$), mais il existe alors une tension au niveau des cycles et une légère

déformation de la structure plan carré de l'ion cuivrique. L'utilisation du groupement hydroxyle déprotoné O^- en C(4) implique que le sucre soit dans une configuration chaise moins favorable. Le complexe $1\ 2\ -2$ contient alors deux cycles (N, O^- (4)) à six chaînons thermodynamiquement beaucoup moins stables que ceux en cinq.

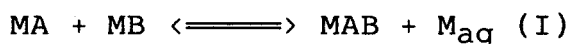
En conclusion, pour l'espèce $1\ 2\ -2$, le deuxième site de complexation le plus favorable est le groupement hydroxyle déprotoné en position C(1). Il n'est pas possible d'exclure totalement les sites $O^-(3)$ et $O^-(4)$ mais leur participation doit certainement être faible.

B - ETUDE DU SYSTEME TERNAIRE - ACIDE LACTOBIONIQUE - CUIVRE(II) - D-GLUCOSAMINE.

Dans le milieu naturel, les ions métalliques et les molécules organiques ne sont jamais présents à l'état libre. Les conditions biologiques favorisent la formation des complexes mixtes métal-ligands du type $M_pL_q^1L_r^2\dots L_z^n$ (78) au dépend d'espèces simples M_pL_q (79). Par définition, le complexe $M_pL_q^1L_r^2$, le plus simple de ces systèmes contiendra un ion métallique et deux ligands différents autres que le solvant.

I - Prévision d'existence de complexes ternaires

La prévision de l'existence de complexes ternaires peut être effectuée à l'aide d'une méthode préconisée par Sigel(80). Deux expressions sont utilisées pour accéder à l'importance relative des complexes ternaires :



Cependant dans un milieu biologique, les concentrations en ligands sont généralement en large excès par rapport à celle du métal. Ainsi, la quantité de l'ion métallique libre en solution est extrêmement faible. Dans ce contexte, il est beaucoup plus approprié d'utiliser la réaction (II), pour laquelle la constante d'équilibre (en terme de concentration) est donnée par :

$$K_D = \frac{[MA]^2}{[MA_2][MB_2]} = \frac{(\beta^{AB})^2}{\beta^{A_2} \beta^{B_2}} \quad (1)$$

En conséquence :

$$\log \beta^{AB} = \frac{1}{2} \{ \log \beta^{A_2} + \log \beta^{B_2} \} + \frac{1}{2} \log K_D \quad (2)$$

Les résultats statistiques montrent que l'obtention d'un complexe ternaire implique une valeur de K_D supérieure ou égale à 4. Stuart H. Laurie et Colin James ont complété cette étude (81) en effectuant un traitement statistique qui permet de prévoir les rapports de concentration entre les complexes binaires et le complexe ternaire :

$$[MA_2] : [MB_2] : [MAB] = (wa)^2 : b^2 : 2(wa)b$$

où w est fonction des constantes de stabilité (β^{A_2} , β^{B_2}) des complexes binaires ($w = (\beta^{A_2}/\beta^{B_2})^{1/2}$), a et b étant les concentrations de chaque ligand.

Un grand nombre d'exemples ont permis à ces auteurs de conclure qu'en l'absence d'interactions entre les ligands, l'espèce ternaire prédomine si la condition : $0.5 < wa/b < 2$ est vérifiée.

L'étude des systèmes Cu(II)-acide lactobionique et Cu(II)-D-glucosamine met en évidence pour chacun, l'existence d'une espèce majeure $Cu(LAC)_2 H_{-2}$ et $Cu(GLU)_2 H_{-2}$.

La condition d'existence de l'espèce ternaire nous permet, en utilisant les constantes de formation des deux complexes binaires, de déterminer les rapports des ligands nécessaires.

On trouve : $5.12 < \text{LAC} / \text{GLU} < 20.46$

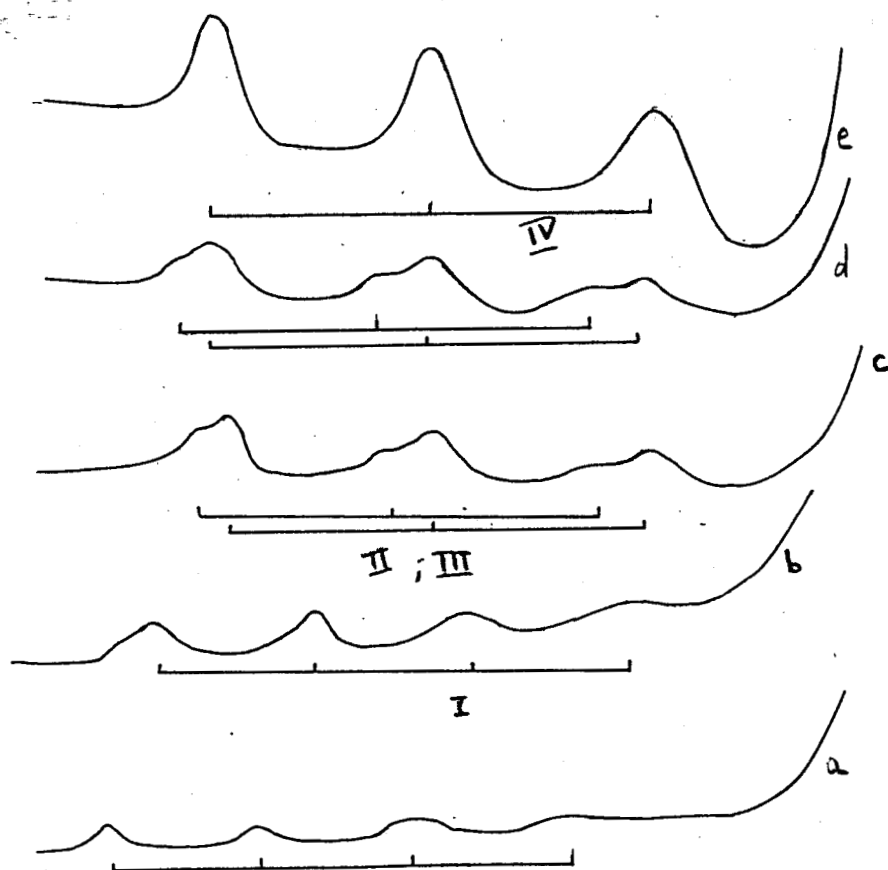
L'équation (2) permet de calculer la limite inférieure de la constante de formation de l'espèce mixte éventuellement formée, celle-ci est de l'ordre de $\log \beta^{AB} = -6$.

II - Résultats expérimentaux

1 - Résultats spectroscopiques

a - Spectroscopie R.P.E.

Figure 48 : spectres R.P.E. du système Cu-glu-lac en fonction du pH.



Les enregistrements des spectres R.P.E. pour des solutions contenant $5 \cdot 10^{-3}$ mole l^{-1} en $Cu(II)$, $4.95 \cdot 10^{-3}$ mole l^{-1} en D-glucosamine et $35 \cdot 10^{-3}$ mole L^{-1} en acide lactobionique ont été réalisées pour différents pH (fig. 48).

- lorsque le pH est peu différent de 2.5, le spectrogramme R.P.E. (fig. 48, courbe a) est caractéristique du spectre de l'ion cuivrique hexahydraté $Cu(H_2O)_6^{2+}$ ($g// = 2.4$; $A// = 123 \cdot 10^{-4} cm^{-1}$).

- A partir de pH ≈ 3.7 (courbe b) le changement des paramètres ($g// = 2.364$ et $A// = 130 \cdot 10^{-4} cm^{-1}$) indique l'apparition d'une nouvelle espèce I. Elle reste présente dans les solutions à pH ≈ 4.7 , pH ≈ 5.5 et pH ≈ 6 dont les spectres n'ont pas été représentés par souci de clarté.

- L'enregistrement du spectre pour la solution à pH ≈ 6.7 a permis de déterminer de nouveaux paramètres spectroscopiques ($g// = 2.292$ et $A// = 163 \cdot 10^{-4} cm^{-1}$). Ils indiquent la présence d'une nouvelle espèce II. Au regard de la variation de ces paramètres, on peut penser que les liaisons intervenant dans ce dernier complexe, sont plus "fortes".

- A pH ≈ 7 , à l'espèce II précédente, vient s'ajouter une espèce III de paramètres $g// = 2.261$; $A// = 172.5 \cdot 10^{-4} cm^{-1}$ (courbe c). Ces deux complexes sont toujours présents à pH ≈ 7.5 (courbe d).

- A pH ≈ 9.4 , une seule espèce IV apparaît ; les paramètres spectroscopiques ont pour valeur ($g// = 2.257$ et $A// = 177.5 \cdot 10^{-4} cm^{-1}$) (courbe e).

Tableau 13 : Résultats R.P.E. du système ternaire
D-glucosamine-Cu(II)-acide lactobionique
dans le rapport 1/1/7

PH	R.P.E.	
	g//	A//(10^{-4} cm $^{-1}$)
2.56	2.4	123.3
3.72	2.364	130
6.70	2.292	162.7
7.07	2.285	163.6
	2.261	172.5
7.55	2.290	165
	2.265	174.4
9.36	2.257	177.5

b - Dichroïsme circulaire

Les spectres dichroïques du système ternaire enregistrés à différents pH dans la zone de transition d-d du Cuivre(II) et dans celle des transferts de charge ont été regroupés sur les figures 49 et 50.

L'évolution des spectres obtenus dans la région des transitions d-d du cuivre, en fonction du pH montre l'existence de quatre complexes. Dès pH \approx 6, les effets Cotton observés en milieu acide s'inversent. Pour les pH compris entre 6 et 8, les spectres peuvent être considérés comme ceux de plus d'une espèce (spectre intermédiaire), car à pH \approx 8, les effets Cotton sont plus intenses et subissent un déplacement en longueur d'onde. A pH plus basique (pH \approx 11), l'intensité des transitions augmente et les longueurs d'onde leur correspondant ne sont plus centrées au même endroit.

Figure 49 : Spectres dichroïques du système Cu(II)-D-glucosamine-acide lactobionique dans la bande des transitions d-d. du cuivre.

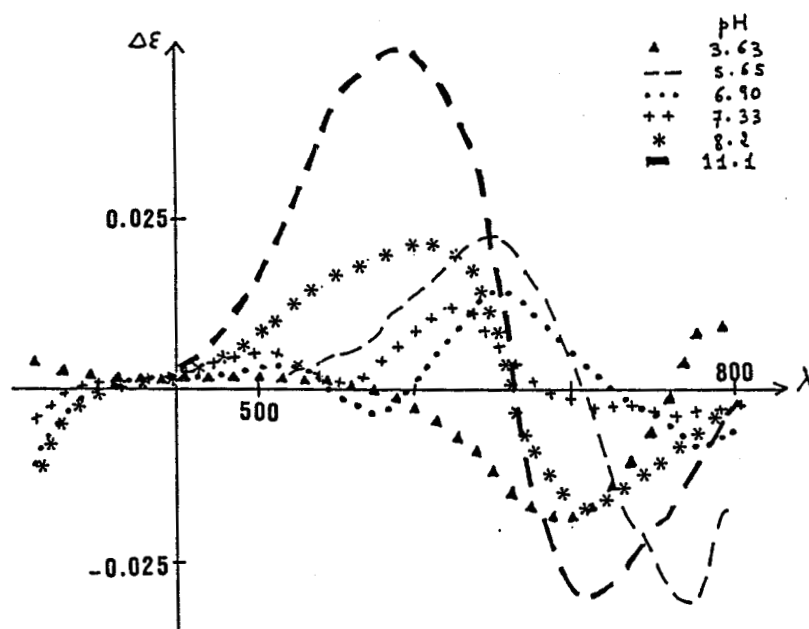


Figure 50 : Spectres dichroïques du système ternaire dans la région des transferts de charge.

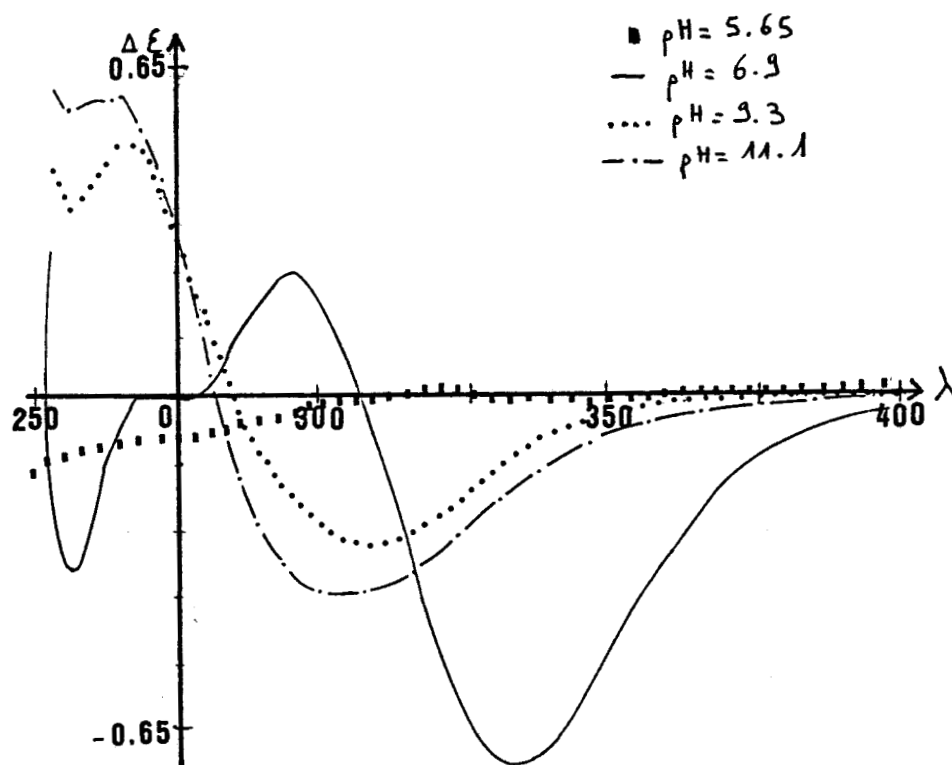


Tableau 14 : Résultats du dichroïsme circulaire pour le système ternaire.

PH	λ (nm)	D.C	
		$\Delta\epsilon$	
3.63	364	+0.002	
	694	-0.012	
	784	+0.009	
5.65	218	-0.143	
	236	-0.266	
	356	+0.004	
	556	+0.005	
	650	+0.022	
	738	-0.02	
	774	-0.03	
6.9	244	+0.241	
	282	-0.73	
	356	-0.012	
	516	+0.003	
	576	-0.004	
	652	+0.014	
	738	-0.003	
	782	-0.009	
8.2	244	+0.377	
	284	-0.506	
	356	-0.011	
	558	+0.017	
	607	+0.021	
	709	-0.018	
11.1	244	+0.595	
	284	-0.394	
	372	+0.003	
	559	+0.044	
	586	+0.049	
	712	-0.031	
	752	-0.020	

2 - Prévision d'existence des complexes ternaires sur la base des résultats spectroscopiques.

Les paramètres R.P.E. correspondants aux trois systèmes I Cu(II)-Glu, II Cu(II)-Glu-Ac Lac et III Cu(II)-Ac Lac sont regroupés (tableau 14) afin de les comparer pour chaque pH.

Tableau 15 : Résultats spectroscopiques R.P.E. des trois systèmes en fonction du pH.

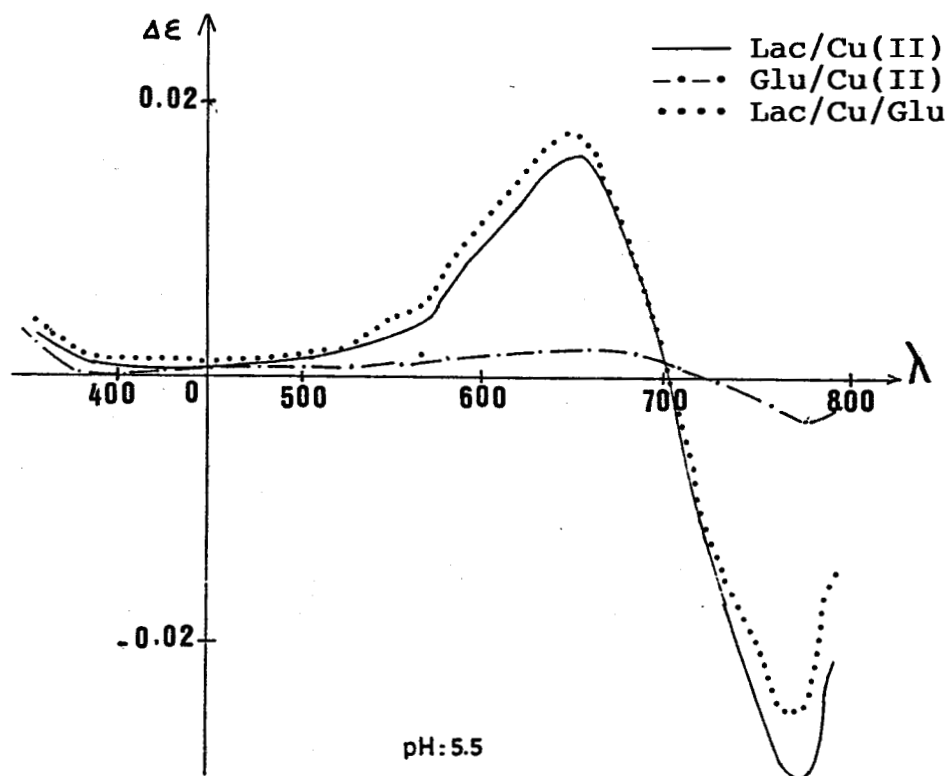
		2.4		2.317		2.255		
	g// A//	135		175		196		
II	g//	2.364	2.367	2.358	2.285	2.29	2.257	
	A//	130	128	131	164	165	177	
	g//				2.261	2.265		
	A//				172.5	174.5		
III	g//	2.362	2.361	2.36	2.358		2.275	
	A//	130	129.5	130	128		178	
		4	5	6	7	8	9	10
								pH

Jusque $\text{pH} \approx 6$, les valeurs de $g//$ et $A//$ obtenues pour le système ternaire sont pratiquement identiques à celles déterminées dans le cas du système Cu(II) -acide lactobionique. Au-delà de ce pH , on note la formation de deux espèces pour le système ternaire dont les paramètres sont différents de ceux obtenus dans le cas de chacun des systèmes binaires. En milieu basique, le complexe de paramètres $A// = 177.5 \cdot 10^{-4} \text{cm}^{-1}$ et $g// = 2.257$ (système II) n'apparaît dans aucun des deux systèmes binaires ; Cu(II) -D-glucosamine, et Cu(II) -acide lactobionique. De la comparaison des spectres R.P.E. des trois systèmes, on peut retenir la formation de trois complexes présents dans le système ternaire alors qu'ils ne sont pas observés dans les systèmes binaires. On peut supposer qu'il s'agit de trois systèmes mixtes CuA_xB_y en équilibre avec des complexes binaires de l'acide lactobionique. Pour appuyer cette hypothèse, une étude approfondie des spectres de dichroïsme circulaire de chaque système, a été effectuée. Nous avons regroupé sur une même figure les spectres obtenus pour les trois systèmes, à des pH représentatifs.

A $\text{pH} \approx 5.5$ (fig 51), les spectres obtenus pour le système ternaire et pour le système Cu(II) -acide lactobionique sont quasiment identiques.

Aux alentours de pH 6.5 (fig. 52), l'effet Cotton négatif ($\lambda \approx 770$ nm) observé sur le spectre du système ternaire n'apparaît pas sur celui du système binaire acide lactobionique- Cu(II). De plus, l'effet Cotton positif de chacun des systèmes n'est pas situé à la même longueur d'onde (I- $\rightarrow \lambda = 620$ nm, II- $\rightarrow \lambda = 650$ nm, III- $\rightarrow \lambda = 657$ nm). L'espèce majoritaire présente à ce pH pour le système ternaire n'est donc pas une espèce binaire.

Figure 51 : spectres dichroïques des trois systèmes à pH = 5.5



Lorsque le pH augmente (pH ≈ 7.5), les spectres des trois systèmes diffèrent totalement (fig. 53).

La même remarque peut être faite pour des pH plus basique (fig. 54) et (fig. 55).

Nous pourrions penser que pour un pH plus élevé, vu la stabilité du complexe $\text{CuL}_2\text{H}_{-4}$ avec l'acide lactobionique, ce

dernier pourrait être favorisé. Ce n'est pas le cas au regard de la différence entre les spectres des systèmes ternaire et binaires.

Figure 52 : Spectres dichroïques des trois systèmes à pH = 6,5

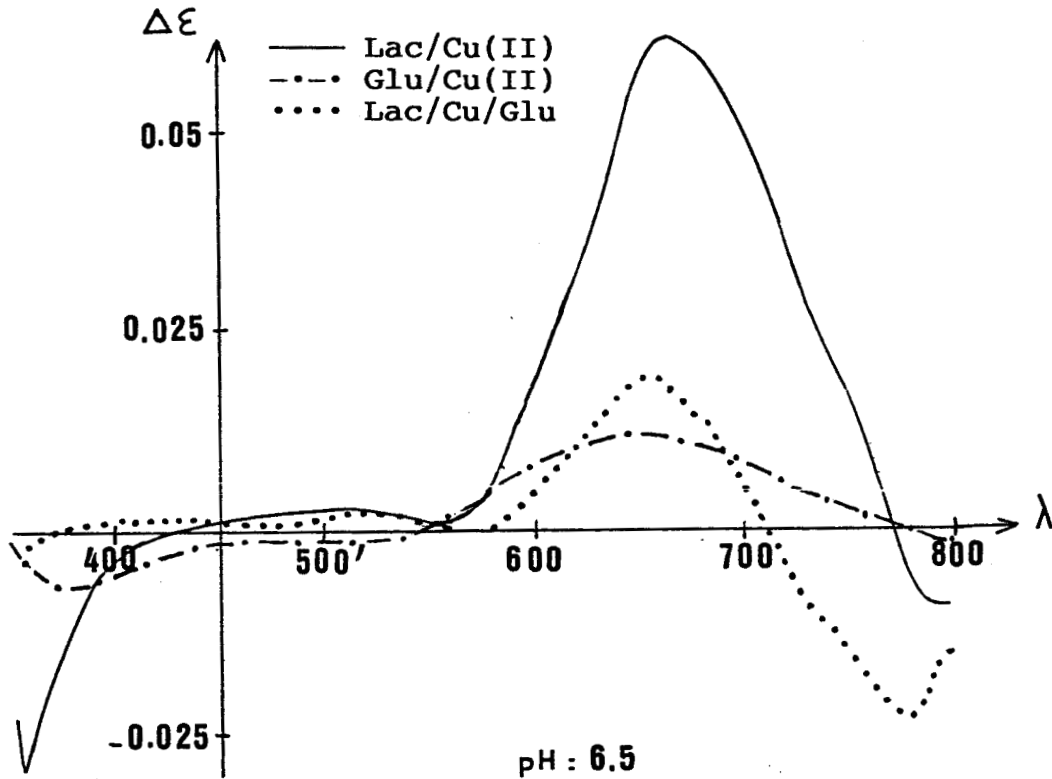


Figure 53 : Spectres dichroïques des trois systèmes à pH = 7.5

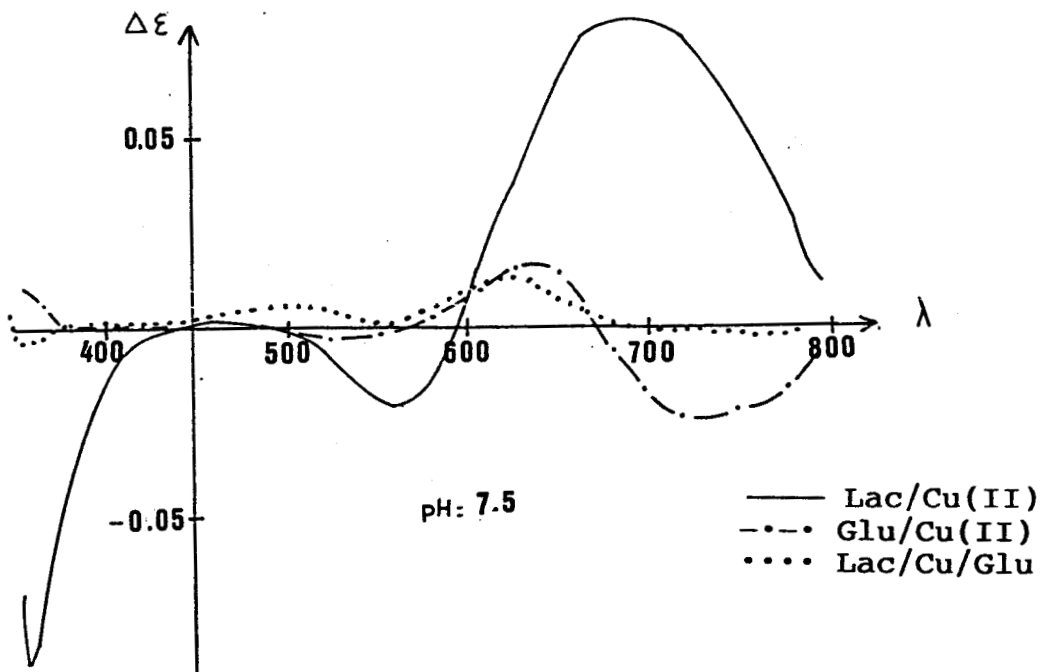


Figure 54 : Spectres dichroïques des trois systèmes
à pH = 8

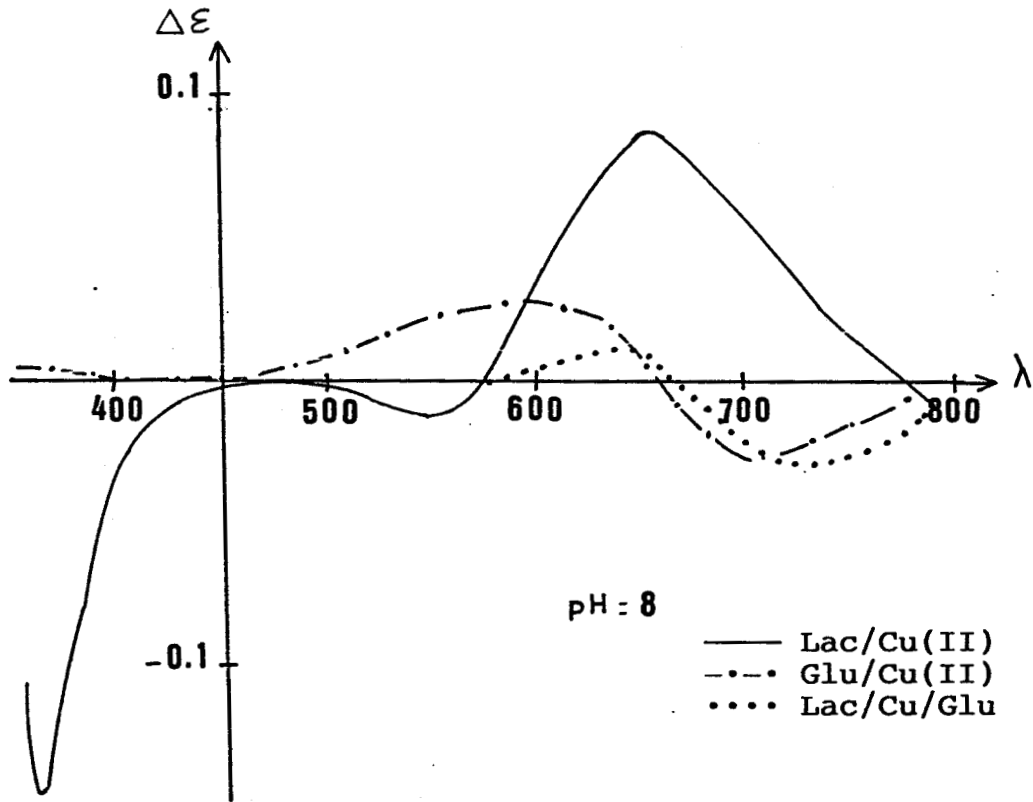
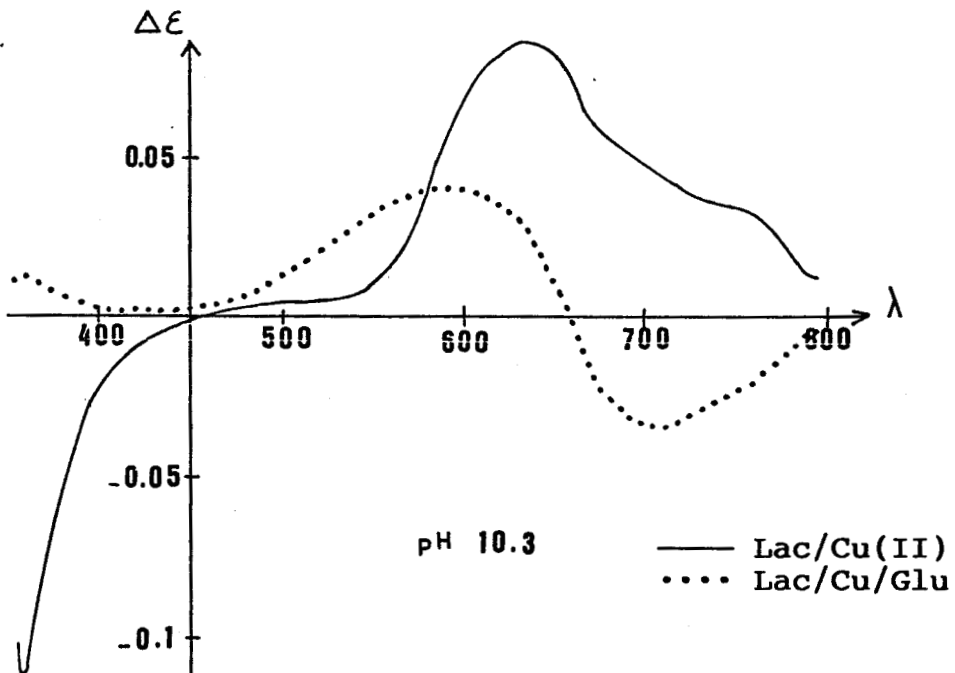


Figure 55 : Spectres dichroïques des trois systèmes
à pH = 10.5



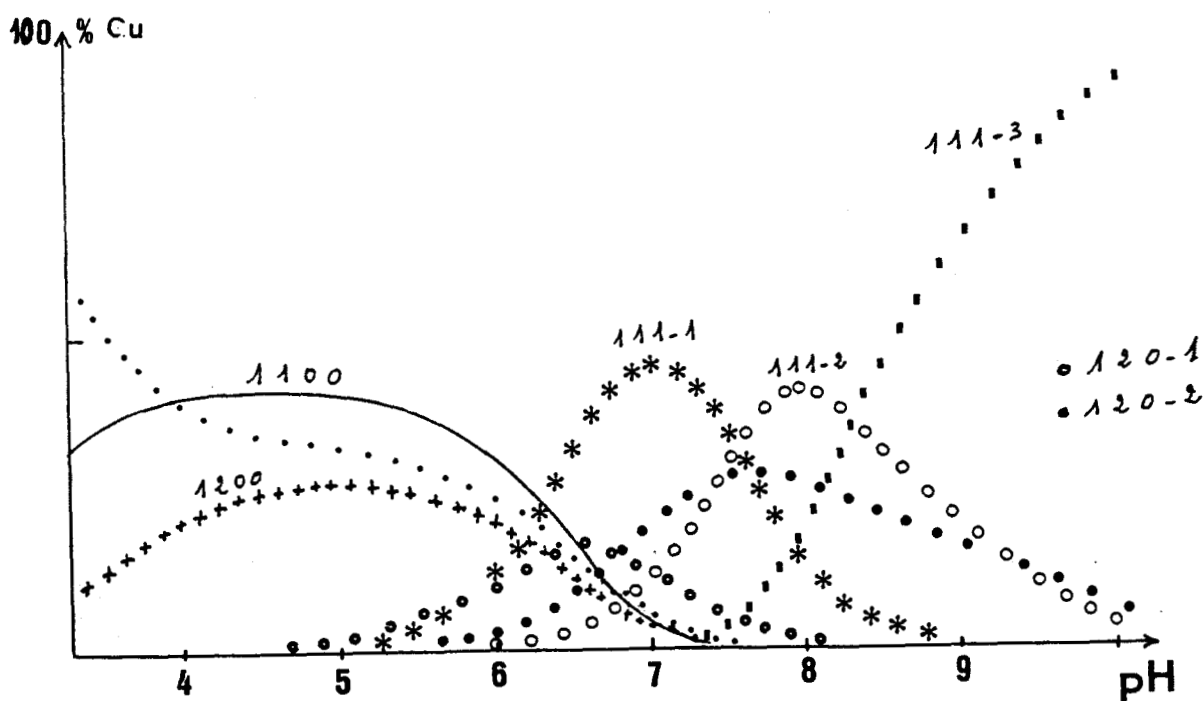
Les résultats spectroscopiques (R.P.E et dichroïsme circulaire) permettent de proposer un modèle de coordination qui prend en compte la formation de trois complexes ternaires, les complexes cuivriques de l'acide lactobionique étant présents en milieu acide ($\text{pH} < 6$).

III - Résultats potentiométriques

Les titrations ont été réalisées avec des solutions d'acide lactobionique de concentration égale à $10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$. Les rapports de concentration acide lactobionique/D-glucosamine/cuivre sont 5/1/1 et 8/1/1. Nous avons vérifié que les ligands acide lactobionique et D-glucosamine ne réagissent pas entre eux.

L'exploitation des courbes de neutralisation a permis de calculer les constantes de stabilité des différents complexes en solution.

Figure 56 : Courbes de répartition des espèces pour le système ternaire en fonction du pH.



La courbe de répartition des espèces (fig. 56) montre l'existence de sept espèces : (1 1 0 0), (1 2 0 0), (1 2 0 -1), (1 1 1 -1), (1 2 0 -2), (1 1 1 -2) et (1 1 1 -3). Les constantes de formation de ces complexes sont reportées dans le tableau 16.

Tableau 16 : Constantes de stabilité ($\log \beta$) pour les espèces complexes observées dans le système ternaire Cu(II)-acide lactobionique - D-glucosamine.

M	L	G	H	$\log \beta$
1	1	0	0	3.1 (0.03) ¹
1	2	0	0	5.9 (0.04)
1	2	0	-1	-0.43 (0.02)
1	1	1	-1	2.14 (0.09)
1	2	0	-2	-7.05 (0.07)
1	1	1	-2	-5.33 (0.11)
1	1	1	-3	-13.64 (0.12)

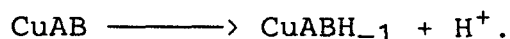
1 : déviation standard

Le lactobionate et le dilactobionate de cuivre sont présents dès pH 3 ($\approx 45\%$ à pH = 5). L'espèce ternaire 1 1 1 -1 apparaît à partir de pH = 5. Elle est majoritaire à pH = 7 ($\approx 50\%$). Cette espèce se forme au détriment du lactobionate ou dilactobionate de cuivre dont la concentration décroît à partir de pH = 5. L'espèce 1 1 1 -2 se forme à partir de pH 6. Elle est majoritaire à pH = 8, mais ne dépasse jamais 40%. Ce complexe par déprotonation conduit à l'espèce 1 1 1 -3 à partir de pH = 7.5. Celle-ci reste seule en solution après pH = 10.

Contrairement aux complexes binaires, les espèces ternaires sont présentes dans le milieu naturel et peuvent intervenir dans des mécanismes biologiques. Une étude statistique du système Cu(II)-lac-glu montre que le complexe ternaire Cu(lac)(glu)H₂ a une forte probabilité d'existence. L'étude expérimentale de Cu(II)-lac-glu a nécessité l'étude préliminaire des deux systèmes Cu(II)-lac et Cu(II)-glu.

La complexation commence aux alentours de pH = 3 avec la formation de CuA et CuA₂ (A = acide lactobionique), leur existence est confirmée par spectrométrie R.P.E. ($g// = 2.364$ et $A// = 130.10^{-4} \text{ cm}^{-1}$) ainsi que par les résultats dichroïques.

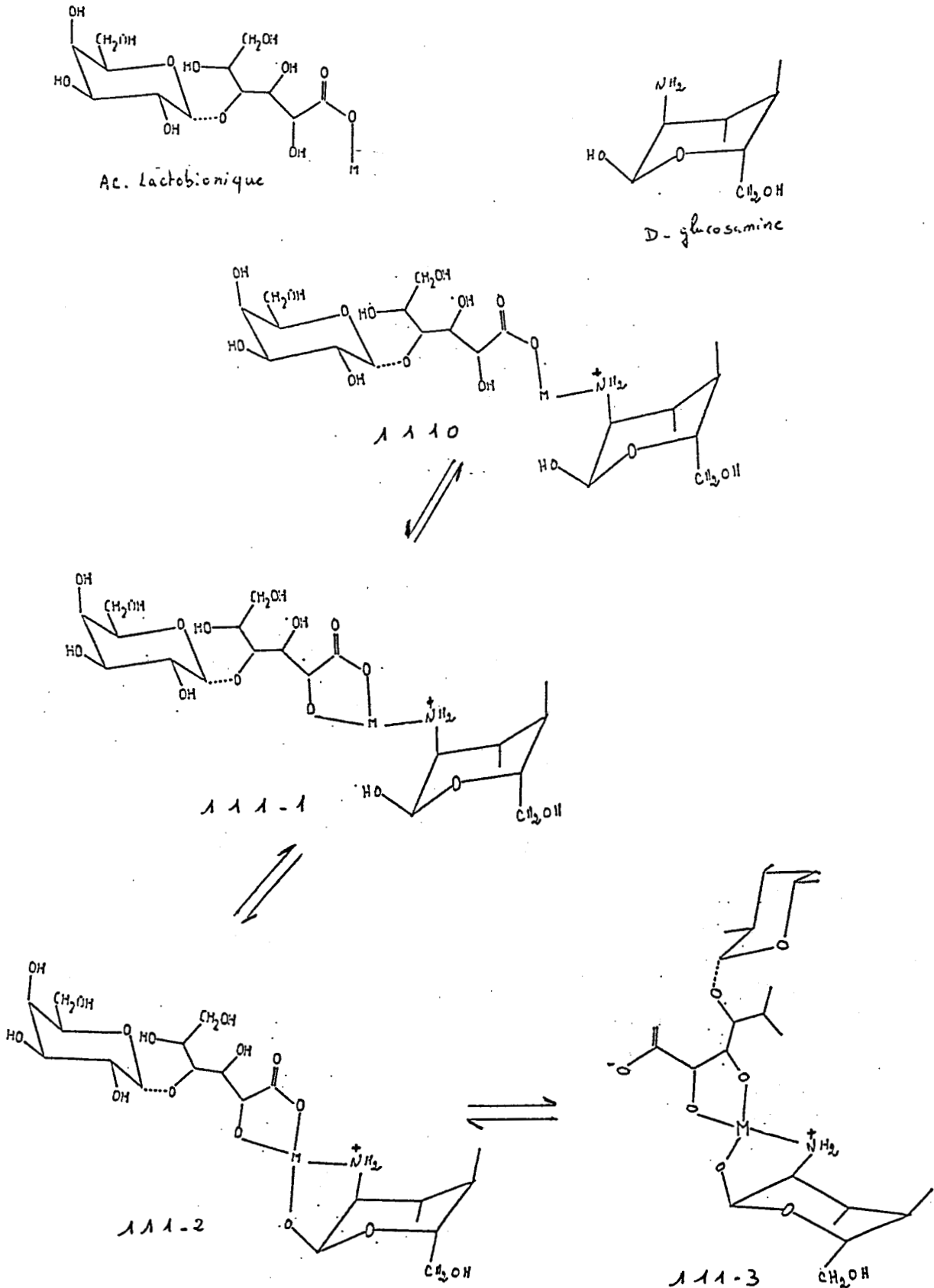
Au-delà de pH = 5.5, La première espèce mixte 1 1 1 -1 se formerait à partir du complexe CuA en deux étapes ; la première consisterait en la fixation d'une molécule de D-glucosamine sur l'atome de cuivre par l'intermédiaire de la fonction aminée, elle conduirait à la formation de CuAB (1 1 1 0). La deuxième étape consisterait en une déprotonation suivant le schéma :



Cette déprotonation pourrait concerner soit l'hydroxyle en C₂ du sucre acide, soit celui en C₁ du sucre aminé. A pH 5.5, pour le système Cu(II)-acide lactobionique, l'espèce CuA₂H₋₁ se forme par déprotonation de CuA₂, par contre pour Cu(II)-D-glucosamine, il faut atteindre pH = 6 pour que le complexe CuB₂H₋₁ apparaisse suite à une déprotonation de l'espèce 1 2 0. On peut donc raisonnablement penser que la déprotonation conduisant au complexe 1 1 1 -1 se fait par l'intermédiaire d'un groupement hydroxyle de l'acide lactobionique. Le complexe CuABH₋₁ comporterait un cycle à cinq chaînons (COO⁻, O⁻) formé entre le métal, le sucre acide et faisant intervenir une liaison Cu-N sur le sucre aminé. Au-delà de pH 6, aurait lieu la déprotonation de l'hydroxyle en C₁ de la D-glucosamine et la formation de l'espèce 1 1 1 -2 qui comporterait deux cycles à cinq chaînons, le premier (COO⁻, O⁻) avec l'acide lactobionique et le second (NH₂, O⁻) avec le D-glucosamine (fig. 57). Ce complexe mixte CuABH₋₂ a une constante de formation $\log \beta = -5.33$ qui est proche de la valeur théorique déterminée par l'étude statistique

($\log \beta \approx -6$). Cette stabilité plus importante que prévu est sans doute due à des effets stériques, la molécule de D-glucosamine étant moins volumineuse que celle de l'acide lactobionique.

Figure 57 : processus de complexation du système ternaire Cu(II)-acide lactobionique -D-glucosamine.



A partir de $\text{pH} = 7$, la concentration de l'espèce $1\ 1\ 1\ -2$ domine (environ 40 % à $\text{pH} 8$). En effet, à ce pH , la liaison $\text{Cu(II)} - \text{carboxylate}$ se défait aisément et c'est un hydroxyle déprotoné en C_2 sur la molécule de sucre qui viendrait se fixer sur le cuivre pour donner le complexe $1\ 1\ 1\ -3$ dont le mode de coordination serait $[(\text{O}^-, \text{O}^-) ; (\text{NH}_2, \text{O}^-)]$. La structure obtenue serait formée de deux cycles à cinq chaînons thermodynamiquement stables (fig. 57).

Les espèces binaires $1\ 2\ 0$; $1\ 2\ -1$ et $1\ 2\ -2$ avec l'acide lactobionique existent en faible proportion ($\approx 15\%$ à $\text{pH} \approx 6.5$ pour $\text{CuL}_2\text{H}_{-1}$ et inférieur à 30 % à $\text{pH} \approx 7.5$ pour $\text{CuL}_2\text{H}_{-2}$).

CONCLUSION

Le principal objectif de ce travail a été de situer le pouvoir de coordination de l'acide lactobionique vis-à-vis des ions métalliques d'intérêt thérapeutique par rapport à d'autres sucres acides plus communément utilisés.

Nos travaux se sont notamment caractérisés par l'utilisation concertée de différentes techniques spectroscopiques et électrochimiques. En particulier la spectroscopie d'absorption, le dichroïsme circulaire et la résonance paramagnétique électronique, ainsi que des méthodes potentiométriques et polarographiques. Les premières interviennent pour caractériser l'environnement chimique de l'ion complexé, les secondes, par le biais de techniques de modélisation permettent d'établir la stabilité des complexes formés.

Lors de l'étude de la coordination de l'acide gluconique par le cuivre (II), les résultats obtenus par M. Vicedomini (19) ne confirment pas ceux de Pecsok (18). Ceci pourrait provenir de la non prise en compte de l'équilibre de dé lactonisation au cours de leurs travaux. Dans une première partie, nous avons alors étudié l'équilibre entre l'acide lactobionique et sa δ -lactone ainsi que la cinétique de cette réaction. Ce travail a été réalisé par potentiométrie et nous a permis de déterminer la constante d'acidité du sucre acide ainsi que sa proportion exacte en solution. Ces résultats sont nécessaires pour l'étude de la coordination des ions métalliques avec l'acide lactobionique. La constante d'équilibre et les constantes vitesses ont aussi été établies.

La seconde partie de notre travail a porté sur le pouvoir chélatant de l'acide lactobionique avec les ions cuivriques et

oxovanadium (IV) en solution aqueuse à 25°C. En solution acide, on observe la formation des lactobionates métalliques (ML_2) pour les deux systèmes. Chacune des molécules de sucre est liée à l'ion métallique par son groupement carboxyle déprotoné, les complexes ML_2 possèdent un caractère ionique marqué. Pour des pH supérieurs à 5, la déprotonation des lactobionates conduit à la formation des complexes ML_2H_{-1} , ML_2H_{-2} et ML_2H_{-4} auxquels s'ajoute le complexe ML_2H_{-3} dans le cas du système VO(IV)-acide lactobionique. Les sites de complexation dans les complexes ML_2H_{-1} et ML_2H_{-2} sont les groupements déprotonés carboxyle (COO^-) et hydroxyle vicinale (O^-). Ils comportent alors un ou deux cycles (COO^- , O^-) à cinq chaînons stabilisant. En milieu plus alcalin, l'intervention des groupements hydroxyles en C3 sur une ou deux molécules d'acide lactobionique conduit à la formation des espèces CuL_2H_{-4} ou $VO_2L_2H_{-3}$ et $VO_2L_2H_{-4}$ selon les systèmes. Il y a formation de cycles (O^- , O^-) au détriment des cycles (COO^- , O^-). Le groupement carboxylique agit comme un site d'ancrage. Nos résultats montrent que les complexes cuivriques de ce sucre acide sont considérablement plus faibles en stabilité (2 à 8 en ordre de grandeur) que leurs homologues du vanadyle(IV).

La dernière partie a consisté en l'étude du système ternaire cuivre(II)-acide lactobionique-D-glucosamine. L'étude préalable du système binaire Cu(II)-D-glucosamine s'est révélée nécessaire. Ce sucre aminé est un agent complexant efficace des ions cuivriques avec lesquels il forme des complexes stables dans la zone de pH compris entre 5.5 et 10. Les complexes majeurs pour ce système sont $Cu(glu)_2$ et $Cu(glu)_2H_{-2}$. Pour le premier complexe, le site de complexation est l'azote du groupement aminé de la molécule de ligand. L'existence des espèces $Cu(glu)_2$ et $Cu(glu)_2H_{-2}$ (obtenue par déprotonation du complexe $Cu(glu)_2$) implique la participation des groupements hydroxyles du sucre aminé avec formation de chélates à cinq chaînons stabilisants.

Une étude statistique relative à l'existence de complexes ternaires révèle une forte probabilité de présence d'espèces mixtes. La modélisation effectuée sur la base des résultats

spectroscopiques et potentiométriques a permis de conclure à la formation de trois complexes ternaires à partir de $\text{pH} = 5.5$. Le complexe $\text{Cu}(\text{lac})(\text{glu}) \text{H}_{-1}$ pourrait se former à partir du lactobionate ou du dilactobionate de cuivre sur lequel vient se fixer l'azote de la fonction aminée de la D-glucosamine ainsi qu'un groupement hydroxyle déprotoné. Ce complexe est stable et prépondérant dans l'intervalle de pH compris entre 6 et 8 correspondant au milieu naturel. Dans la zone de pH acide ($\text{pH} < 6$) ce sont les complexes cuivriques binaires de l'acide lactobionique qui prédominent.

Les résultats portant sur la coordination de l'acide lactobionique avec les ions cuivre(II) et oxovanadium(IV), indiquent une forte stabilité des complexes formés. Malgré des modes de liaisons ligand-métal identiques, les constantes de stabilité des complexes de ces deux ions métalliques avec l'acide lactobionique sont considérablement plus importantes que celles des complexes correspondants des acides uroniques. En effet, les complexes cuivriques sont de l'ordre de cent fois plus stables. Avec l'oxovanadium(IV) la différence est encore plus marquée (jusque 1000 fois plus forts). Une des raisons de cette plus grande stabilité est la différence structurale entre les deux molécules de sucre. La structure des sucres uroniques est cyclique, celle de l'acide lactobionique (comportant un fragment linéaire plus flexible qui se lie à l'ion métallique), permet la formation stériquement plus aisée, de cycles à cinq chaînons autour du métal. Et ceci aussi bien dans le cas de l'ion cuivrique que dans celui du vanadyle.

L'acide lactobionique et ses dérivés, peuvent ainsi être utilisés comme agents chélatants dans l'alimentation ou dans d'autres applications de la chimie nutritionnelle, ainsi qu'en pharmacologie. A $\text{pH} 7$, le complexe majoritaire est l'espèce métallique ML_2H_{-2} où chaque molécule de ligand est liée à l'ion métallique par les groupements donneurs (COO^- , O^-). Ces ligands sont sans danger pour les systèmes vivants, et ils peuvent contrôler la distribution du métal dans l'organisme en étant administrés en présence d'ions métalliques par l'intermédiaire du lait par exemple.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) - T.G. AALBERS, J.P.V. HOUTMAN ET B. MAKKINK.
Trace Elements in Medicine. 5, 114 (1988).
- (2) - J.M. WALSHA.
J. Brit Hospital Med. 91, 248 (1970).
- (3) - E. HAC ET I. GAGALO.
Pol. Pharm. 39, 219 (1987).
- (4) - I. ZAY, F. GAIZER ET K. BURGER.
Inorg Chim. Acta. 80, L9 (1983).
- (5) - J.N. CAPE, D.H. COOK ET D.R. WILLIAMS.
J. Chem. Soc., Dalton Tran. 1849 (1974).
- (6) - J.G. VELASCO, J. ORTEGA ET J. SANCHO.
An. Quin. 71, 706 (1975).
- (7) - J.G. VELASCO, J. ORTEGA ET J. SANCHO.
An. Quin, 72, 743 (1976).
- (8) - J.G. VELASCO, J. ORTEGA ET J. SANCHO.
J. Inorg. Nucl. Chem. 38, 889 (1976).
- (9) - M.L. BANON, J. ORTEGA ET J. SANCHO.
J. Electroanal. Chem. 78, 173 (1977).
- (10) - M. BRANCA, G. MICERA, A. DESSI ET H. KOZLOWSKI.
J. Chem. Soc., Dalton Trans. 1283 (1989).
- (11) - G. MICERA, A. DESSI, H. KOZLOWSKI, B. RADOVSKA,
J. URBANSKA, P. DECOCK, B. DUBOIS ET I. OLIVIER.
Carbohydrate Research. 188, 25-34 (1989).
- (12) - Z. TAMURA ET M. MIYAZAKI.
Chem Pharm. Bull. 13, 333 (1965).
- (13) - L. NAGY, T. YAMAGUCHI, M. NOMURA, T. PALI ET H. OHTAKI.
Inorg. Chim. Acta (1990).
- (14) - Z. TAMURA ET M. MIYAZAKI.
Chem. Pharm. Bull. 13, 345 (1965).
- (15) - Z. TAMURA ET M. MIYAZAKI.
Chem. Pharma. Bull. 13. 387 (1965).

- (16) - G. MICERA, S. DEIANA, A. DESSI, P. DECOCK, B. DUBOIS ET H. KOZLOWSKI.
Inorg. Chim. Acta. 107, 45 (1985).
- (17) - D.T. SAWYER.
Chem. Rev. 64, 633 (1964).
- (18) - R.L. PECSOK ET R.S. JUVET.
J. Am. Chem. Soc. 77, 202 (1955).
- (19) - M. VICEDOMINI.
J. Coord. Chem. 12, 307 (1983).
- (20) - R. GOOD ET D.T. SAWYER .
Inorg. Chem., 15, 1427 (1976).
- (21) - E. LLOPIS, J.A. RAMIREZ ET A. CERVILLA.
Transition Met. Chem. 11, 489-494 (1986).
- (22) - F. TALANICO ET M. VICEDOMINI.
Ann. Chim. 71, 97 (1981).
- (23) - L.K. AGARWAL ET D.S. JAIN.
J. Indian. Chem. Soc. 57, 309 (1980).
- (24) - W.F. SHIPE, R. BASETTE, D.D. DEANE, W.L. DUNKLEY,
E.G. HAMMOND, W.J. HARPER, D.H. KLEYN, M.E. MORGAN,
J.R. NELSON ET R.A. SCANLON.
J. Dairy Sci. 61, 855 (1978).
- (25) - C.F. WANG ET R.L. KING.
J. Food Sci. 38, 938 (1973).
- (26) - D.A. FORSS, E.G. PONT ET W.J. STARK.
J. Dairy Res. 22, 91 (1955).
- (27) - D.A. FORSS, E.G. PONT ET W.J. STARK.
J. Dairy Res. 22, 345 (1955).
- (28) - J. HEGENAUER, P. SALTMAN, D. LUDWIG, L. RIPLEY ET
P. BAJO.
J. Agric. Food. Chem. 27, 860 (1979).
- (29) - J. HEGENAUER, P. SALTMAN ET D. LUDWIG.
J. Agric. Food. Chem. 868 (1979).
- (30) - K.M. DOWNEY ET D.M. CHAPUT DE SAINTONGE.
Brit. J. Clin. Pharm. 21, 295 (1986).
- (31) - M. RONGQUI, W. LIANGSHAN ET Z. WEISHU.
Yaoxue Tongbao. 20, 206 (1986).
- (32) - S.K. DUTTA ET K.S. BASU.
U.S. Patent. 4, 137, 397.

- (33) - R.L. PARSON.
J. Int. Med. Res. Suppl. 2, 15 (1980).
- (34) - TEIJIN .
Kokai Tokkyo Koho. Jp. 58, 117, 905 (1983).
- (35) - R.A.A. MUZZARELLI.
Natural Chelating Polymers, Pergaman Press, Oxford
(1973).
- (36) - A.B.P. LEVER.
Inorganic Electronic Spectroscopy Elsevier Publishing
Compagny. (1968).
- (37) - F.A. COTTON ET G. WILKINSON.
Advanced Inorganic Chemistry 4th. edition, Wiley
Interscience, N.Y.
- (38) - N.D. CHASTEEN, IN L.J. BERLINER AND J. REUBEN (EDS).
Biological Magnetic Resonance. Vol. 3. Plenum Press,
N.Y. (1981), pp. 53-119
- (39) - P. CRABBE.
Application de la dispersion rotatoire et du dichroïsme
circulaire optique en chimie organique. Ed. Gauthier.
Villars, Paris.(1968)
- (40) - F. CIARDELLI ET P. SALVADORE.
Optical Rotary Dispersion and Circular Dichroïsme. Ed.
Heyden
- (41) - H. KOZŁOWSKI, J.P. AUBERT, M. GUSSE, P. CHEVALIER ET
M.H. LOUCHEUX-LEFEBVRE.
Biopolymers. 28, 1241 (1984)
- (42) - P.F. KNOWLES, D. MARSH ET H.W.E. RATTLE.
Magnetic Resonance of Biomolecules. John Wiley Sons.
Ed. (1976)
- (43) - G. FORMICKA-KOZŁOWSKA, H. KOZŁOWSKI ET
B. JEROWSKA-TRZEBIATOWSKA.
Inorg Chem. Acta. 25, 1 (1977)
- (44) - P. GANS, A. SABATINI ET A. VACCA.
J. Chem. Soc. Dalton Trans. 1195 (1985)
- (45) - B. SARKAR ET T.P.A. KRUCK.
Can. j. Chem. 51 (21), 3451 (1973)
- (46) - G. GRAN.
Acta Chim. Scand. 4, 559 (1950)

- (47) - G. GRAN.
Analyst. 77, 661 (1952)
- (48) - A.D. ZUBERBUHLER ET T.A. KADEN.
Talanta. 29, 201 (1982)
- (49) - A. LAOUNAN ET E. SUET.
Talanta. 32, 245 (1985)
- (50) - I. OLIVIER.
Thèse. U.S.T.L. (1990)
- (51) - D.T. SAWYER ET J.B. BAGGER.
J. Am. Chem. Soc. 81, 5302 (1959)
- (52) - S.K. DUTTA ET S.K. MUKHERJEE.
Indian Journal of Chem. Vol. 9, 229-232 (1971)
- (53) - S.N. DEMING ET S.L. MORGAN.
Anal. Chem. 278 A, 45 (1973)
- (54) - H. SIGEL.
Metal ion in Biological Systems. Vol. 12. Properties of
Copper (1981)
- (55) - J.A. RENDELMAN JR.
Adv. Chem. Ser. 117, 51 (1973)
- (56) - B. SARKAR, P. SALTMAN, S. BENSON ET A. ADAMSON.
J. Inorg. Nucl. Chem. 26, 1551 (1964)
- (57) - J. LEVIVREY, B. DUBOIS, P. DECOCK, G. MICERA,
J. URBANSKA ET H. KOZLOWSKI.
Inorg. Chim. Acta. 125, 187-190 (1986)
- (58) - L. NAGY, I. HORVATH ET K. BURGER.
Inorg. Chim. Acta. 107, 179 (1985)
- (59) - G. MICERA, S. DEINA, A. DESSI, A. PUSINO ET G. GESSA.
Inorg. Chim. Acta. 100, 49 (1987)
- (60) - D.D. DE FORD ET D.N. HUME
J. Am. Chem. Soc. 73, 5321 (1951)
- (61) - H. KOZLOWSKI, P. DECOCK, I. OLIVIER, G. MICERA,
A. PUSINO ET L. PETTIT.
Carbohydrate. Res. 197, 109 (1990)
- (62) - B. RADOMSKA, H. KOZLOWSKI, P. DECOCK, B. DUBOIS ET
G. MICERA.
J. Inorg. Biochem. 33, 153 (1988)

- (63) - C. LIVERA, L.D. PETTIT, M. BATAILLE, J. KREMBEL, W. BAL ET H. KOZLOWSKI.
J. Chem. Soc. Dalton Trans. 1357 (1988)
- (64) - B. DECOCK-LE REVEREND, L.A. ANDRIANAJAONA, C. LIVERA, L.D. PETTIT, I. STEEL ET H. KOZLOWSKI.
J. Chem. Soc. Dalton Trans. 2221 (1986)
- (65) - L.D. PETTIT ET J.L.M. SWASCH.
J. Chem. Soc., Dalton Trans. 286 (1978)
- (66) - J. LERIVREY, B. DUBOIS, P. DECOCK, G. MICERA ET H. KOZLOWSKI.
Inorg. Chim. Acta. 125, 187 (1986)
- (67) - C. GESSA, M.L. DE CHERCHI, A. DESSI, S. DEIANA ET G. MICERA.
Inorg. Chim. Acta. 80, L53 (1983)
- (68) - M. BRANCA, G. MICERA, D. SANNA, A. DESSI ET H. KOZLOWSKI.
J. Chem. Soc., Dalton Trans. 1997 (1990)
- (69) - M.L. SIMOENS GONCALVES ET A. M. MOTA.
Talanta. 34 (10), 839 (1987)
- (70) - F.J. STEVENSON.
J. of Environ. Qual., (1972), 1 (4), 333.
- (71) - J.M. BREMMER.
Soil Biochem. Eds M. DEKKER, NewYork (1967)
- (72) - L. BENZING-PURDIE.
Soil Sci. Soc. Am. J. 48, 219 (1984)
- (73) - J.W. PARSONS.
Soil Biochem. Eds M. DEKKER, NewYork (1981)
- (74) - F.J. STEVENSON.
Nitrogen in Agricultural Soils Agronomy, 20, 67 (1982)
- (75) - Y. INAKI, M. OTSURU ET M. TAKEMOTO.
J. Macromol. Sc. Chem., A12, 953 (1978)
- (76) - G. FORMICKA-KOZLOWSKA, H. KOZLOWSKI, J.Z. SIEMION K. SOBCZYK ET E. NEWROCKA.
J. Inorg. Biochem., 15, 201 (1981)
- (77) - P. COCETTA, S. DEIANA, L. ERRE, G. MICERA ET P. PIU.
J. Coord. Chem., 12, 213 (1983)

- (78) - Y. MARCUS ET I. ELIEZER.
Coord. Chem. Rev., 4, 273 (1969)
- (79) - H. SIGEL.
Chimia, 21, 489 (1967)
- (80) - H. SIGEL.
Angew - Chem. Int., Edit. , 14, (6), 394 (1975)
- (81) - H.L. STUART ET J. COLIN.
Inorg. Chim. Acta., 78, 225-228. (1983)

Copper(II) Complexes of Lactobionic Acid. Lactone-Acid Equilibrium and Proton Dissociation

Saad Bouhsina, Patrick Decock, Henryk Kozlowski,
Giovanni Micera, and Jolanta Swiatek

SB, PD. *Laboratoire de Chimie Minerale et Methodologie Analytique, Universite de Lille I, France*—HK. *Institute of Chemistry, University of Wroclaw, Poland*—GM. *Istituto di Chimica Generale e Inorganica, Universita di Sassari, Sassari, Italy*—JS. *Department of Basic Medical Sciences, Medical Academy, Wroclaw, Poland*

ABSTRACT

Potentiometric, polarographic, and spectroscopic data allowed us to establish the coordination equilibria in the Cu(II) lactobionic acid system. At lower pH regions the equilibrium between acid and lactone forms is also described. The stability constants of the cupric species are about a hundred or more times higher when compared to the galacturonic acid complexes, although the coordination modes in both systems are exactly the same. The obtained results clearly indicate that lactobionic acid is a very efficient chelating agent for metal ions most likely due to secondary interactions between protonated hydroxyl groups and metal ions, as well as possible interligand interactions. These interactions are likely to favor lactobionic acid rather than uronic acids, due to its higher flexibility.

INTRODUCTION

In biological systems, the importance of complex formation between saccharides and related compounds and transition metal ions has become increasingly important over recent years. Aldobionic acids are fluently used in medical [1-4] and agricultural fields [5]. This use is attributed to their properties of chelating metal ions of therapeutic importance. The copper and iron complexes of lactobionic acid also play an important role in the food chemistry involving milk consumption and the supplemental iron and copper [6-8]. Our earlier work with uronic acids [9] has shown that cyclic sugar acids are rather ineffective ligands for cupric ions and, e.g., amino sugars are much better alternatives [10-12]. To understand the possible role

Address reprint requests to: Professor H. Kozlowski, Institute of Chemistry, University of Wroclaw, F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wroclaw, Poland.

Journal of Inorganic Biochemistry, 42, 57-65 (1991)

57

© 1991 Elsevier Science Publishing Co., Inc., 655 Avenue of the Americas, NY, NY 10010 0162-0134/91/\$3.50

of lactobionic acid as the chelating agent for copper(II) we have undertaken the potentiometric and spectroscopic studies on this system and the results are presented in this communication.

During the study of the proton and metal ion coordination reactions with lactobionic acid (LH), we have observed slow (about 3 hr) pH variation after addition of base. Since the proton or, e.g., Cu(II) coordination to sugar acids is usually a very fast process, the pH changes should be caused by the chemical reaction in which lactobionic acid is produced. Since this process is observed at pH below 6 it may influence the protonation constant calculation of the carboxylate function ($pK_a < 4$) as well as the evaluation of the stability constants of metal complexes with lactobionic acid. The mentioned process is most likely the lactone-acid reaction which occurs in acidic solutions and some preliminary results have been published [13]. To describe this system more precisely we have decided to quantitatively follow the details of the acid-lactone-salt reaction. After quantitative evaluation of the kinetics of this reaction the stability constants of copper(II) complexes are also calculated.

EXPERIMENTAL

D-Lactobionic acid was obtained from Fluka and used without purification. Its purity was checked by potentiometry.

Spectroscopic Measurements

EPR measurements were carried out on a Varian E-9 spectrometer at the x-band frequency (9.15 GHz) at 120 K. Absorption spectra were recorded on a Uvidec Jasco 610 spectrophotometer and CD spectra on a Jobin Yvon Mark III spectropolarimeter. The solutions containing $0.001 \text{ mol dm}^{-3}$ of metal ion and metal to ligand molar ratios of 1:3 and 1:5 were used for the spectroscopic measurements.

Potentiometric Studies

Kinetic studies were performed for the solutions containing $2 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ of lactobionic acid. The pH was recorded every 1 min after preparation of solution for about 40 min (data included in the calculations). The initial pH varied from 3.89 (no base added) to 5.6 (with NaOH added). The pH value decreased during the experiment to about 3.5 in the former case and to 4.3 in the latter solution (see Fig. 1). The final pH value was checked three hr after the mixing of reagents. The experiment was performed for metal-free ligand and the solutions containing Cu(II)-lactobionic acid (1:3 molar ratio) system. The effect of Cu(II) ions on the pH value variations was found to be negligible. Nine curves presenting pH variation with time were used to evaluate the kinetic parameters for lactobionic acid-lactone-salt reaction.

The titrations were performed at 25°C with Tacussel ISIS 2000 pH-meter equipped with a TB 10/HA glass electrode and a calomel saturated reference electrode. All titrations were carried out under argon and constant ionic strength, $0.1 \text{ M (KNO}_3)$. Pure cupric chloride was used to obtain stock solution (0.2 mol dm^{-3}) of Cu(II) that was checked by titration with EDTA. The potentiometric titration for evaluation of the copper(II) stability constants were carried out by two different methods. In the first experiment (method 1) the titration was performed within small pH ranges (3.8–3.9, 3.87–4.85, 4.57–5.88, 5.59–7.51, and 7.21–10.5). The titration was performed within a short period of time with the solution with fixed starting pH (after lacton-acid equilibrium was reached, 3 hr after mixing of reagents). The ligand

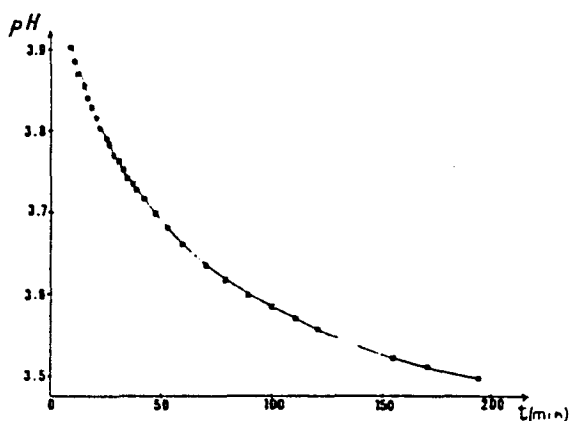


FIGURE 1. Dependence of pH vs time for solutions containing metal-free lactobionic acid (2×10^{-3} mol dm $^{-3}$) starting at the moment of ligand dissolution.

concentration was evaluated for the starting pH using kinetic parameters. The obtained values were: 1.805×10^{-3} (pH 3.3), 1.887×10^{-3} (pH 3.87), 1.95×10^{-3} (pH 4.57), and 1.973×10^{-3} mol dm $^{-3}$ (pH 5.59) for the total amount of dissolved ligand 2×10^{-3} mol dm $^{-3}$. The other titrations (method 2) were carried out continuously starting at pH 4.5 until pH 10.5 was reached within the shortest time necessary to perform the titrations. The concentration of the acid form of ligand was assumed as that for pH 4.5 and not corrected for the other pHs. The 1:3 and 1:5 metal to ligand molar ratios were used in the experiments. The stability constants were calculated with the SUPERQUAD computer program [14]. The standard deviations quoted were computed by SUPERQUAD and refer to random errors only. They give, however, a good indication of the importance of the particular species in the equilibrium. The final test of the accepted equilibrium model was the agreement between potentiometric and spectroscopic data. The other comments about calculations are given in Table 1.

Polarographic Measurements

Differential pulse polarographic measurements were carried out on a PP04 polarographic analyzer (TELPOD, Krakow). The three-electrode system comprised a drop mercury electrode, a platinum counter electrode, and a saturated calomel electrode. A scan rate of 20 mV s $^{-1}$, pulse amplitude of 20 mV, and a potential range +0.15 to -0.80 V were applied. Deoxygenated solutions with ionic strength 0.5 M (KNO $_3$) were measured at 25°C. The metal to ligand molar ratios used during the measurements were 1:1 to 1:500 at pH 5.0. The stability from the polarographic data were estimated by De Ford and Hume [20].

THEORY

Calculation of the Equilibrium Constants from the Titration Data

As mentioned above, D-lactobionic acid (LH) may undergo two reactions. For simplification we will use H $^+$ instead of H $_3$ O $^+$. Proton dissociation:



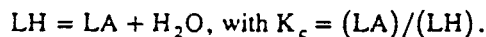
TABLE 1. Stability Constants ($\log \beta$) for Proton and Cu(II) Complexes with Lactobionic Acid

Cu	Species		Method 1	Method 2	D-GALA [9]
	L	H			
0	1	1	3.53	3.53	3.28
1	1	0		3.10*	1.80*
1	2	0	5.33 (0.035)*	5.90*	3.00*
1	2	-1	-0.61 (0.08)	-0.43 (0.11)	-3.02
1	2	-2	-7.28 (0.06)	-7.05 (0.08)	-10.06
1	2	-4	-27.51 (0.12)	-27.06 (0.13)	-29.69

*The data for D-galacturonic (D-GALA) acid are given for comparison. Stability constants for (110) and (120) species were calculated from polarographic data according to the De Ford, Hume method [20]. Standard deviations are given in parentheses.

*This value could be evaluated roughly using titration curves at lowest pH by method 1 (with rather large $\chi^2 = 10.49$ for very narrow pH range 3.8-4.5). Since the pH range considered is narrow and the presence of metal ions does not change the ligand deprotonation curves very distinctly, this evaluation is rather poor and the $\log \beta$ for 110 species could not be calculated with a reasonable level of confidence. None of these species could be evaluated from the data obtained in method 2 as at pH > 4.5 their concentrations are rather low (Fig. 2). The complication in the evaluation of stability constants at both species derives also from the fact that step-wise stability constants K_1 and K_2 are close to each other and the species concentration curves overlap closely. For the set of stability constants obtained in method 2 the $\chi^2 = 3.43$.

Transformation into lactone form (LA), scheme 1:

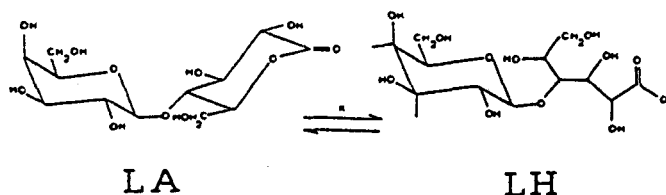


Assuming these reactions one can obtain the following relation:

$$v_b = \frac{1 + \frac{\frac{n_0}{(10^{-\text{pH}})} - VX}{K_a} (K_c + 1)}{N_b + X} \quad (1)$$

where $X = (10^{-\text{pH}}) - K_w / (10^{-\text{pH}})$ (K_w is an ionic product of water) and N_b is the concentration of the titrant; v_b , the volume of base added; V , initial volume of a solution, n_0 is the initial amount of sugar introduced.

The calculation of the K_a and K_c constants were performed with the program fitting two experimental parameters, v_b and pH, according to Eq. (1) using the SIMPLEX method.



SCHEME 1.

Calculation of the Kinetic Constants from the Titration Data

Kinetic study of acid-lactone-salt reaction was also performed to verify the calculations according to the above method. The velocity of the reaction:



can be expressed as:

$$v = -d(\text{LA})/dt = k(\text{LA})(\text{H}_2\text{O}) - k_-(\text{LH}). \quad (2)$$

Because

$$(\text{LA}) + (\text{LH})D = n_0/(V + v_b), \quad (3)$$

where

$$D = 1 + K_s/(\text{LH}).$$

From Eqs. (2) and (3) it can be seen that:

$$-d(\text{LA})/dt = K(\text{LA}) - k_-(C - (\text{LA}))/D \quad (4)$$

where

$$K = k(\text{H}_2\text{O}).$$

When equilibrium of the reaction is achieved the lactone concentration can be assumed to be constant:

$$(\text{LA}) = (\text{LA})_\infty$$

and Eq. (4) allows us to obtain

$$k_- = KD_\infty T \quad (5)$$

where

$$T = (\text{LA})_\infty / (C - (\text{LA})_\infty).$$

In the experimental conditions used in this work D_∞/D value can be assumed to be equal to 1 and Eq. (4) is simplified:

$$-d(\text{LA})/dt = K((\text{LA})(1 + T) - \text{TC}). \quad (6)$$

The latter equation can be easily integrated and the following time depending relation is obtained:

$$\ln((\text{LA})(1 + T) - \text{TC}) = -Kt + \ln((\text{LA})_0(1 + T) - \text{TC}). \quad (7)$$

Eq. (7) can be rewritten as:

$$\ln((\text{LA}) - (\text{LA})_\infty) = -Kt + \ln((\text{LA})_0 - (\text{LA})_\infty) \quad (8)$$

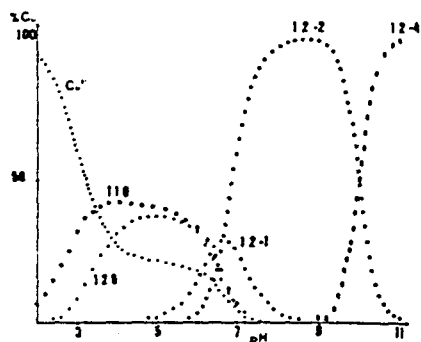


FIGURE 2. Species distribution curves for Cu(II) lactobionic acid (1:5 molar ratio and $c_{Cu} = 4 \times 10^{-4}$). The stability constants of (110) and (120) species was assumed to be that obtained from polarographic data (Table 1).

and

$$(LA) = C - (X + N_b v_b / (V + v_b)) (1 + (10^{-pH}) / K_a). \quad (9)$$

The program used calculates the (LA) values from the experimental data (pH) and represents the relation between $\ln((LA) - (LA)_\infty)$ and time using linear least-squares method (Fig. 2). From this it is possible to obtain the value of the initial concentration of lactone $(LA)_0$, by Eq. (10):

$$(LA)_0 = \exp(Y_0) + (LA)_\infty \quad (10)$$

where Y_0 can be obtained from Eq. (8) from $t = 0$. Modifying Eq. (10) one can get:

$$(LH)_0 = (C - (LA)_0) / (1 + K_a / 10). \quad (11)$$

RESULTS AND DISCUSSION

The K_c and K_a constants were calculated from the experimental data according to the theoretical consideration presented above. The average value of K_c obtained from the experiment is equal to 0.151 ± 0.006 , rate constant of lacton hydrolysis is equal to 1.2×10^{-4} , and the $\log K_a$ value ($\log \beta$ for 011 species) is given in Table 1. The obtained proton dissociation constant for carboxylate is slightly higher than that reported earlier [15] (about 0.2 log units). The amount of lacton formed in the studied solutions varied from 8.65% of total ligand concentration for starting pH = 3.3 to 0.15% for starting pH = 5.59. For pH 4.5, which was the lowest pH used for the continuous titrations of the Cu(II)-lactobionic acid system (see Experimental) the lacton concentration was equal to 1.3% of the total ligand. The evaluation of the copper(II) complex stability with lactobionic acid performed two different ways described in Experimental gives similar results (Table 1). The accepted model, including CuL_2H_{-1} , CuL_2H_{-2} , and CuL_2H_{-4} was decided on the basis of the spectroscopic data. The careful pH dependence of the EPR and CD spectra allowed us to choose the proper set of species. The titration data calculations lead to models, i.e., that mentioned above and the other with CuL_2H_{-3} instead of CuL_2H_{-4} , giving very close final output of errors and deviations. The comparison of the pH dependence of spectroscopic data until pH 12 and the species distribution curves assuming both of these two complexes led us to choose the latter species.

TABLE 2. The Spectroscopic Data and Coordination Modes for Cu(II)-Lactobionic Acid Complexes

Cu	Species		Coordination Mode	CD Spectra λ nm ($\Delta\epsilon$)	g_1	EPR A_{\parallel} (10^{-4} cm $^{-1}$)
	L	H				
1	1	0	(COO $^{-}$)	700 (-0.02) ^a	2.369	138
1	2	0	2 × (COO $^{-}$) ^e	777 (-0.04) ^b	2.370	127
1	2	-1	(COO $^{-}$), (COO $^{-}$, O $^{-}$)	657 (+0.02) ^c 657 (+0.02) ^c		
1	2	-2	2 × (COO $^{-}$, O $^{-}$)	700 (+0.08) ^b 560 (-0.02) ^c 284 (-1.15) ^d	2.290	158
1	2	-4	2 × (O $^{-}$, O $^{-}$)	765 (+0.06) ^b 600 (+0.11) ^c 280 (-1.80) ^d	2.283	184

^a B + E (d-d) transitions.

^b B (d-d) transitions.

^c E (d-d) transitions.

^d O $^{-}$ to Cu(II) transfer transitions.

^e Species (110) and (120) overlap with each other (Fig. 2) and their spectroscopic parameters are similar, so only one set of parameters could be given.

According to the calculations the formation of the CuL $_2$ H $_{-3}$ species takes place at pH more than 1 unit lower than the formation of the CuL $_2$ H $_{-4}$ complex. This does not agree with the pH variation of the spectroscopic parameters. The EPR parameters of the latter species obtained in this work are exactly the same as for the respective complex with the same binding mode, 2 × (O $^{-}$, O $^{-}$), with galacturonic acid [9]. The species distribution curves for the chosen model are presented in Figure 2. The stability of the CuL and CuL $_2$ species can be evaluated from the polarographic data with higher precision than that obtained with potentiometric fitting in the cases where the respective species concentrations are very low [9, 12] or as in the case considered here, the pH range used for calculations is very narrow. The stability constants of the CuL $_2$ species is also accepted by SUPERQUAD refinement in method 1 and the value is close to that found by polarographic measurements (Table 1).

The assignment of the spectroscopic data to the corresponding complex species is presented in Table 2. The coordination modes in the respective species are also indicated in Table 2. It is interesting to note that the coordination modes, as well as the complex set suggested above for the Cu(II)-lactobionic acid, is precisely the same as that assigned earlier for the Cu(II)-D-galacturonic acid [9]. The similarities are not surprising as both ligands can serve similar donor groups with carboxylate as an anchoring group having similar basicity. The stability constants, however, obtained for the two mentioned ligands are considerably different (Table 1), although the same experimental network and computer program were used for their evaluation. The stability constants of complexes with lactobionic acid are about two orders of magnitude or more higher than for the respective complexes of galacturonic acid. In the latter case titrations were performed for very high excesses of ligand (30-fold) to avoid the copper ion hydrolysis, while in the present work the 1:3 or even lower molar ratio solutions could be used to perform the experiment. One of the reasons there is a much higher stability of lactobionic acid complexes could be its higher

flexibility (of acid part) when compared to the cyclic structure of galacturonic ligand. The flexibility of the ligand molecule allows the protonated hydroxyl groups to interact directly with metal ions and to stabilize the formed species. This interaction may stabilize the (110) or CuL species which is more than 1.2 log units higher than the respective complex of uronic acids. The inter-ligand interactions via hydroxyl groups are also likely. These possibilities are seen in the CuL_2 species in which the monodentate coordination via carboxylates makes complexes more than a hundred times more stable than the complex with the same binding mode of galacturonic acid. In both cases the pK values of carboxyl group are very close to each other (Table 1). The involvement of the protonated hydroxyl groups in the stabilization of the formed metal complexes with sugar ligands was already suggested for Cu(II) amino sugar systems [18] although the stabilization effect was much lower than in the system discussed in this work. Some indications for more complicated involvement of ligand donors in metal ion binding derive from the EPR parameters. The value of A_{\parallel} for (12-1) or $\text{CuL}_2\text{H}_{-1}$ species is very low compared to, e.g., (120) or CuL_2 complex (Table 2). It indicates considerable distortion of the complex planarity. One of the ligand molecules in the (12-1) species is bidentately coordinated (Table 2) and the other one only via carboxylate. To lower symmetry the steric interactions between both ligand molecules are needed. This can be effective only when monodentately bound ligands involve the other protonated donors to bring bulky molecules close to metal ions.

The very high stability constants of the lactobionic acid copper complexes most likely are derived from the cooperative effect of more than one hydroxyl group involvement in the stabilization of the complex structure. This may explain why the flexible ligand is much more effective in increasing the formation constants than the more rigid cyclic structure of galacturonic acid.

Thus, lactobionic acid or its derivatives can be very useful as the natural chelating agents in alimentary or other applications in food chemistry. At pH around 7 the major complex is the chelate $\text{CuL}_2\text{H}_{-2}$ species in which two ligand molecules bind copper ion via (COO^- , O^-) donor set. These ligands are safe for the living systems and may control the metal administration by various ways, e.g., as a supplement to milk.

The CD results collected in Table 2 indicate that the appearance of the bond between Cu(II) and the deprotonated hydroxyl oxygen of sugar ligand (formation of $\text{CuL}_2\text{H}_{-1}$ and $\text{CuL}_2\text{H}_{-2}$ species) causes the creation of the charge transfer band around 280 nm. This energy region was usually reserved for the amino nitrogen to Cu(II) charge transfer transitions [16, 17] although the data obtained for Cu(II)-amino sugar complexes indicated the presence of more than one transition in this region [18]. The present data clearly indicate that the band at 280 nm may be assigned to O^- -Cu(II) charge transfer transition and can be used as the indication of the sugar metal bond formation involving deprotonated hydroxyl oxygens. In fact, the respective transitions from amino nitrogen of amino sugar ligands are centered at distinctly lower energies (300–320 nm) [18, 19]. The charge transfer bands centered at 300 nm reported earlier for Cu(II)-D-glucosamine [18] were relatively broad and they contained a clear shoulder around 280 nm. The latter transition can be now safely assigned to the O^- -Cu(II) charge transfer transition.

This work was supported by Region Nord Pas de Calais and the Polish Ministry of National Education (Project No. RP.II.13.1.5.).

REFERENCES

1. J. H. Southard and F. O. Belzer, *Eryobiology* 17, 540 (1980).
2. G. A. Dette and H. Knothe, *Biochem. Pharmacol.* 35, 959 (1986).
3. K. M. Downey and D. M. Chaput de Saintonge, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 21, 295 (1986).
4. M. Rongqui, W. Liangsham, and Z. Weishu, *Yaouxue Tongbao* 20, 206 (1985).
5. Teijin Ltd., *Kokai Tokyo Koho Jp* 58, 177, 905 (1983).
6. J. Hegenuer, P. Saltman, D. Ludwig, L. Ripley, and Ph. Bajo, *J. Agric. Food Chem.* 27, 860 (1979).
7. J. Hegenuer, P. Saltman, and D. Ludwig, *J. Agric. Food Chem.* 27, 868 (1979).
8. F. Scholnick and P. E. Pfefer, *J. Dairy Sci.* 63, 471 (1980).
9. G. Micera, A. Dessi, H. Kozlowski, B. Radomska, J. Urbanska, P. Decock, and I. Olivier, *Carbohydr. Res.* 188, 25 (1989).
10. H. Kozlowski, P. Decock, I. Olivier, G. Micera, A. Pusino, and L. D. Pettit, *Carbohydr. Res.* 197, 109 (1990).
11. B. Radomska, H. Kozlowski, P. Decock, B. Dubois, and G. Micera, *J. Inorg. Biochem.* 33, 153 (1988).
12. J. Urbanska and H. Kozlowski, *J. Coord. Chem.* 21, 175 (1990).
13. K. Dutta and S. K. Mukherjee, *Indian J. Chem.* 9, 229 (1971).
14. P. Gans, A. Sabatini, and A. Vacca, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1195 (1985).
15. L. Nagy, I. Horvath, and K. Burger, *Inorg. Chim. Acta* 107, 179 (1985).
16. C. Livera, L. D. Pettit, M. Bataille, J. Krembel, W. Bal, and H. Kozlowski, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1357 (1988).
17. B. Decock-Le Reverend, L. A. Andrianajaona, C. Livera, L. D. Pettit, I. Steel, and H. Kozlowski, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 2221 (1986).
18. G. Micera, S. Deiana, A. Dessi, P. Decock, B. Dubois, and H. Kozlowski, *Inorg. Chim. Acta* 107, 45 (1985).
19. J. Lerivrey, B. Dubois, P. Decock, G. Micera, J. Urbanska, and H. Kozlowski, *Inorg. Chim. Acta* 125, 187 (1986).
20. D. D. De Ford and D. N. Hume, *J. Am. Chem. Soc.* 73, 5321 (1951).

Received May 18, 1990; accepted September 19, 1990

VANADYL(IV) COMPLEXES OF LACTOBIONIC ACID: POTENTIOMETRIC AND SPECTROSCOPIC STUDIES

HENRYK KOZLOWSKI,^{1*} SAAD BOUHSINA,² PATRICK DECOCK,²
GIOVANNI MICERA³ AND JOLANTA SWIATEK⁴

¹ *Institute of Chemistry, University of Wrocław, F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław, Poland*

² *Laboratoire de Chimie Minérale et Methodologie Analytique, Université de Lille I, 59655 Villeneuve d'ASCQ, France*

³ *Dipartimento di Chimica, Università di Sassari, 07100 Sassari, Italy*

⁴ *Department of Basic Medical Sciences, Medical Academy, Wrocław, Poland*

(Received November 18, 1990)

Potentiometric and spectroscopic studies have shown that in the VO(IV)-lactobionic acid system five different species are involved in coordination equilibria. All complexes consist of one metal ion and two ligand molecules. Stability constants for the vanadyl complexes with lactobionic acid are considerably higher than those for uronic acids, although the donor atoms involved in metal ion coordination are exactly the same. The main reason for the higher stability of lactobionic acid complexes seems to concern its more flexible structure.

Keywords: VanadiumIV, D-lactobionic acid, stability constants, spectroscopy

INTRODUCTION

Saccharides are very effective chelating agents for many metal ions including vanadyl(IV).¹ The carboxylate group often acts as an anchor binding site but the major role in coordination is played by the deprotonated hydroxyl oxygen atoms. Although sugar acids produce oxovanadium(IV) by reaction with vanadate(V),^{2,3} their complexes with vanadyl ions have been rarely investigated.^{1,4,5}

Aldobionic acids are often used in medicine⁶⁻⁹ and agriculture.¹⁰ Their use is attributed to their chelating properties.⁶⁻¹³ Our recent work on the coordination of lactobionic acid to copper(II) has shown that this ligand binds metal ions very effectively. The complexes formed are more than one hundred times more stable than respective complexes of, e.g., uronic acids, although the binding modes are exactly the same in both ligands.¹⁴

In this work we present the results of potentiometric and spectroscopic studies on lactobionic acid with vanadyl(IV), an ion which usually forms much stronger complexes with sugar acids than does copper(II).¹

EXPERIMENTAL

D-Lactobionic acid was obtained from Fluka and used without further purification. Its purity was checked by potentiometry using the Gran method.¹⁵

* Author for correspondence.

Spectroscopic measurements

EPR spectra were recorded using a Varian E-9 spectrometer at 120 K (X-band, 9.15 GHz). Absorption spectra were recorded on a Uvikon 810P spectrophotometer and CD spectra on a Jobin-Yvon CNRS dichrographe III. Solutions containing $0.002 \text{ mol dm}^{-3}$ of metal ion and with a metal to ligand ratio of 1 : 5 were used for spectroscopic measurements.

Potentiometric measurements

Titration were performed at 25°C with a Tacussel ISIS 2000 pH meter equipped with TB 10/HA glass electrode and a saturated calomel reference electrode. All titrations were carried out under argon and at a constant ionic strength of 0.1 mol dm^{-3} (KNO_3). Carbonate-free 0.1 M NaOH was used as titrant. VO^{2+} -containing solutions were obtained by dissolving $\text{VOSO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ in water. Impurities (vanadium(V)) were removed with SO_2 . Oxovanadium(IV) chloride was prepared by the addition of barium chloride in stoichiometric amounts. The VOCl_2 solutions were standardized with KMnO_4 . In the solutions containing lactobionic acid the lactone-acid equilibrium alters the real concentration of the acid form. This concentration was evaluated using kinetic parameters obtained earlier.¹⁴ The stability constants were calculated with the SUPERQUAD program¹⁶ which allows for the simultaneous refinement of stability constants together with total ligand and total hydrogen concentrations. The standard deviations quoted were computed by SUPERQUAD and refer to random errors only. These give, however, a good indication of the importance of a particular species in the equilibrium.

TABLE I
Stability constants ($\log\beta$) for proton and VO(IV) complexes with *D*-lactobionic acid. Data for VO(IV)-*D*-galacturonic acid and Cu(II)-*D*-lactobionic acid are given for comparison.

Species M L H	lactobionic acid $\log\beta$		galacturonic acid ¹ $\log\beta$ VO(IV)
	VO(IV)	Cu(II) ¹⁴	
0 1 0	3.53		3.28
1 2 0	6.07 (0.003) ^a	5.46 ^b	
1 2-1	2.32 (0.003)	-0.43	0.47
1 2-2	-1.92 (0.006)	-7.05	-4.01
1 2-3	-10.31 (0.040)	^c	-12.98
1 2-4	-18.56 (0.130)	-27.06	-22.56

^a Standard deviations are given in parentheses. ^b This value was obtained from polarographic measurements. ^c This species was not observed with copper(II) ions.

RESULTS AND DISCUSSIONS

It has already been shown that, at acidic pH, lactobionic acid is in equilibrium with the lactone form. Without an anchoring carboxylate, the latter molecule is unable to coordinate metal ions and it should be excluded from the total ligand concentration for calculation purposes. Although the amount of the lactone form is low (8.65% at

pH 3.3 and 0.15% at pH 5.6) the equilibrium exchange rate is relatively slow and it influences pH readings considerably. Using results obtained earlier, the real concentration of the acid form was evaluated and used in the calculations. Lactobionic acid has one measurable protonation constant, $pK = 3.53$, Table I, assigned to the carboxyl function.

TABLE II
Spectroscopic data for the VO(IV)-D-lactobionic acid complexes and the assigned donor sets for the respective species.

Species VO L H	CD $\lambda_{nm}(\Delta\epsilon)$	Absorption $\lambda_{nm}(\epsilon)$	epr		
			g_{\parallel}	A_{\parallel}	$\times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$
1 2 0	730(+0.02)	780(21) 572(7)			A
1 2-1	700(+0.2) 565(-0.01) 530(+0.01)	770(19) 540(15) 395(14)	1.968	96 ^a	B
1 2-2	780(-0.01) 640(+0.06) 520(+0.025) 400(+0.03)	760(16) 622(19) 532(20) 392(26)	1.974	81	C
1 2-3	780(-0.02) 610(+0.06) 560(+0.01) 400(+0.03)	782(15) 625(16) 531(16) 407(24)			D
1 2-4	765(-0.27) 737(-0.20) 615(+0.30) 560sh 416(+0.10)	717(24) 720(8) 425(19)	1.975	79 ^b	E

^a The EPR spectra are slightly broad and it is difficult to distinguish between different species with parameters very close to each other. ^b There is only one set of spectra observed between pH 8 and 11 and, although its shape and parameters slightly change, unequivocal assignment is difficult. EPR parameters were not used as basic spectral data for the assignment of the species. They were fitted to the model as judged from CD spectra. A, B, C, D, and E correspond to the following binding modes: $2 \times \{\text{COO}^-\}$, $\{\text{COO}^-; \text{COO}^-, \text{O}^-\}$, $2\{\text{COO}^-, \text{O}^-\}$, $\{\text{COO}^-, \text{O}^-, 2 \times \text{O}^-\}$ and $2\{\text{O}^-, \text{O}^-\}$, respectively, where O^- is a deprotonated hydroxyl group.

Vanadyl(IV) ions form five complex species with lactobionic acid starting at very low pH (<3). No equimolar complexes could be found in the studied solutions, as was the case in the VO(IV)-galacturonic acid system.¹ The coordination modes are the same in both cases and spectroscopic data support the proposed structures (Table II). At very high pH, hydrolysis could be an important process. CD spectra, however, clearly indicate that lactobionic acid is bound to the metal ion even at a pH greater than 11. The distinct increase of Cotton effects with pH between 8 and 11 indicates only the variation of binding sites in lactobionic acid (Fig. 1, Table II). Coordination begins with the carboxyl function which acts as an anchor. When the pH is increased, the metal ion induces the deprotonation of and binds to a vicinal hydroxyl group. The formation of ML_2H_{-3} and MLH_{-4} complexes results from the fact that vanadyl ions are able to induce the deprotonation of two hydroxyls in each ligand molecule. Vanadyl coordination to four deprotonated hydroxyl oxygen atoms is very effective and overcomes the tendency towards metal ion hydrolysis. Although the

binding modes of VO(IV) ions with lactobionic acid are the same as with galacturonic acid (the latter ligand was shown to be a very effective chelating agent for vanadyl¹), the stability constants for lactobionic acid complexes are two to four orders of magnitude higher (Table I). Vanadyl complexes with lactobionic acid are also considerably more stable than the respective copper(II) complexes with the same ligand (Table I).¹⁴ The unusual stability of the lactobionic acid complexes with both metal ions in comparison to uronic acid systems may derive from the fact that the latter ligands, with a cyclic structure, form more rigid chelate rings. Differences in complex stability may thus derive from entropic effects. The importance of the relative position of the hydroxyl group and the chelate ring stability was shown earlier to be an important factor for the stability of metal complexes with amino-sugars.^{17,18}

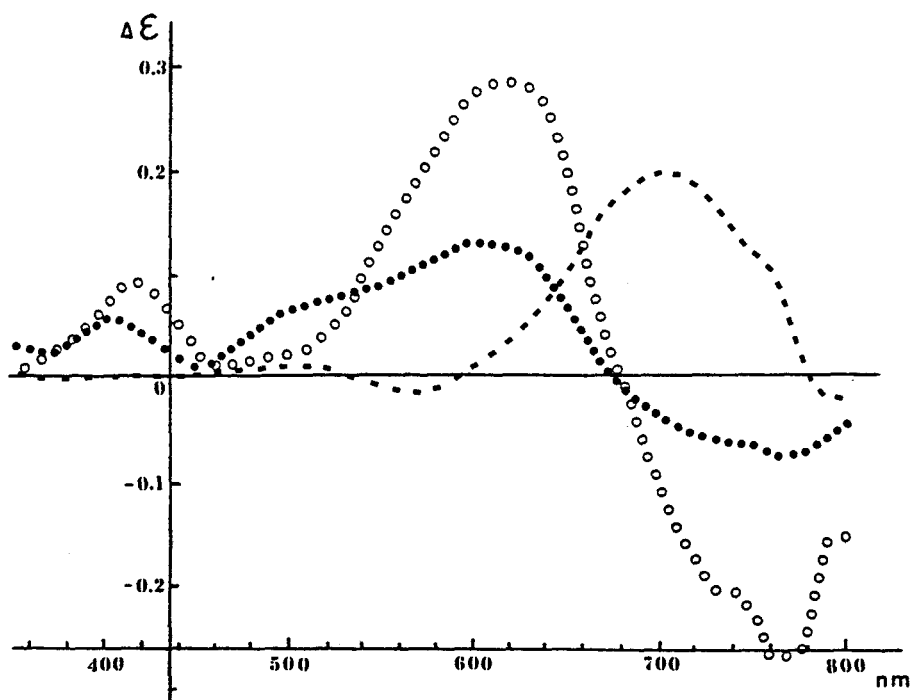


FIGURE 1 Representative CD spectra for VO(IV)-D-lactobionic acid solutions with metal concentration 1.96×10^{-3} and a 1:5 metal to ligand molar ratio obtained at pH 4.55 (---), 8.7 (● ●) and 10.6 (○ ○).

The more flexible structure of the linear fragment of lactobionic acid which coordinates to the metal ion allows the formation of less hindered chelate rings and, as a result, more stable complexes, both in the case of vanadyl(IV) and copper(II) ions. The former ions prefer hydroxyl donors and their complexes are considerably more stable than those of copper(II) (two to eight orders of magnitude, Table I).

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was financially supported by the Polish Ministry of National Education and the Region Nord Pas de Calais (France).

REFERENCES

1. G. Micera, A. Dessi', H. Kozlowski, B. Radomska, J. Urbanska, P. Decock, B. Dubois and I. Olivier, *Carbohydr. Res.*, **188**, 25 (1989).
2. C. Gessa, M.L. De Cherchi, A. Dessi', S. Deiana and G. Micera, *Inorg. Chim. Acta*, **80**, L53 (1983).
3. G. Micera, S. Deiana, A. Dessi', A. Pusino and C. Gessa, *Inorg. Chim. Acta*, **100**, 49 (1986).
4. M. Branca, G. Micera, A. Dessi' and H. Kozlowski, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1283 (1989).
5. M. Branca, G. Micera, D. Sanna, A. Dessi' and H. Kozlowski, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1997 (1990).
6. J.H. Southard and F.O. Belzer, *Eryobiology*, **17**, 540 (1980).
7. G.A. Dette and H. Knothe, *Biochem. Pharmacol.*, **35**, 959 (1986).
8. K.M. Downey and D.M. Chaput de Saintonge, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **21**, 295 (1986).
9. M. Rongqui, W. Liangsham and Z. Weishu, *Yaoxue Tongbao*, **20**, 206 (1985).
10. Teijin Ltd., Kokai Tokkyo Koho Jp., **58**, 177, 905 (1983).
11. J. Hegenauer, P. Saltman, D. Ludwig, L. Ripley and P. Bajo, *J. Agric. Food Chem.*, **27**, 860 (1979).
12. J. Hegenauer, P. Saltman and D. Ludwig, *J. Agric. Food Chem.*, **27**, 868 (1979).
13. F. Scholnick and P.E. Pfefer, *J. Dairy Sci.*, **63**, 471 (1980).
14. S. Bouhsina, P. Decock, H. Kozlowski, G. Micera and J. Swiatek, *J. Inorg. Biochem.*, in press.
15. G. Gran, *Acta Chem. Scand.*, **29**, 599 (1950).
16. P. Gans, A. Sabatini and A. Vacca, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1196 (1985).
17. H. Kozlowski, P. Decock, I. Olivier, G. Micera, A. Pusino and L.D. Pettit, *Carbohydr. Res.*, **197**, 109 (1990), and references therein.
18. J. Urbanska and H. Kozlowski, *J. Coord. Chem.*, **21**, 175 (1990).

Résumé

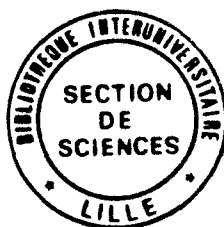
Les carbohydrates sont des substances produites en grande quantité dans l'environnement. Lorsqu'ils possèdent un point d'ancrage : une fonction amine ou une fonction carboxylique comme dans le cas des sucres acides ou aminés, ils complexent bien les ions métalliques. On sait que ces derniers sont essentiels dans les processus biologiques. Chaque espèce vivante (flore, faune) est caractérisée par une concentration optimale de ces ions. Une surconcentration ou au contraire une carence se traduit par des troubles du métabolisme. Il existe fort heureusement des système régulateurs de la concentration en ions métalliques. Lorsque ceux-ci sont défailants, il faut alors faire diminuer dans l'organisme l'ion métallique ou le lui fournir sous forme assimilable.

L'un des produits les plus utilisés en pharmacopée est le gluconate du métal. On pense que le l'acide lactobionique pourrait constituer un substitut intéressant de l'acide gluconique.

Les études reportées dans ce mémoire décrivent les propriétés complexantes de l'acide lactobionique vis-à-vis des ions cuivrique et oxovanadium.

Ces travaux prennent en compte l'équilibre cinétique de cet acide avec sa lactone.

Une dernière partie traite de la formation de complexes mixtes avec les sucres aminés.



Mots-clés

- Acide lactobionique
- D-Glucosamine
- Complexation
- Cuivre(II)
- Oxovanadium(IV)
- Stabilité
- Spectroscopie U.V Visible
- Dichroïsme circulaire
- Résonance paramagnétique électronique
- Modélisation
- Potentiométrie
- Polarographie