

N° d'ordre 3551

THÈSE

Présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

en vue de l'obtention du titre de

DOCTEUR

Mention : STRUCTURE ET DYNAMIQUE DES SYSTÈMES
RÉACTIFS

Par

Alexandra CAUDRON

**Étude par spectroscopies moléculaires de la complexation de
l'aluminium (III) par l'acide caféique – Compétition avec les
substances humiques**

Soutenue le 6 Décembre 2004 devant la commission d'examen :

Mr J.C. Fischer
Mr O. Dangles
Mr P. Flament
Mme A. Laboudigue
Mr J.C. Merlin
Mr J.P. Cornard

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur

Remerciements

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Spectrochimie Infrarouge et Raman (LASIR, CNRS UMR 8516). Je tiens à exprimer mes remerciements à Monsieur D. BOUGEARD, Directeur de Recherches au CNRS pour m'avoir accueillie au sein du LASIR.

Cette étude a été menée sous la codirection de Messieurs JC. MERLIN et JP. CORNARD, professeurs à l'USTL. Je tiens à leur exprimer toute ma reconnaissance pour m'avoir accordé leur confiance, pour leur disponibilité et pour m'avoir fait bénéficier de toutes leurs compétences.

Je remercie le CNRS et la région Nord – Pas – de – Calais d'avoir cofinancé cette thèse.

J'exprime ma profonde gratitude à Monsieur JC. FISCHER, Professeur au Laboratoire de Chimie Analytique et Marine à l'USTL, pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury.

Je remercie Monsieur O. DANGLES, Professeur au laboratoire Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale à l'Université d'Avignon, et Monsieur P. FLAMENT, Maître de Conférences HDR au laboratoire des Ecosystèmes Littoraux et côtiers à l'Université du Littoral, d'avoir manifesté de l'intérêt pour ce travail en me faisant l'honneur de le juger.

Je suis reconnaissante à Madame A. LABOUDIGUE, Enseignante à l'Ecole des Mines de Douai pour avoir accepté d'examiner ce manuscrit.

J'exprime toute mon amitié à tous les membres du LASIR, chercheurs, ingénieurs, techniciens et administratifs ainsi qu'à mes collègues doctorants et DEA.

SOMMAIRE

| | |
|---------------------------|---|
| Introduction | 1 |
|---------------------------|---|

Chapitre I : Etude bibliographique & dispositif expérimental

| | |
|--|----|
| I. Les substances humiques | 4 |
| II. Complexation de l'aluminium par les acides humiques | 10 |
| III. Molécules modèles des substances humiques | 15 |
| IV. Complexation de l'aluminium avec l'acide caféique | 18 |
| V. Méthodes expérimentales | 19 |
| 1- Généralités..... | 19 |
| 2- Spectrométrie UV-visible..... | 20 |
| 3- Spectrométrie de fluorescence..... | 20 |
| 4- Méthode d'exploitation des spectres expérimentaux..... | 28 |
| a) Détermination de la stœchiométrie des complexes..... | 28 |
| b) Détermination des constantes de formation des complexes..... | 30 |

Chapitre II : Etude de l'acide caféique

| | |
|--|----|
| I. Influence du pH sur l'acide caféique | 32 |
|--|----|

| | |
|--|--|
| 1- Spectrométrie UV-visible..... | |
| 32 | |
| 2- Spectroscopie de fluorescence..... | |
| 36 | |
| II. Etude de la complexation de l'aluminium par l'acide caféique..... | |
| 44 | |
| 1- Etude préliminaire et conditions expérimentales..... | |
| 44 | |
| 2- Etude de la complexation à pH 5..... | |
| 47 | |
| a) Résultats..... | |
| 47 | |
| b) Exploitations des résultats..... | |
| 50 | |
| 3- Etude de la complexation à pH 6,5..... | |
| 65 | |
| a) Résultats..... | |
| 65 | |
| b) Exploitations des résultats..... | |
| 69 | |
| 4- Comparaison..... | |
| 80 | |

Chapitre III : Etude de l'acide humique

| | | |
|-------------|--|------------|
| I. | Etude préliminaire sur l'acide humique..... | 85 |
| | <i>1- Purification de l'acide humique.....</i> | <i>85</i> |
| | <i>2- Etude spectroscopique.....</i> | <i>87</i> |
| | a) Absorption UV-visible..... | 87 |
| | b) Fluorescence..... | 88 |
| | <i>3- Influence du pH sur le spectre synchrone de l'acide humique.....</i> | <i>93</i> |
| II. | Complexation de l'aluminium (III) par l'acide humique..... | 95 |
| III. | Compétition entre l'acide humique et l'acide caféique..... | 98 |
| | <i>1- Interaction entre l'acide caféique et l'acide humique.....</i> | <i>98</i> |
| | <i>2- Compétition entre l'acide caféique et l'acide humique.....</i> | <i>100</i> |
| | Conclusion..... | 109 |
| | Bibliographie..... | 111 |

INTRODUCTION

La contamination des sols due à l'activité agricole, aux épandages des boues d'épuration et aux déchets d'origine industrielle devient aujourd'hui un problème préoccupant. Cela se traduit par des impacts négatifs sur les activités dépendant directement ou indirectement de la terre, mais aussi sur la santé humaine et les différents écosystèmes. L'ampleur croissante des dégradations physiques, chimiques et biologiques remet en cause, au moins ponctuellement, le rôle de filtre, de support de vie et aussi d'outil économique que remplit le sol.

On peut distinguer deux grands types de pollution des sols. D'une part, la pollution due aux activités intensives agricoles (emploi des pesticides, engrais minéraux ou organiques) et d'autre part, une pollution plus localisée provenant essentiellement des sites industriels (métaux lourds, hydrocarbures ...) mais aussi de la circulation automobile.

La prise de conscience de cette pollution des sols ainsi que celle de l'air et des eaux a amené une expansion de la chimie de l'environnement. Dans cette discipline, on étudie entre autres, le devenir des polluants, en particulier les polluants persistants (ions métalliques, hydrocarbures aromatiques polycycliques, composés organiques volatils, pesticides...), dans les différents compartiments de l'environnement (air, sols, eaux), ainsi que leur écotoxicologie. Les recherches se portent également sur les différents moyens de dépolluer efficacement et à moindre coût pour compenser les limites des systèmes de dépollution actuels.

Depuis une dizaine d'années, la région Nord-Pas-de-Calais a mis en place le Programme de Recherche Concertée (PRC) qui met en liaison différentes disciplines scientifiques (chimie, biologie, médecine, géologie, botanique...). Les différents protagonistes ont uni leurs compétences

dans une approche pluridisciplinaire des problèmes concrets posés par les sites industriels du Nord-Pas-de-Calais, qui ont été notamment sources de pollution par des métaux pour établir un état des sites et des risques. Le LASIR participe à ce programme sous le thème « étude d'un secteur pollué par les métaux ». Les travaux s'inscrivent dans la compréhension des processus chimiques du devenir des métaux et de la matière organique dans les sols. La finalité de ces travaux consiste en l'étude des contributions des différentes espèces organiques présentes dans les sols dans les phénomènes de complexation avec les métaux ; et à proposer un modèle des interactions matière organique – sels métalliques. L'étude s'est tout d'abord portée sur des molécules modèles afin d'examiner l'influence des conditions physico – chimiques (pH, force ionique, nature des métaux ...) sur le phénomène de complexation. Un des principaux objectifs des études réalisées au laboratoire est le classement des différents sites complexants présents au sein de la matière organique des sols en fonction de leur pouvoir de fixation.

La matière organique des sols est principalement constituée de macromolécules (acides humiques, acides fulviques) complexes possédant de nombreuses fonctions pouvant complexer les métaux lourds. D'autres molécules organiques de faible masse molaire (précurseurs ou résultats de la décomposition des macromolécules) sont aussi présentes dans les sols. Plus petites et plus mobiles que les macromolécules, elles constituent un vecteur essentiel dans le transport et la biodisponibilité des métaux lourds.

Dans cette étude, seront tout d'abord présentées les différentes recherches effectuées sur la complexation des métaux lourds avec les substances humiques et les petites molécules organiques, en particulier l'acide caféique. Le choix s'est porté sur cette molécule car elle possède deux des groupements omniprésents dans les substances humiques à savoir un groupement acide carboxylique et une fonction catéchol. Nous aborderons aussi dans cette partie les dispositifs expérimentaux mis en place pour les différentes techniques d'analyse que nous avons utilisés dans la suite de nos travaux.

Dans une deuxième partie, nous présenterons l'étude de la complexation de l'aluminium (III) avec l'acide caféique. Petit et fortement chargé, l'aluminium (III) ne possède pas de pouvoir complexant spécifique et peut donc se fixer sur l'un des deux sites de complexation de l'acide caféique. Pour être dans des conditions aussi proches que possible de celles observées dans les milieux naturels, nous avons choisi de réaliser l'étude en milieu

aqueux à des pH de 5 et 6,5. L'analyse des résultats obtenus à partir des techniques spectroscopiques (absorption UV-visible et émission de fluorescence) doit conduire à la détermination de la stoechiométrie des différents complexes formés ainsi qu'à leur constante de stabilité.

Dans une troisième partie, nous étudierons la complexation de l'aluminium (III) par l'acide humique. Ne donnant pas de réponse exploitable en spectroscopie d'absorption UV-visible, cette complexation est étudiée par spectroscopie de fluorescence synchrone. L'extinction de l'intensité de fluorescence permet de déterminer la constante de Stern – Volmer associée à la complexation. Dans les conditions naturelles, l'acide humique et l'acide caféique peuvent coexister dans les sols et peuvent donc interagir l'une avec l'autre et entrer en compétition lors de la fixation de l'aluminium. Cette compétition sera abordée sur des solutions modèles afin d'estimer l'affinité de l'une ou l'autre des espèces en présence pour l'ion Al(III).

CHAPITRE I

Etude Bibliographique & Dispositif Expérimental

I. Les substances humiques

La matière organique des sols provient de la décomposition microbienne et chimique de débris végétaux et animaux. Une partie de ces débris se minéralise (transformation en gaz carbonique, en nitrate ou autres éléments solubles), une autre partie est utilisée pour former de nouvelles molécules de plus en plus complexes et de nature colloïdale : c'est l'humification. Deux variétés majeures peuvent être distinguées dans l'humus : les substances non humiques comme les acides aminés, les sucres, les lipides ; et les substances humiques de masses molaires plus ou moins élevées, riches en groupements fonctionnels contenant des atomes d'oxygène. Traditionnellement, ces substances humiques sont divisées en trois fractions majeures selon leur solubilité : les acides humiques (solubles à $\text{pH} > 2$), les acides fulviques (solubles sur toute la gamme de pH) et l'humine (fraction totalement insoluble).

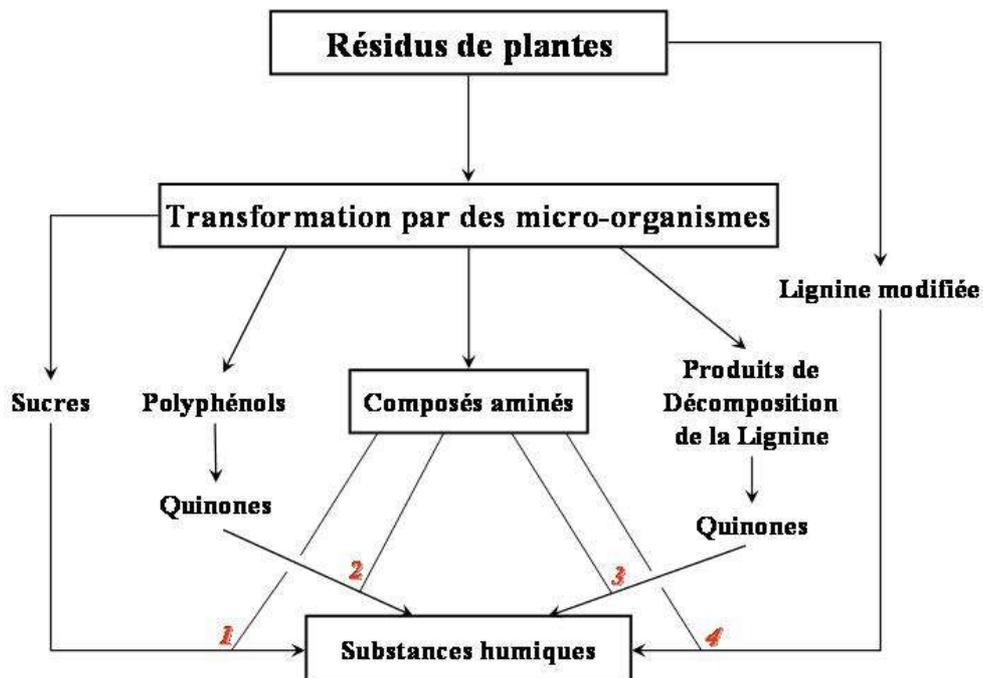


Schéma 7 : Mécanismes de formation des substances humiques [1].

Pendant de nombreuses années, on a pensé que les substances humiques dérivait de la lignine (substance organique qui imprègne la paroi des vaisseaux du bois et de diverses cellules

végétales, et les rend résistantes, imperméables et inextensibles) (voie 4, schéma 1). Selon cette théorie, la lignine est incomplètement utilisée par les micro-organismes et le résidu de la lignine devient une partie de l'humus des sols. Les modifications chimiques apportées à la lignine sont la déméthylation des groupements méthoxyles (-OCH₃) qui génère des groupements o-hydroxyphénols (-OH) et l'oxydation des chaînes latérales aliphatiques et des fonctions catéchol pour constituer des groupements -COOH. Cette voie, illustrée schéma 2, est reprise dans la théorie lignine – protéine [2]. En supposant que les substances humiques représentent un système de polymères, le produit obtenu initialement serait un des composants de l'humine. Des oxydations et des fragmentations complémentaires produiraient en premier lieu des acides humiques et ensuite des acides fulviques.

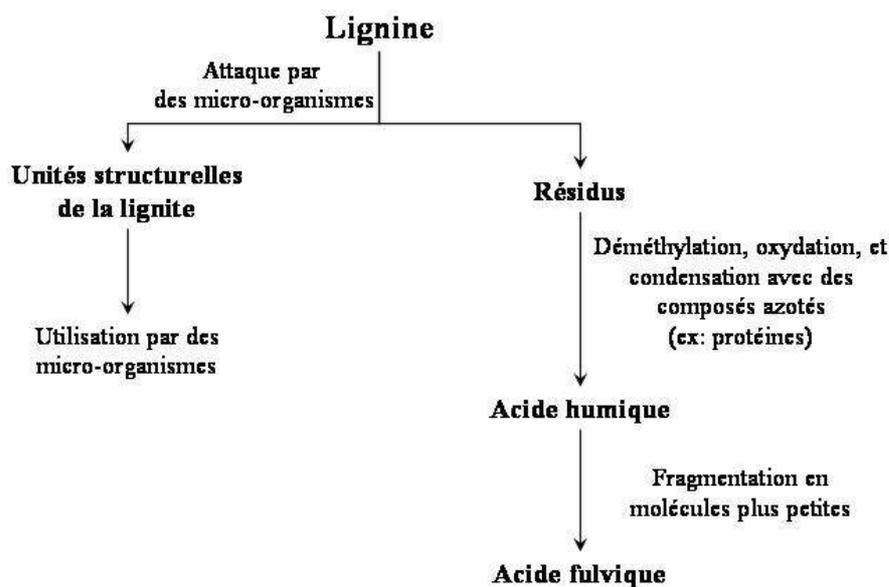


Schéma 7 : Représentation schématique de la théorie de la lignine pour la formation des substances humiques.

Dans la voie 3 (schéma 1), la lignine joue toujours un rôle important dans la synthèse des substances humiques, mais par un processus différent. Dans ce cas, les aldéhydes et les acides phénoliques libérés pendant l'attaque microbienne subissent une conversion enzymatique en quinones. Ces dernières polymérisent en présence ou non de composés aminés pour former des macromolécules de types humiques.

La voie 2 (schéma 1) est quelque peu semblable à la 3 sauf que les polyphénols sont synthétisés par des micro-organismes à partir d'une source en carbone non ligneuse, par exemple la cellulose. Les polyphénols sont alors oxydés enzymatiquement en quinones et convertis en substances humiques comme dans la voie 3.

Les voies 2 et 3 forment la base de la théorie des polyphénols (schéma 3) maintenant reconnue. Contrairement à la théorie précédente, une étape intermédiaire avec formation de composés organiques de faible masse molaire (polyphénols) intervient. C'est à partir de la polymérisation et de la condensation de ces composés que de plus grosses molécules vont être formées. Les polyphénols sont oxydés en quinones grâce aux enzymes phénoloxydase que l'on retrouve dans les micro-organismes et la présence d'O₂ [3-8]. Par la suite, les quinones obtenues peuvent se condenser et se polymériser avec des composés aminés pour donner naissance aux acides humiques et fulviques.

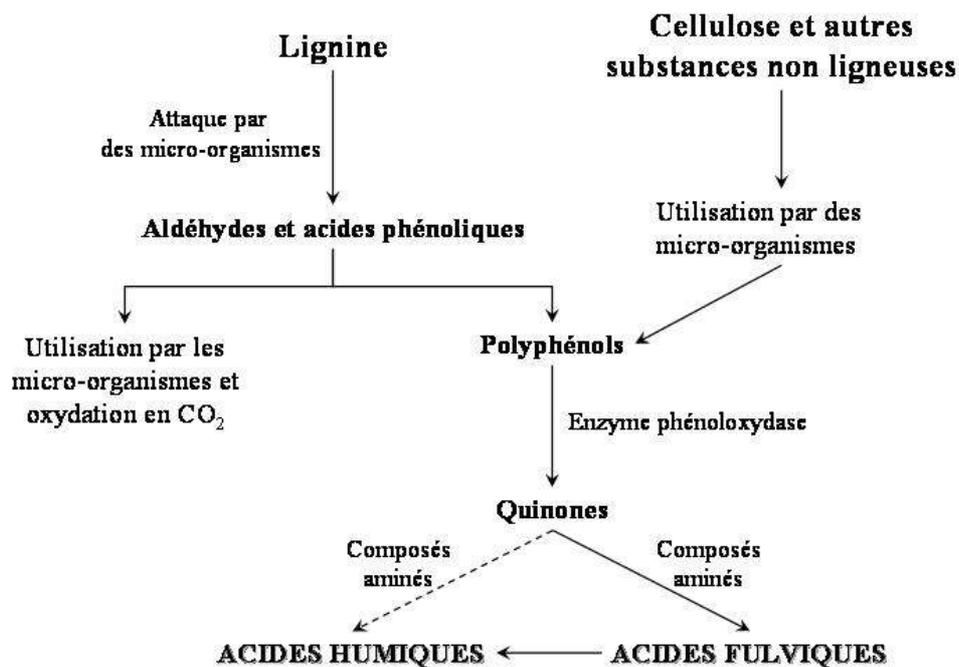


Schéma 7 : Représentation schématique de la théorie des polyphénols pour la formation de l'humus.

L'idée que l'humus est formé à partir de sucres (voie 1, schéma 1) remonte aux premiers temps de la chimie de l'humus. Selon ce concept, les sucres réducteurs et les acides aminés, sous-produits du métabolisme microbien, subissent une polymérisation non enzymatique pour former des polymères azotés bruns comme ceux produits lors de la déshydratation de certains produits alimentaires selon la réaction de Maillard [9-13].

Les quatre voies de formation des substances humiques sont envisageables pour tous les sols mais avec une importance plus ou moins grande. Un environnement particulier favorisera une voie plutôt qu'une autre. Par exemple, la voie 4 peut prédominer dans les sols pauvrement drainés et les sédiments humides, alors que la synthèse à partir des polyphénols provenant de la décomposition des feuilles peut avoir une importance considérable dans certains sols forestiers.

La structure moléculaire des acides humiques est très complexe et mal définie dans la mesure où, pour un sol donné, elle évolue constamment en fonction des saisons et des techniques de cultures. Beaucoup d'efforts ont été déployés et en particulier de nombreuses techniques et méthodes disponibles ont été utilisées pour déterminer une structure moyenne [14-19]. De nombreuses études montrent que l'acide humique est une macromolécule possédant en proportion assez importante des structures polyphénoliques ou quinoniques polymérisées et de nombreuses fonctions acides provenant de sa formation. On trouve, par exemple, des structures comme les aromatiques simples, les quinolinones, les coumarines, les flavones et leurs dérivés (Figure 1).

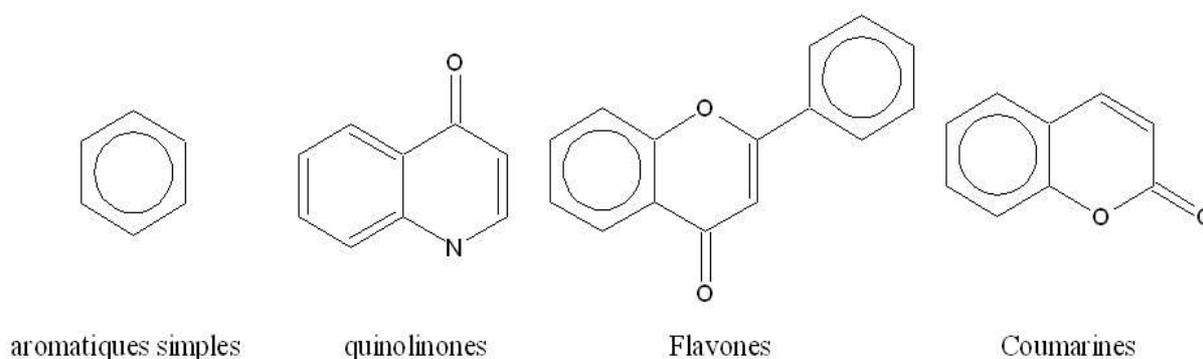


Figure 1 : Exemples de structures que l'on retrouve dans la macromolécule d'acide humique.

Les deux éléments majeurs des acides humiques et fulviques sont le carbone et l'oxygène. Leurs teneurs ainsi que celles de l'azote, l'hydrogène et le soufre sont reprises dans le Tableau 1 proposé par Steelink [20] :

| Elément | Acide Humique | Acide Fulvique |
|---------|---------------|----------------|
| Carbone | 53,8 – 58,7% | 40,7 – 50,6 % |

| | | |
|-----------|--------------|--------------|
| Oxygène | 32,8 – 38,3% | 39,7 – 49,8% |
| Hydrogène | 3,2 – 6,2% | 3,8 – 7,0% |
| Azote | 0,8 – 4,3% | 0,9 – 3,3% |
| Soufre | 0,1 – 1,5% | 0,1 – 3,6% |

Tableau 1 : Composition élémentaire des acides humiques et fulviques (% massique).

De manière générale, les teneurs en carbone des acides humiques sont supérieures aux acides fulviques et inversement, les teneurs en oxygène des acides humiques sont inférieures aux acides fulviques. Les teneurs plus élevées en oxygène pour les acides fulviques sont associées au fait que celles – ci contiennent plus de groupements carboxyliques (COOH) ou d'hydrates de carbone. Le rapport (en nombre d'atomes) O/C permet de différencier les acides humiques et fulviques. On a $O/C \approx 0,5$ pour les acides humiques et $O/C \approx 0,7$ pour les acides fulviques. Le rapport H/C est inversement proportionnel à l'aromaticité ou au degré de condensation.

Si l'acide humique présente une grande variété de groupements fonctionnels responsables de sa réactivité, il apparaît que l'oxygène constitue l'élément clé. En effet, la détermination du rapport oxygène/carbone donne une bonne estimation de l'affinité de l'acide humique pour les protons et les ions métalliques, car la présence de doublets non liants sur l'oxygène assure la basicité (Lewis) de ces composés [20].

Parmi les principaux groupements chélateurs de l'acide humique (Figure 2), on retrouve la fonction acide carboxylique, le groupement catéchol et le groupement hydroxy – carbonyle. Chacun de ces sites de chélation piège le métal en formant une pince autour de lui. Ces pinces sont plus ou moins grandes suivant le type de site et donc ne peuvent pas chélater tous les métaux, tout dépendra de leur taille et de leur environnement électronique. Par exemple, l'aluminium qui est de petite taille peut se fixer sur tous les sites.

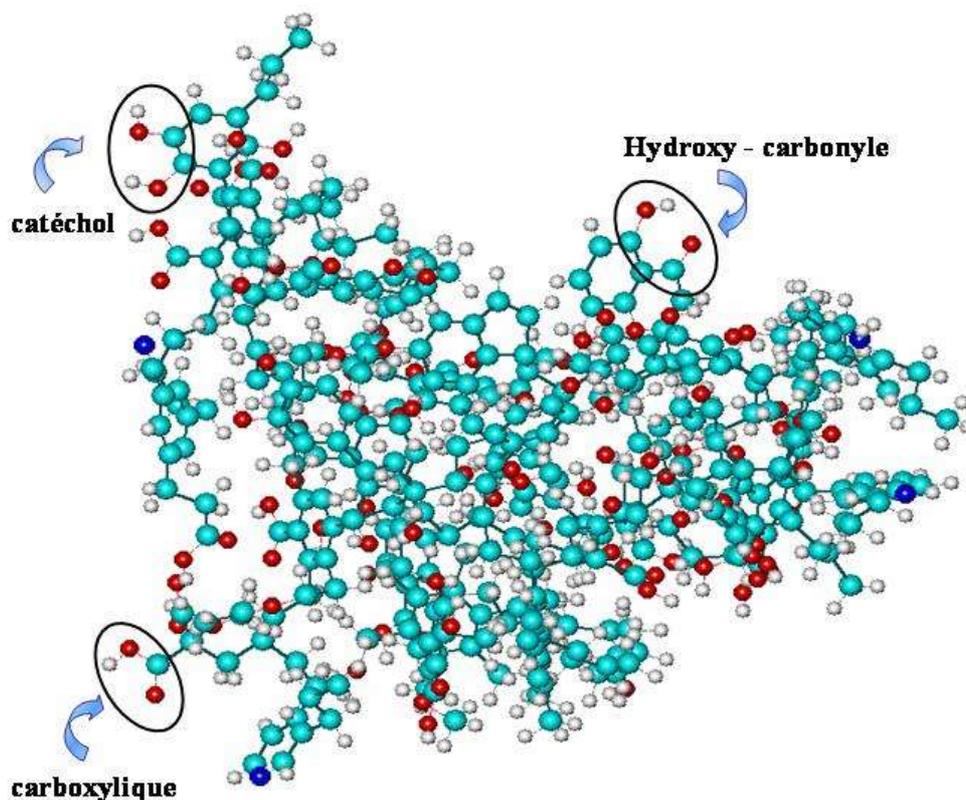


Figure 2 : Molécule « hypothétique » d'acide humique.

Le pouvoir complexant de l'acide humique est très important, il peut non seulement facilement fixer les ions métalliques mais aussi complexer de petites molécules. Si l'acide humique est un bon complexant pour les métaux nécessaires au développement des plantes, il l'est aussi pour certains métaux issus de l'activité humaine (aluminium, plomb, zinc, cadmium, mercure...). Dans ce cas, c'est toute la chaîne alimentaire aboutissant à l'homme qui risque d'être contaminée.

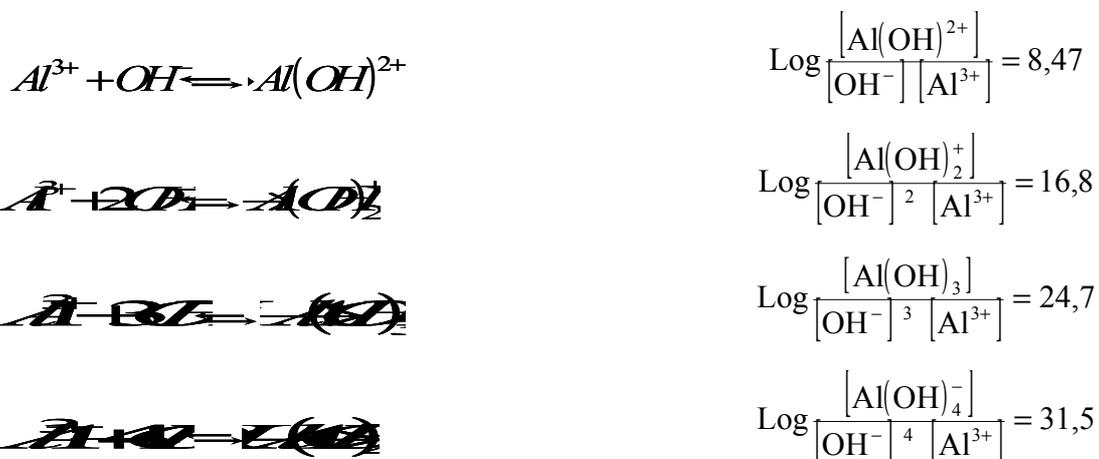
Un des paramètres qui joue un grand rôle dans la biodisponibilité des contaminants (ions métalliques ou pesticides) est le pH. Il existe différents types de sols : les sols acides, neutres et basiques. Le pH d'un sol acide est voisin de 5 et peut descendre jusqu'à 4 voir 3. Les sols de type basique ont un pH compris entre 7 et 8. Entre 6,5 et 7, on dit que le sol est neutre. La diminution du pH des sols entraîne une augmentation de la disponibilité des métaux lourds. Ils peuvent donc atteindre les nappes phréatiques et les réservoirs d'eau potable. Par conséquent, en milieu très acide, certains éléments chimiques, de par leur disponibilité, deviennent toxiques pour la faune et la flore. C'est le cas, par exemple pour l'aluminium et le mercure.

II. Complexation de l'aluminium par les acides humiques

L'aluminium est le troisième élément le plus abondant de l'écorce terrestre et par conséquent est omniprésent dans les sols. L'acidification de ces derniers, due aux pluies acides, augmente la quantité d'aluminium sous la forme Al^{3+} libre dans l'environnement (Figure 2). C'est sous cette forme que l'aluminium est le plus toxique [21-23], son rôle dans certaines maladies neurologiques, comme la maladie d'Alzheimer, n'est pas encore bien connu mais ce métal semble être impliqué [22, 23]. La disponibilité de l'ion Al^{3+} et de ses monomères hydratés ($Al(OH)^{2+}$, $Al(OH)_2^+$) pour les plantes diminue lorsque les ions sont complexés par les substances humiques. Cela est d'autant plus vrai que le complexe métallo-organique a une faible solubilité en milieu aqueux. Malgré la rétention de Al^{3+} par les acides humiques, une certaine quantité d'aluminium reste toujours disponible dans le sol et est susceptible de former, avec d'autres composés organiques et inorganiques de petites tailles et par conséquent plus mobiles [25], des composés solubles et donc transportables vers d'autres environnements. C'est pour cela que la spéciation et l'identification des espèces chimiques de l'aluminium sont essentielles.

La Figure 3 présente la distribution calculée (à température ambiante) des espèces Al(III) dans l'eau pure. A pH = 4, l'ensemble de l'aluminium est sous forme ionique Al^{3+} , tandis qu'à pH = 6, l'espèce prédominante est $Al(OH)_3$ précipité; la concentration en Al(III) totale en solution est de l'ordre de 10^{-6} M.

En milieu très acide, l'ion aluminium est hexacoordonné avec des molécules d'eau pour former l'espèce $Al(H_2O)_6^{3+}$. Lorsque le pH augmente, l'ion aluminium se complexe avec des ions OH^- selon les équations principales suivantes (à 25°C et avec une force ionique de 0,10M [24]) :



Il existe d'autres espèces de complexes entre Al^{3+} et l'hydroxyde qui se composent de plusieurs ions aluminium mais qui sont très minoritaires en milieu aqueux.

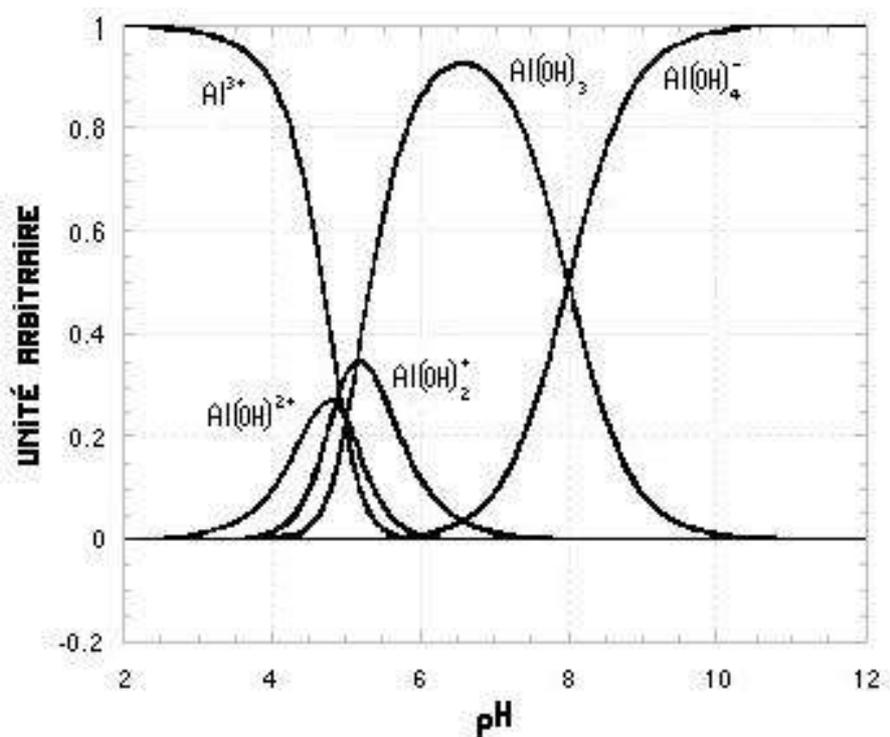


Figure 3 : Distribution des espèces d'Al(III) dans l'eau pure [26].

Les différents sites de complexation que l'on peut rencontrer dans les acides humiques n'ont pas le même pouvoir complexant vis-à-vis de l'aluminium. L'affinité de ces ligands pour l'ion métallique augmente avec la basicité du groupe donneur : d'une manière générale les groupements ayant le plus grand pKa auront donc la plus grande affinité pour l'ion Al³⁺. En première approximation, on peut donc classer les ligands comme suit selon la valeur approximative de leur pKa [24] (Figure 4 et 5):

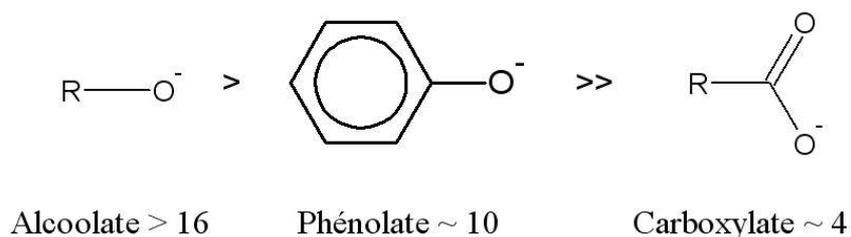


Figure 4 : Classification des ligands monodentates en fonction de leur affinité pour l'aluminium (III) [24]

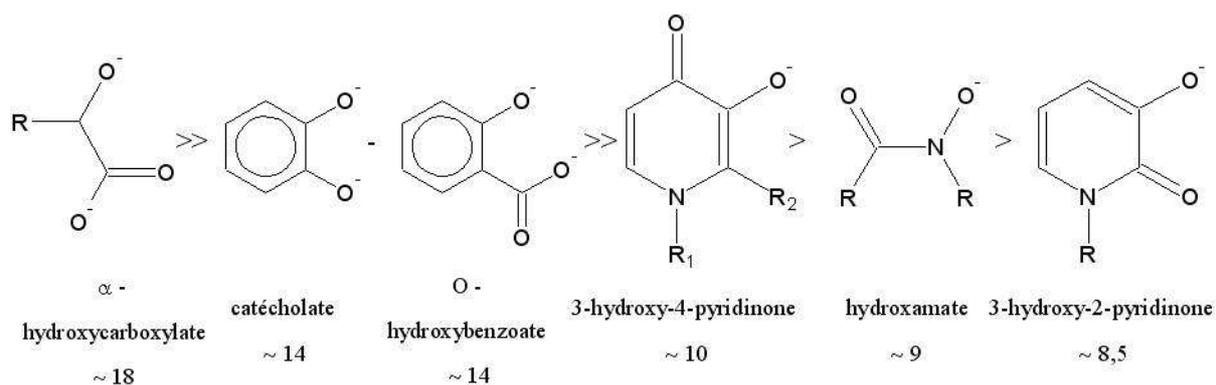


Figure 5: Classification des ligands bidentates en fonction de leur affinité pour l'aluminium (III) [24]

Pour des ligands multidentates avec plus de 2 groupes donneurs, d'autres facteurs, tels que la structure du ligand, sont aussi importants.

Les ligands qui présentent une affinité importante pour Al^{3+} , ont aussi une grande affinité pour les protons. La compétition avec les protons doit donc être considérée avec attention lorsqu'on parle d'équilibre $\text{Al(III)} - \text{Ligands}$ en milieu aqueux. Par exemple, considérons un ligand tel que 1,2-diméthyl-3-hydroxy-4-Pyridinone (Ligand 1). Ce ligand a moins d'affinité que le catéchol vis-à-vis de Al(III) cependant les formes complexées du ligand 1 prédominent en solution, sur toute la gamme de pH entre 2 et 12 par rapport à ceux du catéchol (Figure 6) [24]. Ceci s'explique par le fait que le catéchol présente une affinité très supérieure à celle du ligand vis-à-vis du proton. C'est pourquoi le complexe 1 : 3 (aluminium : catéchol) apparaît comme espèce mineure uniquement pour des valeurs très élevées de pH. La distribution des différentes espèces présentées sur les courbes de la figure 5, exprimée en pourcentage, est donc valable quelque soit la concentration des ligands. En solution aqueuse (acide, neutre ou faiblement basique), il y aura toujours compétition entre les protons et Al(III) dans le processus de complexation car ces deux espèces (Al^{3+} et H^+) sont des acides forts. Très peu de sols ont un pH très basique, ce qui signifie qu'à posteriori, il est très délicat de comparer le pouvoir complexant des différents sites en compétition dans les substances humiques (comme dans les Figures 4 et 5).

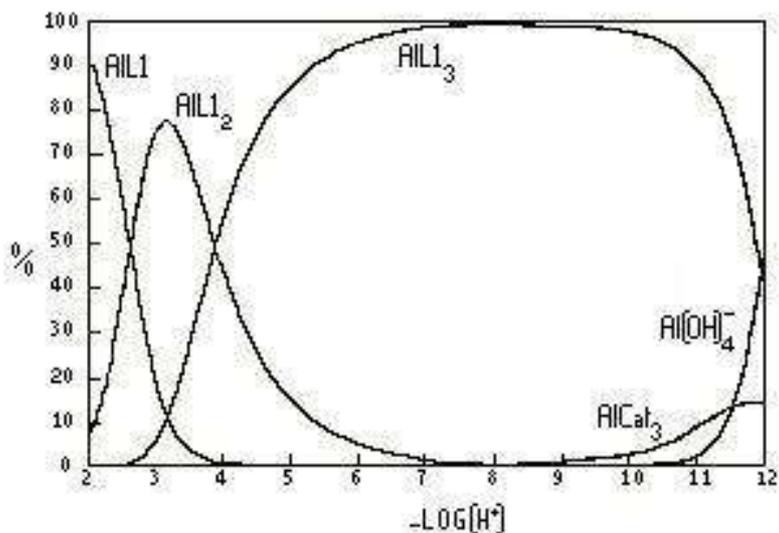


Figure 6 : Proportions relatives des complexes formés avec $1,0 \cdot 10^{-3} \text{M}$ Al(III), $3,0 \cdot 10^{-3} \text{M}$ L1 et $3,0 \cdot 10^{-3} \text{M}$ Catéchol. L1 = HL ; catéchol = H2L = Cat ; T= 25,0°C ; $\mu = 0,10 \text{M}$ (KCl) [24]

Les substances humiques jouent un rôle important dans la biodisponibilité et le transport de l'aluminium sous forme de composés stables et plus ou moins solubles. De nombreuses études ont été menées sur la complexation de l'aluminium par les substances humiques [26-44], plus particulièrement avec l'acide fulvique de masse molaire plus faible et de structure un peu moins complexe que l'acide humique.

Il s'avère qu'une des méthodes les plus utilisées pour étudier la complexation des ions métalliques avec des substances humiques est la spectroscopie de fluorescence sous ces différentes formes : matrices émission - excitation [26, 39, 41, 42] ; spectre synchrone [27-31, 33, 35] ; anisotropie [38] ; spectroscopie résolue dans le temps (temps de vie de l'état excité) [39]... L'étude de l'émission de fluorescence permet, en une seule expérience, d'obtenir beaucoup plus d'informations que d'autres techniques spectroscopiques, sur les groupements fonctionnels (fluorophores) composant l'acide humique qui sont généralement des sites de complexation.

Certains auteurs ont comparé des données de fluorescence (extinction, position des bandes) relatives à la complexation des ions métalliques avec des acides humiques, aux données obtenues avec des molécules simples (acide salicylique, acide phtalique, polyphénols) et ont émis des hypothèses quant à la nature des différents types de sites chélateurs [42]. Ces mêmes auteurs ont classé les différents sites comme suit : les sites faibles

correspondraient à des sites carboxyliques seuls, les sites moyens à des sites carboxyliques avec un groupement hydroxyle en position ortho (du type acide salicylique) et les sites forts plus difficiles à interpréter mais qui seraient plutôt de types phénoliques.

Il est très difficile de déterminer quels types de sites complexent prioritairement les ions métalliques en premier dans l'acide humique. Le processus de complexation dépend de nombreux paramètres physico-chimiques tels que le pH, la concentration et de la nature de l'ion métallique, mais aussi de la conformation moléculaire de l'acide humique.

III. Molécules modèles des substances humiques.

Afin de mieux connaître les différentes interactions pouvant exister entre les cations métalliques et la matière organique, il est envisageable d'étudier la complexation avec des petites molécules modèles comportant différents sites chélateurs présents dans les substances humiques.

Lors de la synthèse des substances humiques, de nombreuses molécules de faibles masses molaires sont formées. Chacune de ces molécules peut être utilisée comme molécule modèle pour étudier la complexation des substances humiques avec les ions métalliques. Par exemple, les composés intermédiaires (schéma 4) de la transformation par des champignons de l'aldéhyde coniférique et de l'aldéhyde p-hydroxycinnamique, résultant de la décomposition de la lignine, peuvent servir de molécules modèles [45].

Les produits de la dégradation de l'acide humique peuvent aussi servir de molécules modèles car elles présentent toutes les caractéristiques nécessaires : une faible masse molaire et les groupements chélateurs présents dans les substances humiques. Parmi tous ces fragments, les plus étudiés sont l'acide salicylique, l'acide phtalique, l'acide benzoïque et ses dérivés ainsi que les dérivés de l'acide cinnamique comme l'acide caféique.

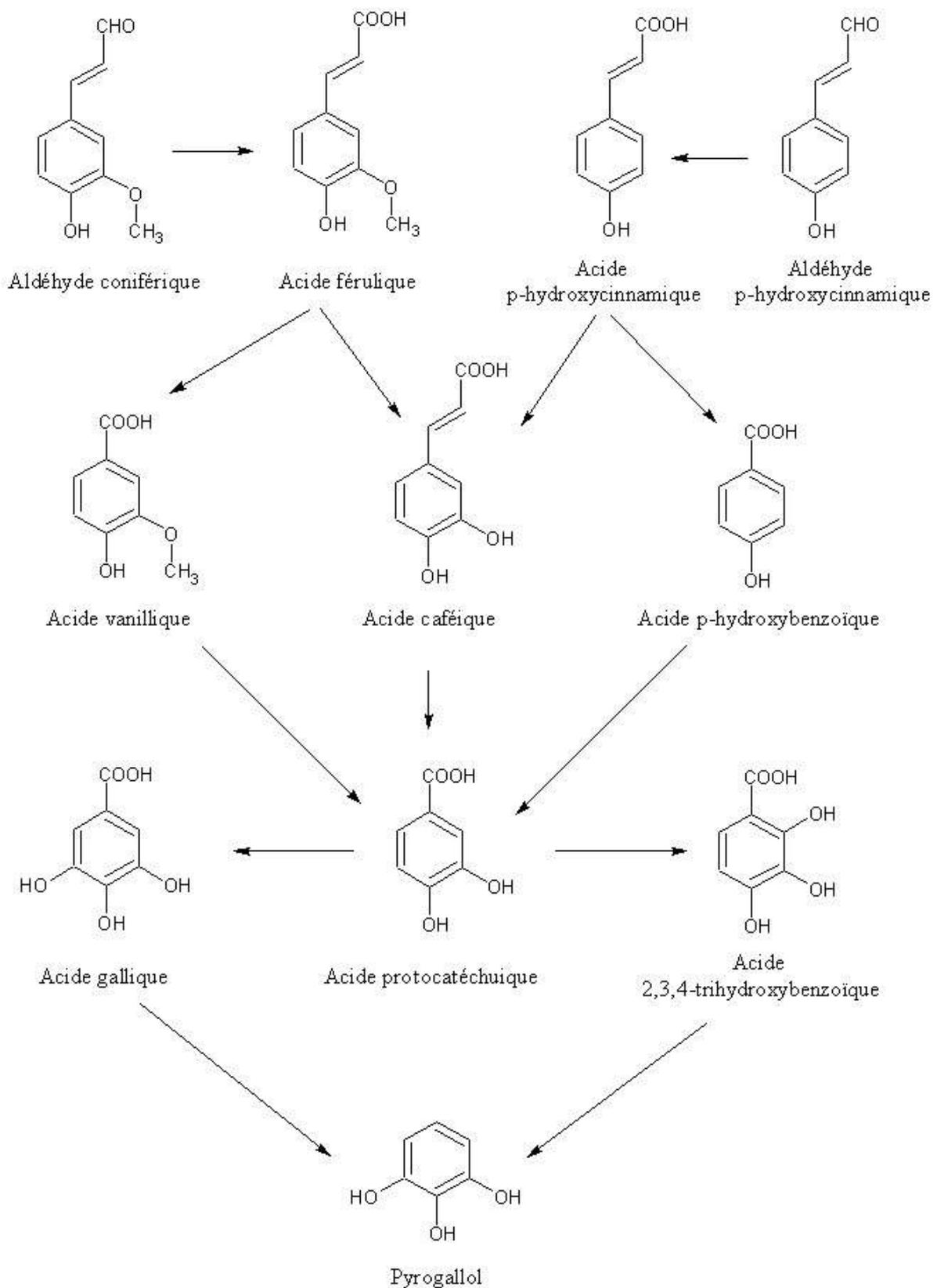


Schéma 7 : Transformation de l'aldéhyde coniférique et de l'aldéhyde p-hydroxycinnamique par des champignons du groupe *Imperfecti* [1].

L'acide caféique (Caf) ou acide 3,4-dihydroxycinnamique ($C_9H_8O_4$) (Figure 7) possède deux groupements chélateurs différents : un site catéchol et un groupement acide carboxylique. Ces deux sites sont assez loin l'un de l'autre pour qu'ils n'interagissent pas ensemble lors de la complexation. Ces deux sites présentant des pouvoirs de complexation différents, il est envisageable d'observer la complexation que d'un seul site ; et seul un excès d'ions métalliques pourra mettre en évidence le processus de complexation successif. L'acide caféique provient de la décomposition microbienne de la lignine et donc est un précurseur de l'acide humique. On retrouve également l'acide caféique sous sa forme naturelle ou ses dérivés dans de nombreuses plantes, fruits et légumes (par exemple : le thym, la sauge, l'arnica, l'olive, le café) mais aussi dans des produits comme le vin ou le miel. Il peut aussi rester présent et mobile dans les sols comme d'autres composés phénoliques qui jouent un rôle considérable dans la complexation de l'aluminium et d'autres métaux lourds dans le milieu naturel.

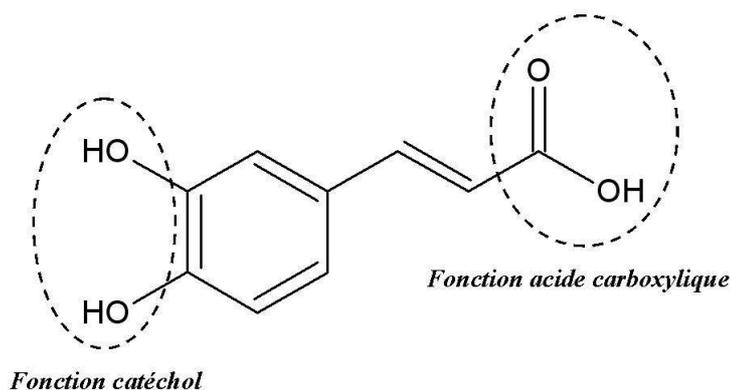


Figure 7: Acide 3,4-dihydroxycinnamique ou acide caféique (Caf)

IV.Complexation de l'aluminium avec l'acide caféique

De nombreuses études ont été menées sur l'acide caféique : détermination de ces pK_a par potentiométrie [49, 60-62], calcul *ab initio* pour déterminer sa conformation la plus stable [46], son pouvoir antioxydant [55, 56] et réducteur [53, 54], ainsi que sa complexation avec de nombreux ions métalliques (Cu^{2+} , Fe^{3+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} , Al^{3+} ...) [47-49, 51, 57-60].

La complexation de l'aluminium par l'acide caféique a déjà été étudiée par potentiométrie [48]. Pour un rapport aluminium – acide caféique donné, les auteurs ont fait varier le pH et observé les différents types de complexes formés en fonction de celui-ci.

La potentiométrie est une technique analytique très utilisée pour déterminer les stœchiométries et les constantes de stabilité des complexes. Cependant, elle nécessite de refaire les expériences pour chaque rapport molaire et cette technique présente une limite de détection relative élevée, elle ne permet pas de travailler avec des concentrations inférieures à $10^{-4}M$.

La complexation a aussi été suivie par spectrophotométrie UV-Visible [47] dans un domaine de pH ne dépassant pas 4,5 pour s'affranchir de la précipitation d' $Al(OH)_3$. La similarité entre les spectres d'absorption du complexe Al(III) – acide caféique et de l'acide caféique bidéprotonnée suggère que l'ion métallique se fixe sur la fonction catécholate. D'autres observations expérimentales confortent la conclusion que l'aluminium se complexe en premier lieu avec le site catécholate. Notamment, la spectroscopie Raman a permis de déterminer que la fonction catéchol est impliquée prioritairement dans le processus de chélation de Al(III) par l'acide caféique. Même en milieu acide, Al(III) est capable de déprotoner la fonction catéchol lors du processus de chélation.

La spectrophotométrie UV-Visible permet de déterminer les stœchiométries des complexes formés à pH constant, ainsi que de travailler à des concentrations plus faibles qu'en potentiométrie. Mais, il faut absolument coupler cette technique avec un système d'exploitation des données performant pour déterminer les constantes de stabilité des complexes formés.

V.Méthodes expérimentales

1. Généralités

Au cours de toutes les expériences, nous avons contrôlé le pH, (soit pour le garder constant soit pour le faire varier) au moyen d'un pHmètre microprocessor pH 213 d'Hanna Instruments. Pour toutes les mesures, la force ionique des solutions est maintenue constante à 0,1M en NaCl (Fluka). Toutes les solutions utilisées sont préparées avec de l'eau déminéralisée millipore® juste avant leur utilisation. L'acide caféique (Acros) a été utilisé sans aucune purification supplémentaire. Lors de la complexation de l'aluminium par l'acide caféique, nous avons utilisé du chlorure d'aluminium hexahydraté ($\text{AlCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$), (Fluka).

Pour permettre de garder le pH constant ou de le faire varier lors des différentes expériences, nous avons utilisé un système de cuve à circulation (Hellma) avec pompe péristaltique (Minipuls II, Gilson) (schéma 5). La solution est agitée en continu et chaque spectre est enregistré à partir d'une solution en circulation continue. Lors de l'étude en fonction du pH, nous avons ajouté, à une solution d'acide caféique en milieu acide, différents volumes de soude de concentrations différentes. Ces ajouts, entraînant une augmentation du volume de la solution et donc une dilution de l'acide caféique ont nécessité une correction des spectres obtenus avant leur exploitation. Cette correction n'est possible que s'il existe une linéarité entre le signal enregistré (absorbance ou émission de fluorescence) et la concentration, c'est-à-dire que le signal doit vérifier la loi de Beer - Lambert.

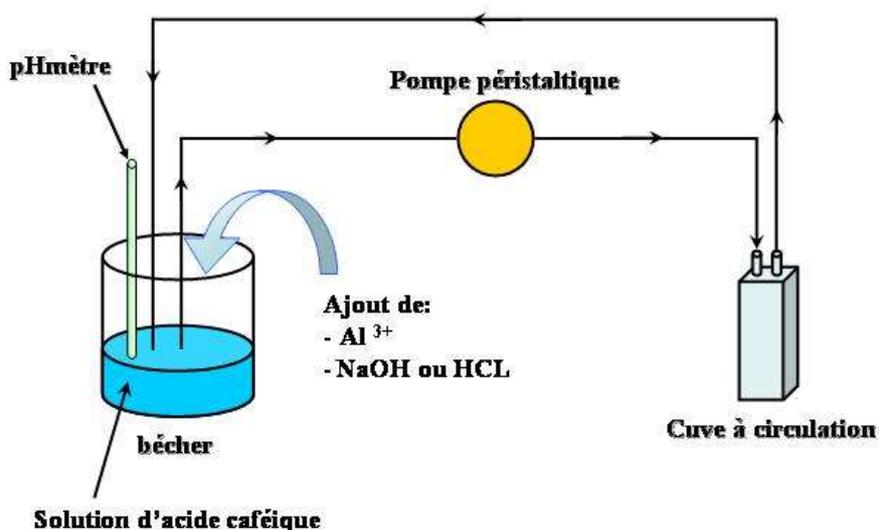


Schéma 7 : Montage avec cuve à circulation et pompe péristaltique

2. Spectrométrie UV-visible

Les spectres d'absorption UV-visible ont été enregistrés à l'aide d'un spectrophotomètre Cary UV 100 Bio (Varian) entre 200 et 500 nm à une vitesse de 150 nm/min. Le changement de lampe de l'UV au visible est effectué à 370 nm car un changement traditionnel à 350 nm provoque, pour notre appareil, un décrochement dans le spectre qui se situe dans la zone des maxima d'absorption des complexes de l'aluminium par l'acide caféique.

3. Spectrométrie de fluorescence

La spectroscopie de fluorescence consiste à récolter le faisceau de photons émis par une molécule après son excitation. Les photons émis sont récoltés à 90° par rapport à l'excitation pour éviter les interférences avec les photons excitateurs (schéma 6).

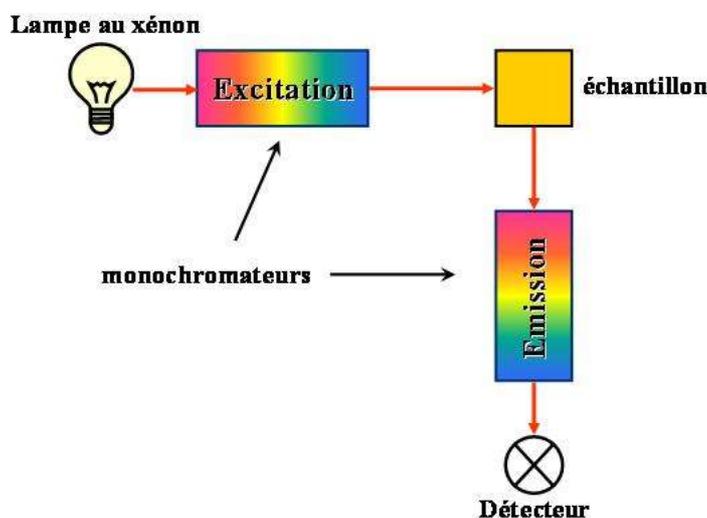


Schéma 7 : Schéma de principe d'un fluorimètre

En fluorimétrie, on peut enregistrer différents types de spectres en jouant sur le monochromateur d'excitation et celui d'émission. Le spectre de base est celui d'émission : on fixe le monochromateur d'excitation sur une certaine longueur d'onde et on balaye en longueur d'onde d'émission dans une gamme spectrale de longueur d'onde supérieure à celle d'excitation. Le spectre d'excitation est enregistré en fixant le monochromateur d'émission et en faisant varier la longueur d'onde d'excitation dans un domaine inférieur à la longueur d'onde d'émission. Pour le spectre

synchrone, on fixe un écart constant entre le monochromateur d'excitation et celui d'émission, puis on balaye en longueur d'onde. L'écart en longueur d'onde entre les deux monochromateurs est appelé « offset ».

On peut retrouver ces trois différents spectres sur une matrice émission-excitation (MEE). La matrice MEE est enregistrée en prenant un spectre d'émission à une certaine longueur d'onde d'excitation que l'on fait varier, ainsi on obtient l'intensité de fluorescence en fonction de la longueur d'onde d'excitation et celle d'émission. La Figure 8 représente la matrice MEE de l'acide caféique pour une concentration de $2 \cdot 10^{-5} \text{M}$ à pH 5. La lecture de la matrice MEE le long de l'axe des longueurs d'onde d'excitation donne le spectre d'excitation (Figure 8). La lecture suivant l'axe des longueurs d'onde d'émission conduit au spectre d'émission (Figure 8). Par contre, si on suit une parallèle à la droite émission = excitation, on obtient le spectre synchrone (Figure 8). L'écart entre ces deux droites donne l'offset.

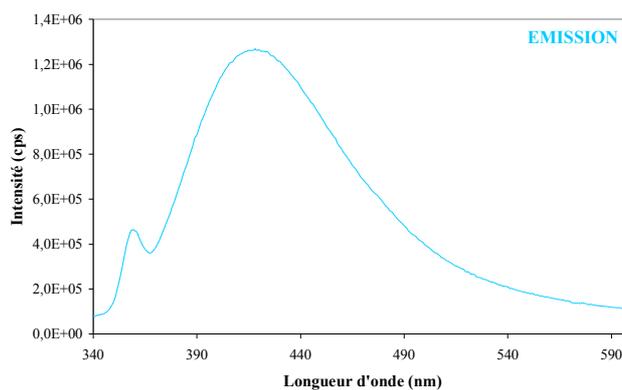
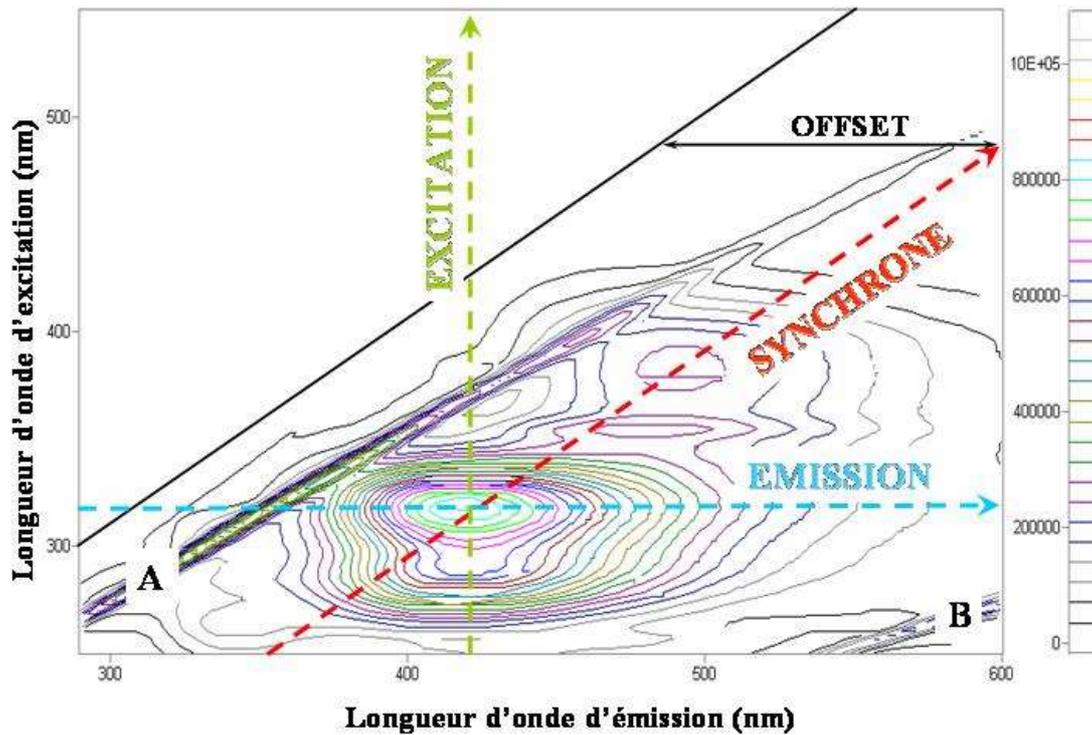


Figure 8 : Matrice MEE. Spectres d'émission à $\lambda_{ex} = 320$ nm, d'excitation à $\lambda_{em} = 420$ nm et synchrones avec un offset de 112 nm. Massif A : bande Raman de l'eau, Massif B : bande Raman de l'eau du second ordre.

De plus, lorsque l'on travaille en milieu aqueux, on observe sur la matrice MEE la bande Raman de l'eau du premier ordre (Figure 8 A) ainsi que celle du second ordre (Figure 8 B). L'écart

en nombre d'onde entre l'excitation et cette raie Raman étant constante (3600 cm^{-1}), la position de ces bandes varie selon la longueur d'onde d'excitation.

Les spectres de fluorescence ont été enregistrés à l'aide d'un Fluoromax-3 (avec autopolariseurs) de Jobin Yvon. Les fentes d'entrée des monochromateurs d'émission et d'excitation ont une ouverture de 5 nm, la vitesse d'enregistrement du spectre est de 120 nm/min. En émission, le signal (I_e/R) est corrigé par rapport au facteur de correction d'émission lié à l'appareil ainsi que par rapport à la référence pour éviter les fluctuations de l'intensité de la source d'excitation (arc au xénon de 150 W). En fluorescence synchrone, la référence est en plus corrigée par rapport au facteur de correction d'excitation lié à l'appareil (I_e/R_e).

Lors de la complexation des métaux par un ligand, on peut observer deux phénomènes : soit une exaltation de la fluorescence qui est généralement accompagnée d'un déplacement dans les longueurs d'onde, soit une diminution de l'intensité (ou extinction) du signal de fluorescence. Les données obtenues lors de l'exaltation du signal de fluorescence sont exploitées de la même manière que les données obtenues par spectrométrie UV-visible.

Pour définir l'extinction de fluorescence (ou quenching) d'un composé, la constante la plus utilisée est celle de Stern Volmer (K_{sv}) [63]. Cette constante peut être obtenue par la pente de la droite :

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{sv}[Q]$$

Avec I_0 et I les intensités de fluorescence du fluorophore en l'absence et en présence du « quencher » respectivement, et $[Q]$ la concentration totale du « quencher ». Il existe deux types d'extinction : l'extinction statique et l'extinction dynamique.

On est en présence d'une extinction statique lorsque le complexe formé dans l'état fondamental possède un rendement quantique de fluorescence inférieur à celui de la molécule.

Une extinction est dite dynamique lorsque qu'il existe une compétition entre deux voies possible de désexcitation : le retour à l'état fondamental du fluorophore qui produit le signal de fluorescence et un autre processus qui peut être une perte ou un partage de l'énergie

d'excitation avec le quencher, une collision entre les molécules, un processus chimique rapide ...

Il n'est pas rare d'avoir en même temps une extinction statique et une dynamique. Dans ce cas, la courbe I_0/I en fonction de la concentration du « quencher » n'est pas une droite et répond à l'équation :

$$\frac{I_0}{I} = \text{extinction dynamique} \times \text{extinction statique} = (1 + K_{sv}[Q]) \times (1 + K_s[Q])$$

Ce qui donne :

$$\frac{I_0}{I} = 1 + (K_{sv} + K_s)[Q] + K_{sv}K_s[Q]^2$$

Avec K_{sv} la constante d'extinction dynamique et K_s celle d'extinction statique.

Si on est seulement en présence d'une extinction statique, la constante de Stern Volmer devient alors la constante de complexation. En effet, si on considère la formation d'un complexe 1 : 1 non fluorescent qui suit l'équation :



avec M une molécule et Q le quencher. En utilisant la relation de la constante de stabilité du complexe et la loi de conservation de la masse (où $[M]_0$ est la concentration totale de M)

$$K_s = \frac{[MQ]}{[M][Q]} \quad \text{et} \quad [M]_0 = [M] + [MQ]$$

on obtient la fraction de fluorophore non complexé :

$$\frac{[M]}{[M]_0} = \frac{1}{1 + K_s[Q]}$$

Considérant que l'intensité de fluorescence est proportionnelle à la concentration (ce qui est seulement valable pour des solutions diluées) la relation peut alors s'écrire :

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_s[Q]$$

La constante de Stern Volmer devient donc bien la constante de complexation.

Une autre particularité de la spectroscopie de fluorescence est de pouvoir travailler avec une lumière polarisée, ce qui permet d'obtenir d'autres informations que celles données par la

fluorescence classique. On appelle cette technique la polarisation [63].

La lumière est une onde électromagnétique constituée d'un champ électrique E et d'un champ magnétique B perpendiculaires l'un par rapport à l'autre ainsi que par rapport à la direction de propagation, et qui oscillent en phase. Pour la lumière naturelle, ces champs n'ont pas d'orientation préférentielle, mais pour une lumière polarisée linéairement, le champ électrique oscille le long d'une direction donnée ; le cas intermédiaire correspond à une lumière partiellement polarisée (Figure 9).

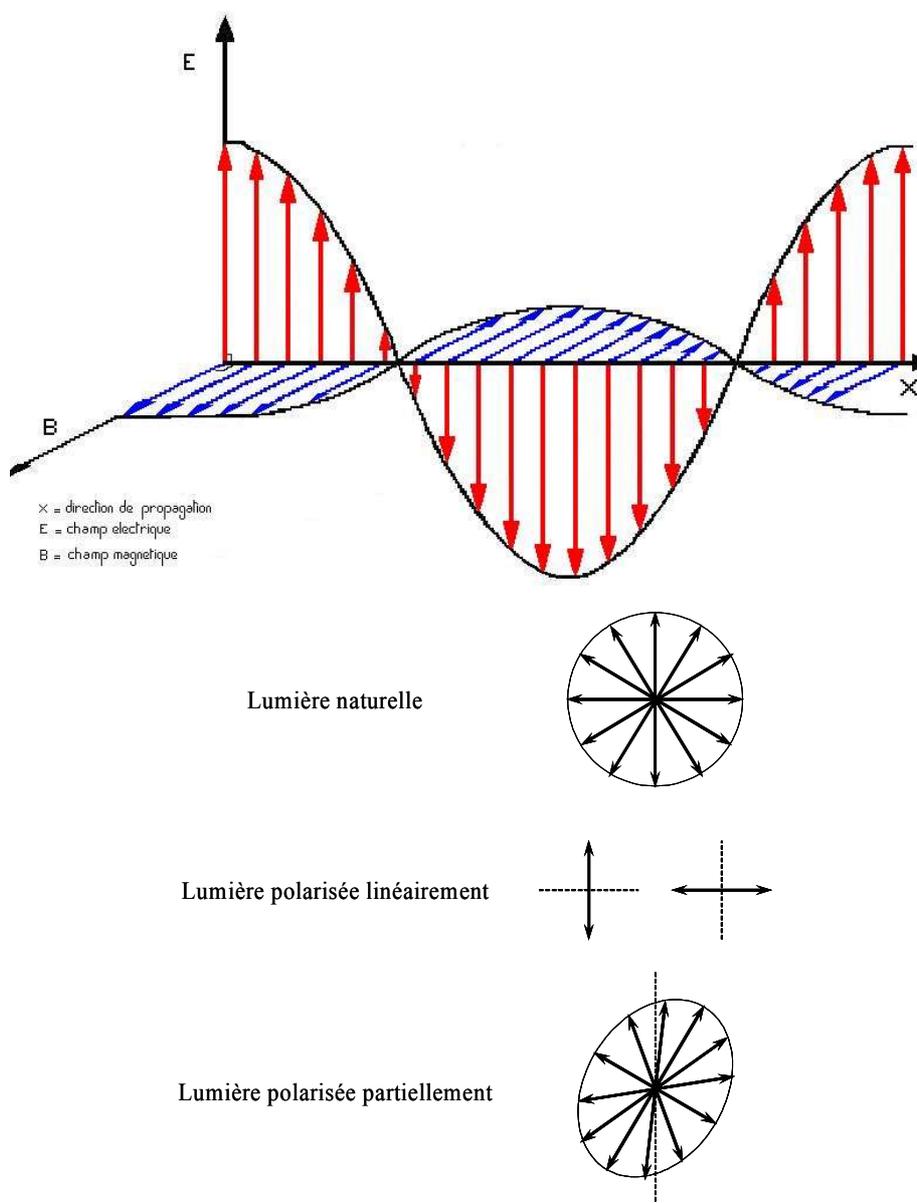


Figure 9 : Lumière naturelle et lumière polarisée

La plupart des chromophores absorbent la lumière suivant une direction privilégiée dépendant du moment de transition d'absorption des différents états électroniques. Par contre,

le moment de transition d'émission est le même quel que soit l'état excité atteint par la molécule lors de son excitation par un faisceau lumineux, à cause des conversions internes vers le premier état excité S_1 .

Par exemple, la molécule d'anthracène possède deux moments de transitions différents : l'un pour la transition $S_0 \rightarrow S_1$ et l'autre pour la transition $S_0 \rightarrow S_2$. Lorsqu'on excite la molécule, elle absorbe la lumière suivant ces deux axes privilégiés (Figure 10). Lorsque la molécule émet un signal de fluorescence, nous avons que la transition $S_1 \rightarrow S_0$ et donc la lumière émise est polarisée suivant le moment de transition $S_1 \rightarrow S_0$.

Figure 10 : Moments de transition d'absorption de la molécule d'anthracène

Si la lumière incidente est polarisée linéairement, la probabilité d'exciter un chromophore est proportionnelle au carré du produit scalaire $M_A \cdot E$, c'est-à-dire à $\cos^2\theta_A$, θ_A étant l'angle entre le vecteur électrique E de la lumière incidente et le moment de transition d'absorption M_A (Figure 11).

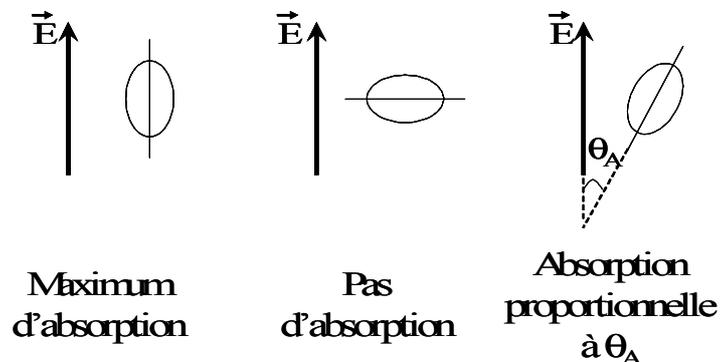


Figure 11 : Règle de photosélection

Cette probabilité est maximale quand E est parallèle au moment de transition M_A de la molécule, elle est nulle quand le vecteur électrique est perpendiculaire.

Ainsi donc, quand une population de fluorophores est illuminée par une lumière incidente polarisée linéairement, ceux qui possèdent des moments de transition orientés dans une direction proche de celle du vecteur électrique du faisceau incident, sont préférentiellement excités. Ce phénomène est appelé photosélection. Ainsi, la distribution des fluorophores excités est anisotrope, par conséquent le signal de fluorescence émis est polarisé. Cependant, tout changement de direction du moment de transition pendant le temps de vie de l'état excité diminuera l'anisotropie et induira une dépolarisation partielle voire totale de la fluorescence. Les causes de dépolarisation de la fluorescence sont :

- Les moments de transition d'absorption et d'émission non parallèles (Excitation vers un état différent de S_1).
- Les torsions moléculaires
- Les mouvements browniens de rotation
- Le transfert de l'énergie d'excitation à une autre molécule possédant une orientation différente.

Les mesures de la polarisation de fluorescence peuvent donc fournir des informations utiles sur la mobilité moléculaire, la taille, la structure et la flexibilité de la molécule, ainsi que sur la fluidité du milieu.

La lumière d'excitation peut être polarisée selon l'axe vertical (V) ou horizontal (H). Pour chaque direction de polarisation du faisceau excité, on peut récolter la fluorescence émise selon la direction verticale (V) ou horizontale (H). On écrit l'intensité de fluorescence obtenue comme suit : I_{VV} , I_{VH} , I_{HV} ou I_{HH} avec la première lettre pour la polarisation de l'excitation et la seconde pour celle de l'émission (schéma 7).

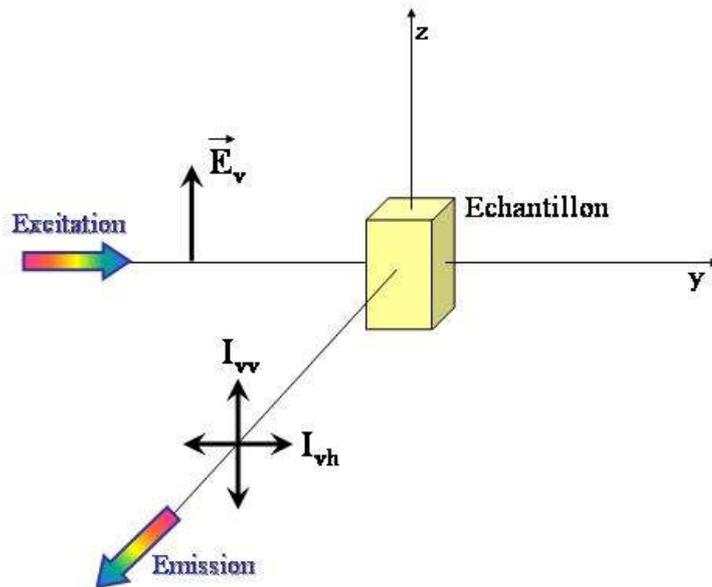


Schéma 7 : Configuration pour mesurer la polarisation de la fluorescence.

Suivant la polarisation de l'excitation et celle de l'émission, l'information recueillie est différente. Dans notre cas, lors de la complexation du métal par un ligand, la taille et la structure du ligand change et donc modifie les mouvements de réorientation de celui-ci en solution. Le signal de fluorescence polarisé sera différent et on pourra donc espérer différencier les espèces présentes en solution.

4 Méthode d'exploitation des spectres expérimentaux

a) Détermination de la stœchiométrie des complexes

La méthode des rapports molaires permet de déterminer la stœchiométrie des complexes en solution à partir des différentes données spectrophotométriques.

Pour déterminer la stœchiométrie du complexe formé entre l'acide caféique (Caf) et l'aluminium (Al (III)) selon l'équilibre suivant :



on réalise une gamme de solutions de concentration constante en acide caféique et de concentration variable en aluminium. Expérimentalement, on ajoute une quantité croissante d'aluminium à une

quantité fixe en acide caféique. On réalise des solutions dont le rapport molaire $R = \frac{[Al]_t}{[Caf]_t}$ varie de 0 à une valeur supérieure à celle correspondant à la stœchiométrie du complexe.

Pour obtenir la composition du complexe, on trace la courbe de variation de l'absorbance en fonction du rapport molaire R. L'absorbance est prise à la longueur d'onde (λ_{max}) où l'absorbance est maximale soit pour le complexe soit pour le ligand. La courbe ainsi tracée peut avoir différentes formes :

- Dans le cas de la formation d'un complexe unique possédant une constante de complexation élevée, la courbe $A(\lambda_{max})$ en fonction de R (Figure 12a) est composée de deux droites dont le

point d'intersection donne directement le rapport $\frac{[Al]}{[Caf]} = \frac{y}{x}$ du complexe (stœchiométrie)

- Pour un complexe unique ayant une constante de complexation plus faible, on observe une variation graduelle de la pente (Figure 12b), jusqu'à l'obtention d'un plateau pour des rapports élevés, l'absorbance ne variant plus. Dans ce cas, la stœchiométrie du complexe correspond au rapport trouvé à l'intersection des tangentes à la courbe (celle à l'origine et celle correspondant au plateau).

- Si plusieurs complexes se sont formés et que leurs constantes sont assez distinctes pour éviter le recouvrement des équilibres, la courbe est alors constituée de plusieurs segments de droite (Figure 12c).

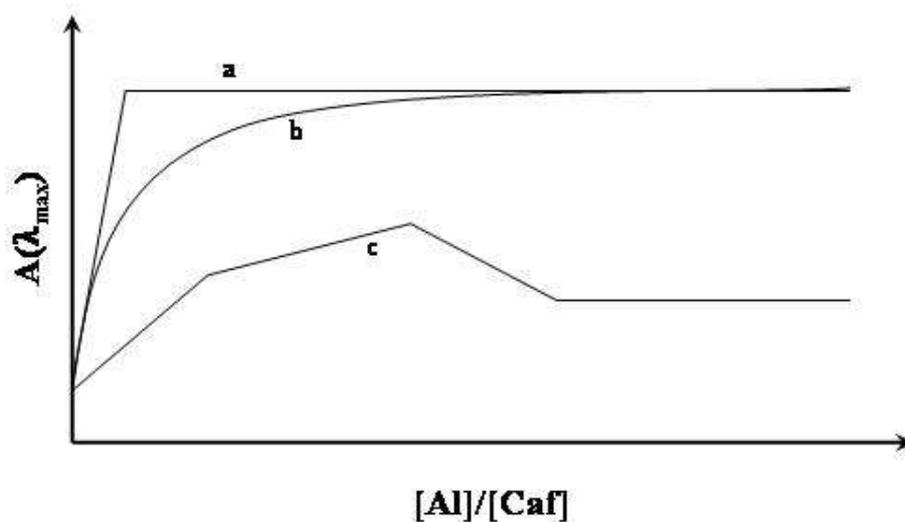


Figure 12 : Evolution de l'absorbance à λ_{\max} en fonction du rapport molaire $[Al]/[Caf]$. a : formation d'un complexe unique de constante d'équilibre élevée, b : formation d'un complexe unique de constante d'équilibre plus faible et c : formation successive de trois complexes d'absorbances différentes et de constantes d'équilibre distinctes.

b) Détermination des constantes de formation des complexes

En complément de la méthode des rapports molaires qui est employée pour déterminer la stœchiométrie des complexes formés, nous avons utilisé le logiciel de traitement de données Specfit/32.

Ce logiciel permet de calculer les constantes de stabilité des espèces complexées formées. Pour cela, il est nécessaire de décomposer, dans un premier temps, les données expérimentales en spectres de composés purs (ligand libre et sous ses différentes formes complexées) par la méthode EFA : « Evolving Factor Analysis ». Pour obtenir une décomposition de bonne qualité, il faut que les bandes d'absorption des espèces présentes soient relativement éloignées les unes des autres en longueur d'onde. Dans un second temps, un modèle de complexation incluant les spectres des composés purs obtenus précédemment est proposé. Ce modèle est composé de l'ensemble des complexes de stœchiométrie différente. On attribue un spectre de composé pur obtenu lors de la décomposition et on affecte une constante de formation de départ à chacun des complexes. Les stœchiométries obtenues par la méthode des rapports molaires sont utilisées pour construire le modèle. Une fois le modèle proposé, on ajuste les constantes de formation initialement données par la méthode des moindres carrés jusqu'à convergence des données. Pour minimiser le résidu des moindres carrés, le logiciel utilise la procédure de Levenberg – Marquardt. Enfin, pour vérifier la

validité des résultats obtenus, l'expérimentateur peut simuler la complexation à l'aide des paramètres calculés. La simulation obtenue doit être en accord avec l'expérience pour pouvoir valider le modèle proposé.

Specfit/32 travaille avec le système de complexation suivant :

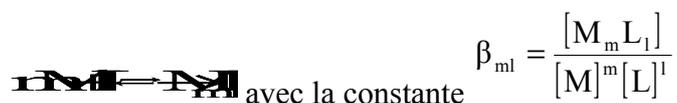


Avec M l'ion métallique libre, L le ligand libre et H le proton H^+ . La constante de complexation calculée est alors :

$$\beta_{mlh} = \frac{[M_m L_h]}{[M]^m [L]^1 [H]^h}$$

Dans le cas où le ligand perd des protons lors de la complexation, le facteur h est négatif.

Dans notre cas, le pH étant constant lors de la complexation, on peut utiliser le modèle général suivant pour résoudre l'équilibre de complexation :



CHAPITRE II

Etude de l'acide caféique

L'acide caféique, petite molécule organique, possède deux sites de complexation présents dans les substances humiques : le groupement acide carboxylique et la fonction catéchol. Dans cette partie, nous présenterons l'influence des différents paramètres physico-chimiques sur la complexation de l'aluminium par l'acide caféique.

VI. Influence du pH sur l'acide caféique

Les propriétés physico-chimiques de l'acide caféique sont bien connues et largement décrites dans la littérature [49, 60-62]. L'étude de l'acide caféique en fonction du pH par spectrophotométrie UV-visible et par fluorimétrie que nous présentons nous a permis, par la détermination des pK_a , de valider les méthodes expérimentales utilisées.

1. Spectrophotométrie UV-visible.

Une étude préliminaire a montré que la zone de linéarité définie par la loi de Beer – Lambert se situe entre 0 et $5 \cdot 10^{-5} M$ pour l'acide caféique. C'est à cette concentration ($5 \cdot 10^{-5} M$) que l'ensemble des mesures en spectrophotométrie d'absorption UV-visible a donc été menée. A cette concentration, le signal maximum est compris entre 0,5 et 1 en absorbance à un pH fixé.

Au cours des tests de reproductibilité, nous avons pu remarquer que l'acide caféique se dégrade à pH basique sous l'influence du faisceau lumineux. En effet, après passage par un pH basique supérieur à 9, le spectre initial de l'acide caféique ne se retrouve pas totalement si on réacidifie la solution. Comme l'illustre la Figure 13, une solution d'acide caféique à pH = 3,39 (spectre 1) a été amenée à un pH = 10,29. On observe alors le spectre d'une nouvelle espèce (spectre 2). En ramenant le pH à sa valeur initiale (3,39), on observe une nette diminution (de l'ordre de 15%) de l'intensité de la bande relative à l'espèce acide (spectre 3). La diminution de l'absorbance est d'autant plus grande que le pH atteint est élevé et que le temps d'irradiation augmente. Il est bien connu que la déprotonation des fonctions hydroxyles

du catéchol favorise la formation d'une structure o-quinonique. L'ortho-quinone de l'acide caféique est un produit d'oxydation biélectronique peu stable (formé par autoxydation et/ou photooxydation) et qui conduit rapidement à des oligomères.

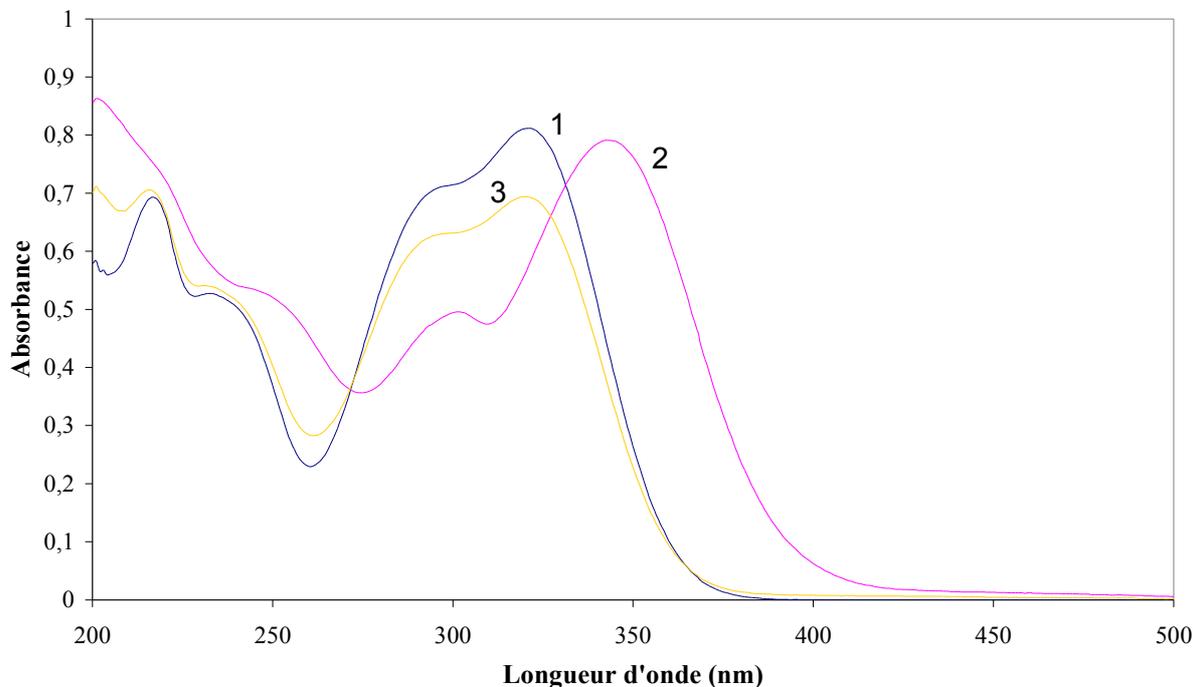


Figure 13 : Reproductibilité du spectre et dégradation de l'acide caféique après un passage à pH basique. 1- pH = 3,39 ; 2- pH = 10,29 ; 3- pH = 3,39

L'évolution du spectre d'absorption de l'acide caféique en fonction du pH est présentée sur la Figure 14. Dans le domaine de pH étudié (2 à 10), nous observons la présence de deux points isosbestiques. Le premier à 291,3 nm correspond à l'équilibre entre la forme protonée H_3Caf et l'espèce monodéprotonée H_2Caf^- , le second, à 320 nm, est attribuable à l'équilibre entre la forme monodéprotonée H_2Caf^- et l'espèce bidéprotonée $HCaf^{2-}$. L'oxydation de la molécule d'acide caféique à pH basique (>9) ne nous a pas permis l'observation du troisième équilibre entre $HCaf^{2-}$ et Caf^{3-} .

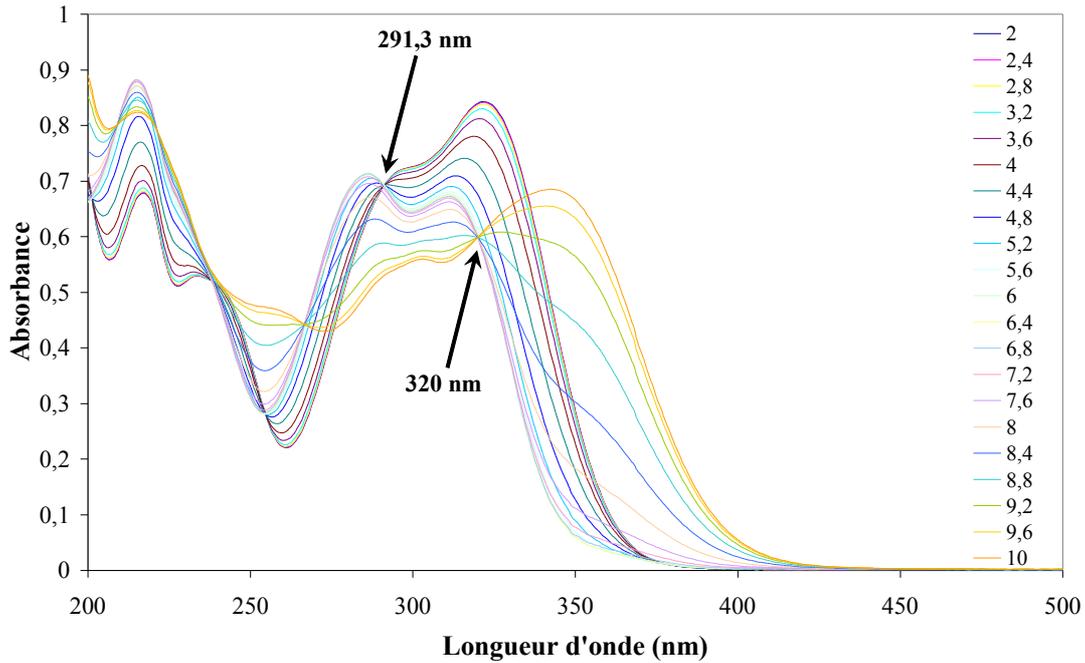


Figure 14 : Evolution du spectre d'absorption de l'acide caféique en fonction du pH.

Les faisceaux de spectres, exploités à l'aide de la méthode EFA, nous permettent d'extraire les spectres des composés purs (Figure 15). Le spectre de l'acide caféique (spectre a) est caractérisé par une double bande ($\lambda_{\max} = 298 \text{ nm}$; 323 nm) et de deux autres bandes dans les plus courtes longueurs d'onde ($\lambda_{\max} = 237 \text{ nm}$ et $\lambda_{\max} = 218 \text{ nm}$). La première déprotonation, qui a lieu sur la fonction acide, conduit à l'obtention du spectre caféate (spectre b), celui-ci est caractérisé par les bandes à $\lambda_{\max} = 313$ et 288 nm . Un déplacement bathochrome est observé lors de la seconde déprotonation, le spectre c relatif à la forme bidéprotonée présente un maximum d'absorption à $\lambda_{\max} = 344 \text{ nm}$ avec une deuxième bande à $\lambda_{\max} = 300 \text{ nm}$.

Les valeurs des pK_a obtenues après affinement au moyen du logiciel Specfit/32 sont regroupées dans le tableau suivant (Tableau 2). Ces valeurs sont en parfait accord avec celles fournies par la littérature [49] qui ont été déterminées par potentiométrie.

| | Cette étude | Littérature |
|-----------------------------|-----------------|-------------|
| pK_a (-COOH) | $4,47 \pm 0,06$ | 4,45 |
| pK_a (-O ₄ -H) | $8,59 \pm 0,04$ | 8,66 |
| pK_a (-O ₃ -H) | $10,5 \pm 0,6$ | 11,8 |

Tableau 2 : valeur des pK_a des différents protons des groupements de l'acide caféique

Le troisième pK_a , celui du second proton du groupement du catéchol, est en fait une estimation. En effet, ne pouvant pas obtenir le spectre de l'espèce pure Caf^{3-} , nous avons fixé les deux premiers pK_a et ajusté la troisième valeur sans avoir son spectre, ce qui explique l'incertitude plus élevée pour le pK_a de cette espèce.

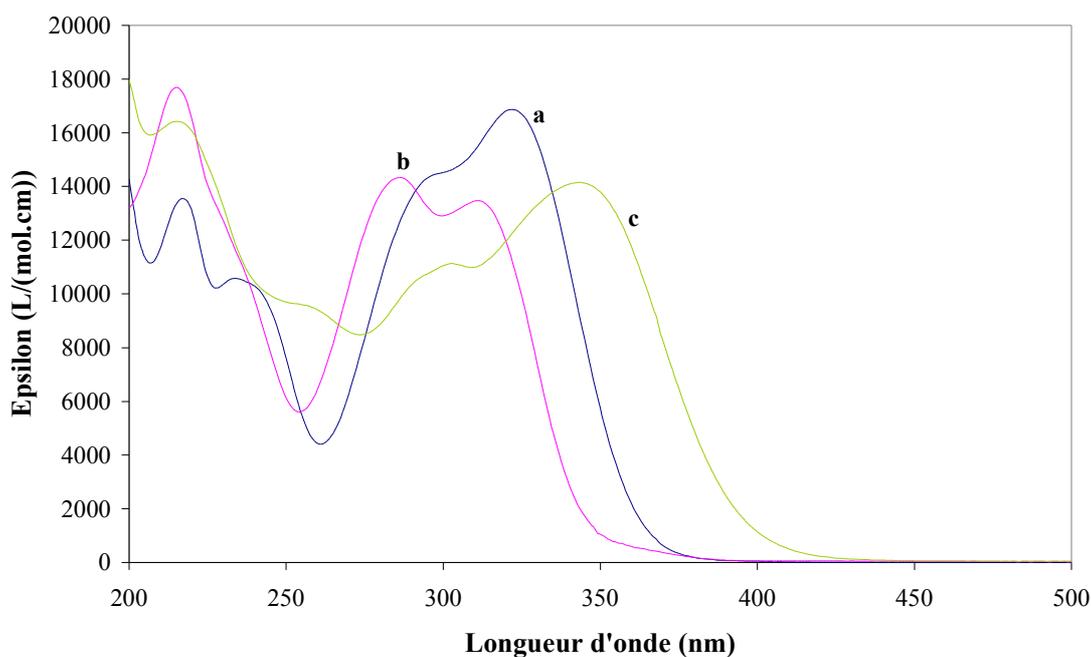


Figure 15 : Spectres d'absorption des espèces pures extraites par la méthode EFA. a : H_3Caf , b : H_2Caf^- , c : $HCaf^{2-}$

A partir de ces valeurs, nous pouvons représenter l'évolution des concentrations des différentes espèces de l'acide caféique en fonction du pH (Figure 16). On remarque qu'à pH 6,5, l'espèce monodéprotonée H_2Caf^- (caféate) est prépondérante en solution.

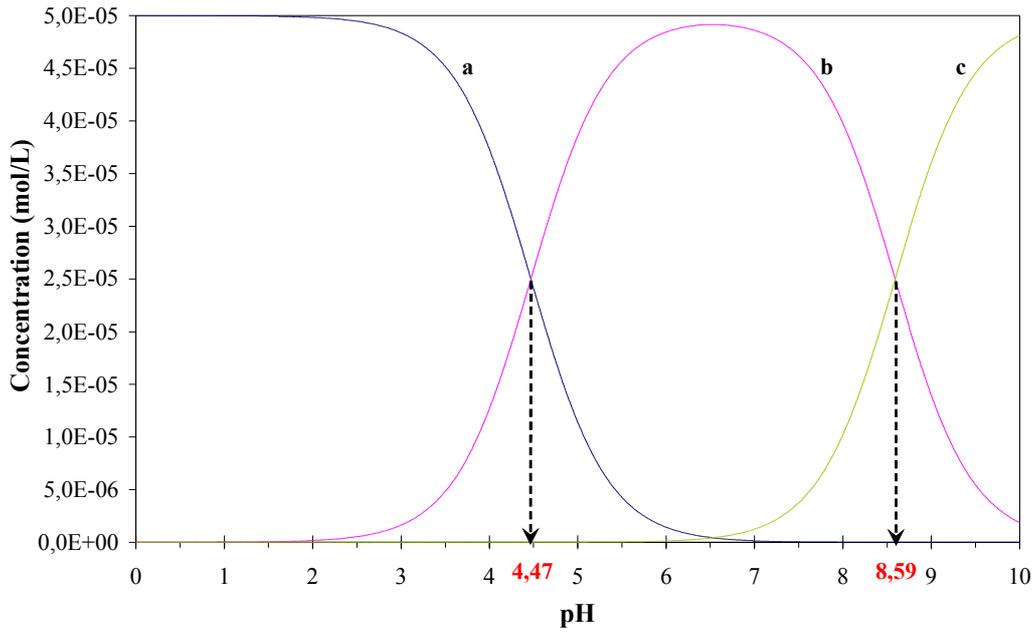


Figure 16 : Evolution des concentrations des différentes espèces en fonction du pH. a : H₃Caf, b : H₂Caf⁻, c : HCaf²⁻

2. Spectroscopie de Fluorescence

La spectrométrie de fluorescence présente une sensibilité supérieure à celle de la spectroscopie d'absorption, ce qui permet de travailler à des concentrations plus faibles. Avant d'entreprendre l'étude de l'acide caféique en fonction du pH par spectroscopie de fluorescence, il est nécessaire de déterminer le domaine de linéarité du signal en fonction de la concentration, en émission et en fluorescence synchrone (Figure 17). La limite de linéarité est obtenue pour une concentration en acide caféique de $2 \cdot 10^{-5} \text{M}$. Dans toute la zone précédant cette valeur, on peut considérer que l'intensité du signal de fluorescence est proportionnelle à la concentration du fluorophore, ce qui permet d'effectuer toutes corrections dues à une dilution. Pour optimiser l'intensité du signal de fluorescence ainsi que le rapport signal sur bruit, les expériences ont été menées avec une concentration en acide caféique de $2 \cdot 10^{-5} \text{M}$.

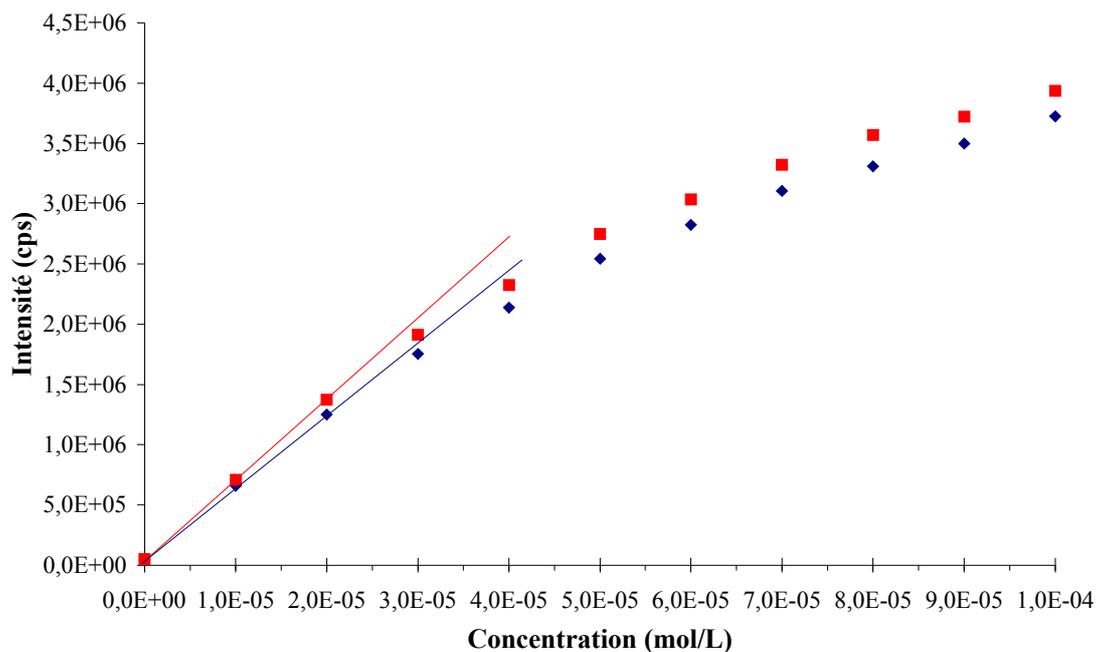


Figure 17 : Linéarité du signal de fluorescence en fonction de la concentration à pH = 6,5 ± 0,03.

- ◆ Spectre d'émission : $\lambda_{ex} = 320$ nm, $\lambda_{em} = 340 - 600$ nm, fente 5 nm, signal Sc/R, intégration 0,5 s, incrément 1 nm.
- Spectre synchrone : offset de 112 nm, $\lambda_{ex} = 250 - 500$ nm, fente 5 nm, signal Sc/Rc, intégration 0,5 s, incrément 1 nm.

Le problème de la dégradation de l'acide caféique, déjà évoqué en absorption, est ici beaucoup plus crucial à cause de la puissance du faisceau d'excitation.

Malgré l'utilisation du système de cuve à circulation, la molécule d'acide caféique se dégrade de manière continue sous l'action du faisceau d'excitation. Ce phénomène est parfaitement illustré lors de l'enregistrement d'une matrice MEE. Il faut rappeler que cet enregistrement dure plusieurs heures. A pH 6,5 l'acide caféique (Figure 18), présente deux massifs importants. Le massif A composé de deux bandes de fluorescence à 281/419 nm et 310/419 nm ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$) et le massif B à 383/471 nm. Ce dernier n'est pas mis en évidence lorsqu'on enregistre, en quelques minutes, les spectres d'émission ($\lambda_{ex} = 281, 310$ et 383 nm) d'une solution d'acide caféique fraîchement préparée, et peut donc être attribué à un produit de dégradation de l'acide caféique. Cette attribution peut être confirmée par l'enregistrement d'une matrice MEE de l'acide 3,4-diméthoxycinnamique (Figure 19) à pH 6,5

Dans cette molécule, les fonctions hydroxyles du catéchol sont substituées par des méthyles, ce qui empêche la déprotonation donc la réaction de photooxydation de la molécule. Sur la matrice

MEE de l'acide 3,4-diméthoxycinnamique, seul le massif A est observé, même après plusieurs heures d'exposition.

On peut envisager que cette photodégradation soit due à la formation d'une espèce RO* (dans l'état excité, où les hydroxyles sont plus acides), cette espèce sera rapidement oxydée pour donner une forme quinonique qui présente un signal de fluorescence différent de l'acide caféique [71, 72]. La présence du massif B peut également être dû à l'isomérisation trans - cis de la molécule. Cette transformation serait favorisée par la déprotonation de O₄-H qui augmente l'effet (+M) de O₄ et diminue en conséquence le caractère de double-liaison de C α -C β . Dans le cas de l'acide 3,4-diméthoxycinnamique, la barrière énergétique pour passer de l'isomère trans à cis est plus élevée car l'effet mésomère (+M) des groupements O₄-Me est beaucoup plus faible. En conséquence, aucune isomérisation n'est observée. Seule, une analyse plus complète (par chromatographie, par exemple) du photoproduit, aurait pu valider cette dernière hypothèse.

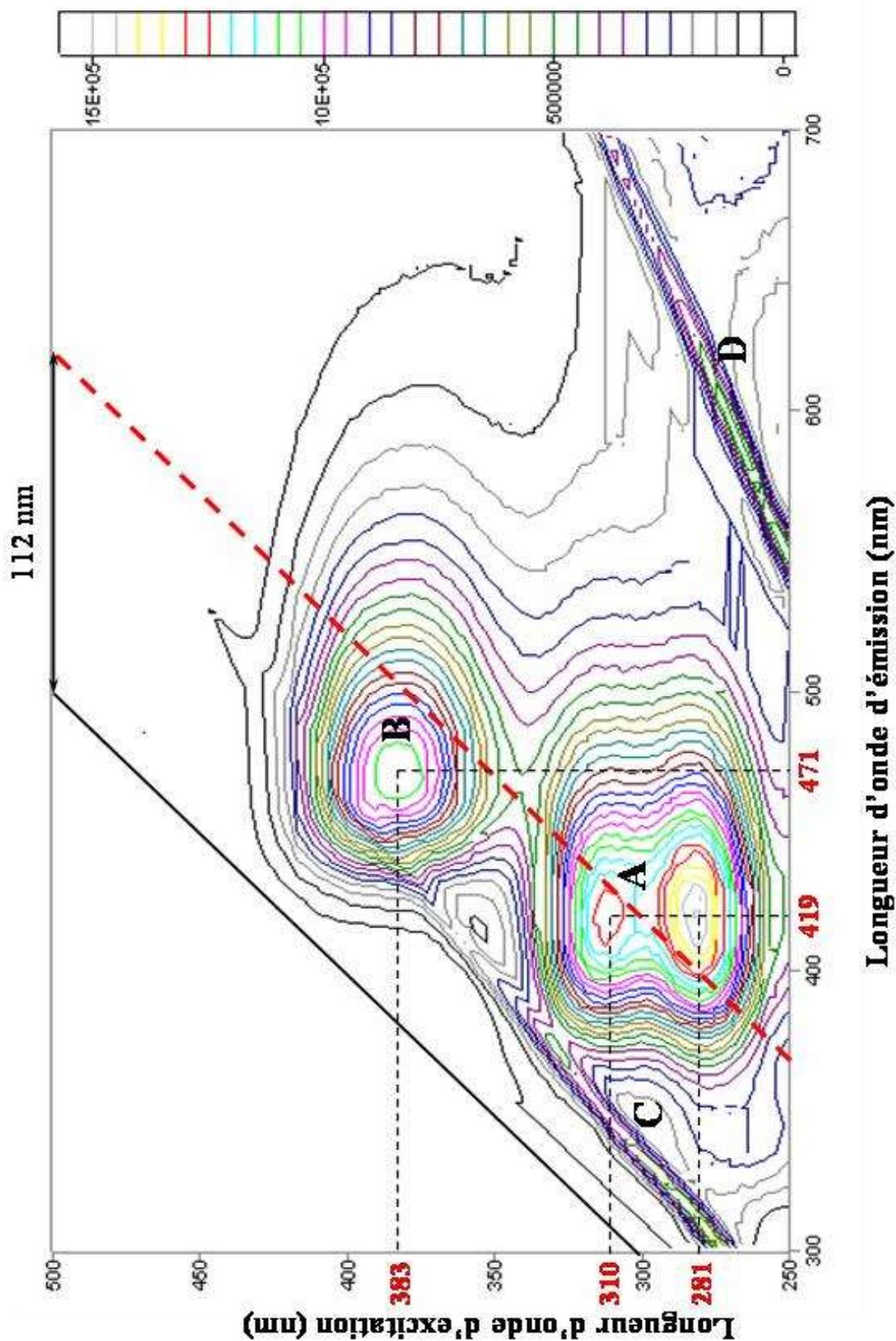


Figure 18 : Matrice MEE de l'acide caféique ($2.10^{-5}M$) à $pH = 6,5 \pm 0,1$. A : bandes de l'acide caféique, B : produit de dégradation de l'acide caféique, C : bande Raman de l'eau, D : bande Raman de l'eau du second ordre

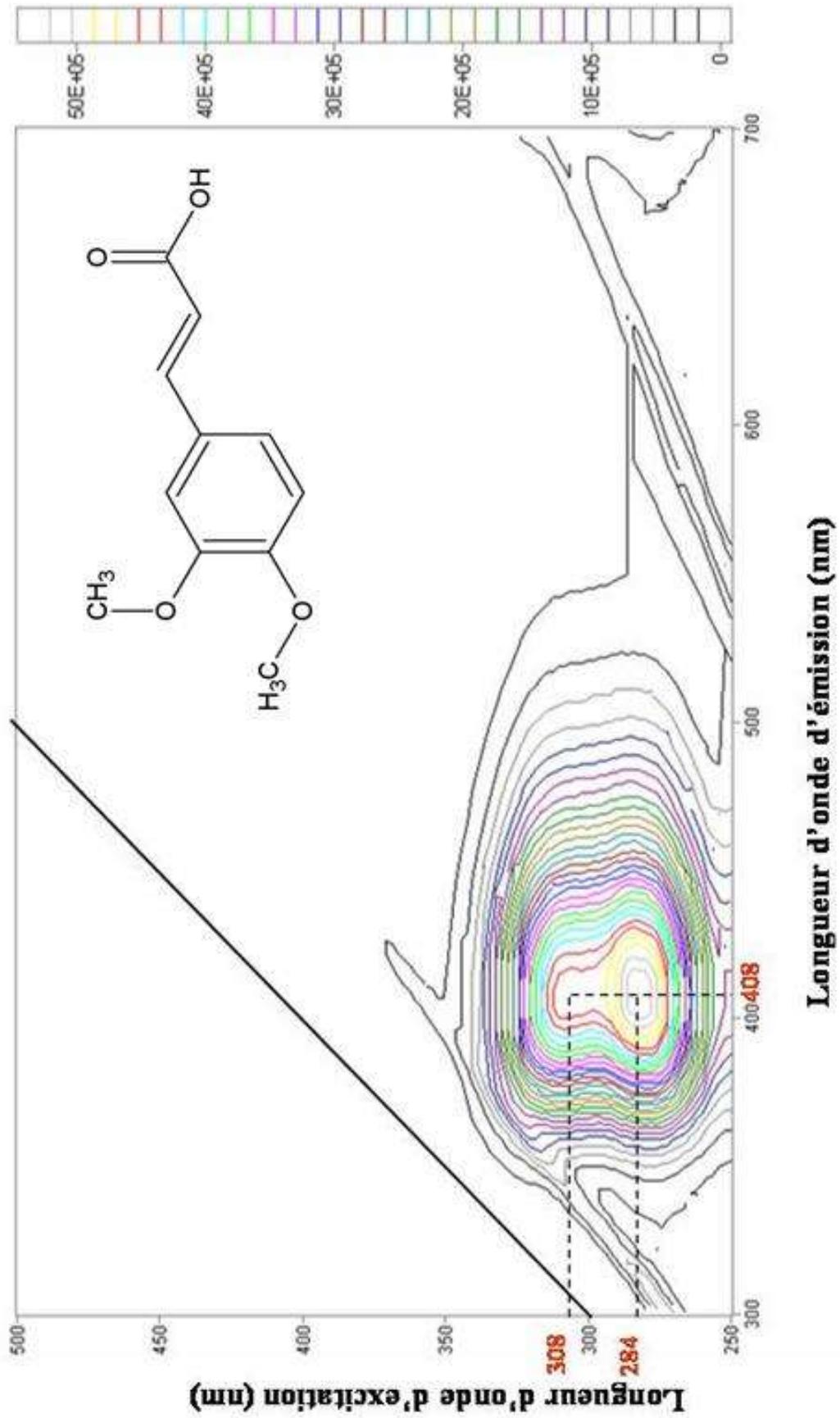


Figure 19: Matrice MEE de l'acide diméthoxycinnamique ($2.10^{-5}M$) à $pH = 6,5 \pm 0,1$.

Les spectres de fluorescence synchrone de l'acide caféique, obtenus pour différents pH, sont représentés sur la Figure 20. On remarque que, pour des valeurs de pH supérieures à 7, le photoproduit est responsable de l'apparition d'une bande intense centrée à 373 nm.

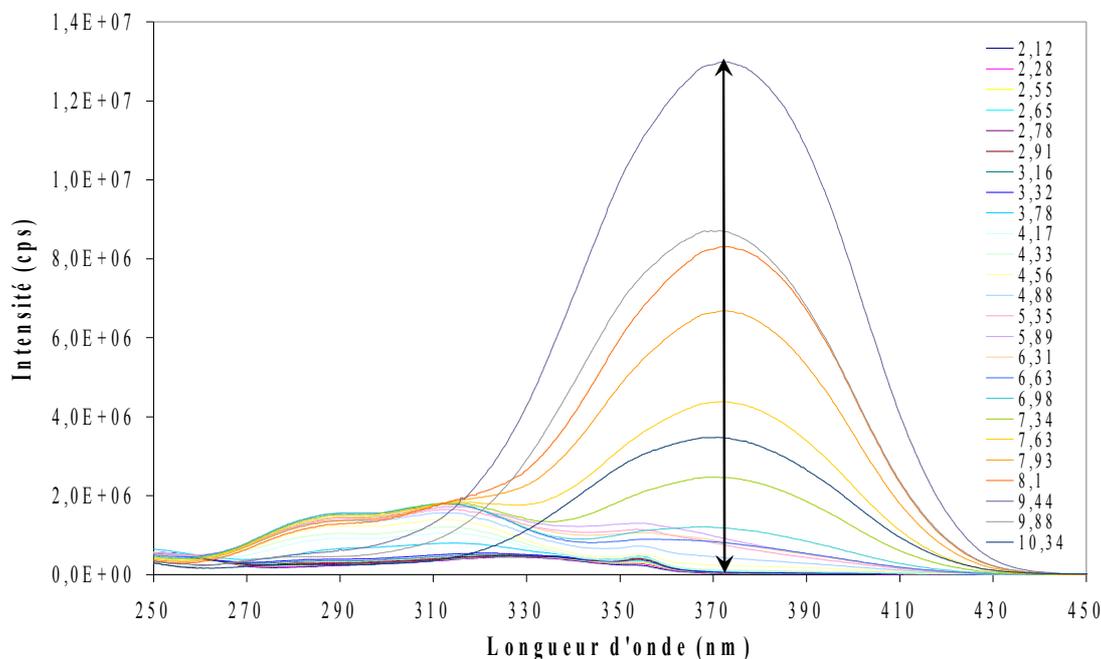


Figure 20 : Evolution du spectre de fluorescence synchrone de l'acide caféique en fonction du pH. (offset = 112 nm).

Lors de l'exploitation de ces résultats par le logiciel Specfit/32, cette nouvelle espèce a du être prise en compte dans l'évolution des espèces. Les spectres purs obtenus par la méthode EFA sont présentés sur la Figure 21. Le spectre de l'acide caféique (spectre a) possède une intensité très faible comparée aux autres spectres ($I < 4.10^4$ cps). Il est caractérisé par deux bandes principales : l'une à $\lambda_{ex, max} = 322$ nm et l'autre à $\lambda_{ex, max} = 354,5$ nm. Cette dernière se retrouve dans le spectre du caféate (spectre b). Il est aussi caractérisé par une double bande à $\lambda_{ex, max} = 288$ et $\lambda_{ex, max} = 313,5$ nm. Lors de la seconde déprotonation, on observe un déplacement bathochrome, le spectre c relatif à l'espèce bidéprotonée est caractérisé par une bande d'intensité quarante fois supérieure à celle de l'acide caféique à $\lambda_{ex, max} = 375$ nm. Cette bande possède un épaulement à $\lambda_{ex} = 286$ nm. Le spectre correspondant au produit de dégradation de l'espèce bidéprotonée (spectre d) est caractérisé par une seule bande à $\lambda_{ex, max} = 371$ nm.

Ainsi, contrairement à la spectroscopie d'absorption UV-visible où aucune espèce

absorbante due à la décomposition n'avait été mise en évidence, on observe la formation importante d'une espèce fluorescente issue de la photodécomposition de l'espèce HCaf^{2-} .

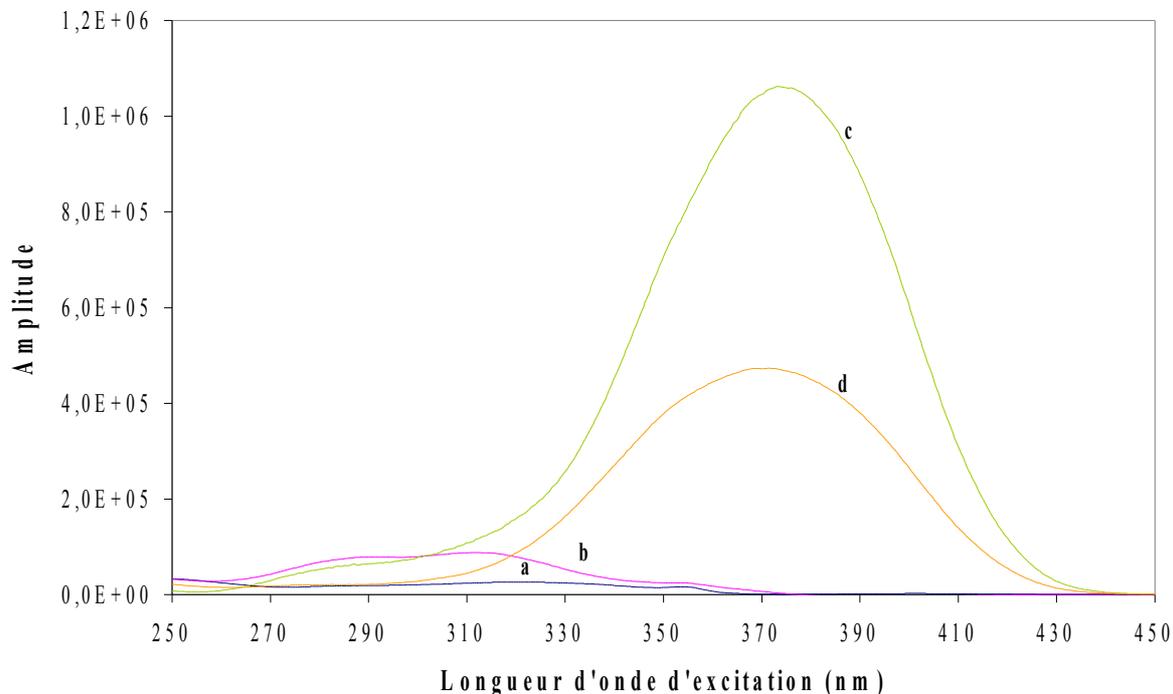


Figure 21 : Spectres synchrones des espèces pures extraites par la méthode EFA. a : H_3Caf , b : H_2Caf^- , c : HCaf^{2-} , d : photoproduit issu de l'espèce HCaf^{2-}

Les pK_a obtenus : $\text{pK}_a(-\text{COOH}) = 4,22$ et $\text{pK}_a(-\text{OH})_1 = 8,28$ sont légèrement inférieurs à ceux calculés à partir des données UV-visible. Ceci peut sans doute s'expliquer par le fait que la valeur obtenue reflète plus les propriétés acido-basiques de l'état excité mis en jeu dans le processus d'émission. De plus la seconde valeur, relative à l'équilibre $\text{H}_2\text{Caf}^-/\text{HCaf}^{2-}$, est perturbée par l'apparition du photoproduit.

L'évolution des concentrations, qui prend en compte la dégradation de la forme bidéprotonée HCaf^{2-} (Figure 22) est différente de celle obtenue par absorption UV-visible.

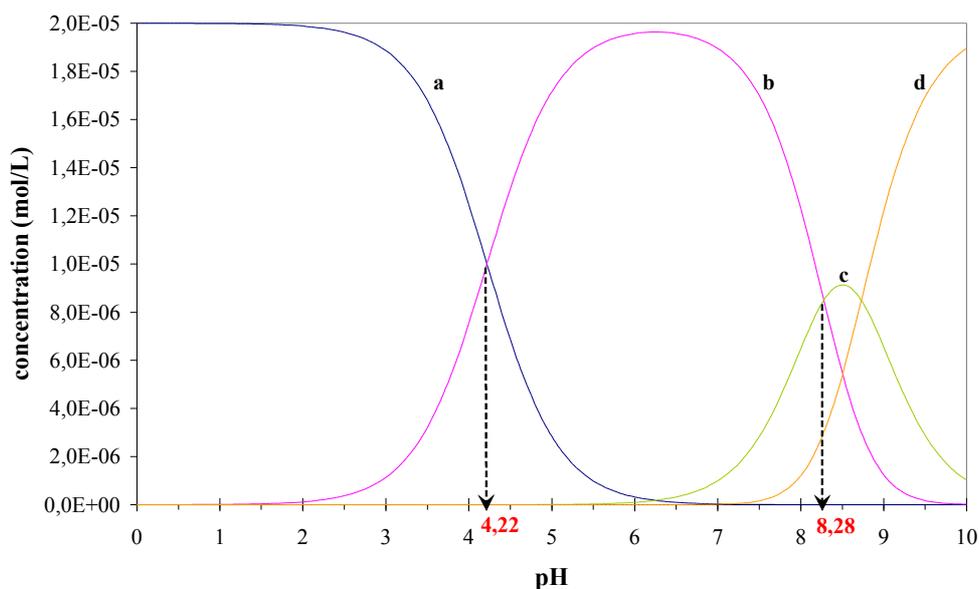


Figure 22 : Evolution des concentrations des différentes espèces en fonction du pH. a : H_3Caf , b : H_2Caf^- , c : $HCaf^{2-}$, d : produit de dégradation de l'espèce $HCaf^{2-}$.

Les pK_a calculés par spectrophotométrie UV - Visible et par fluorimétrie sont très proches de ceux trouvés dans la littérature [49], sauf pour la seconde protonation du site catéchol qui n'a pas été réellement pris en compte dans notre étude. La molécule d'acide caféique est peu stable en milieu basique et s'avère être très sensible au rayonnement lumineux. Pour diminuer cette dégradation, le travail aurait pu s'effectuer en milieu inerte, mais cela nous aurait éloignés de notre but qui est l'étude de la complexation dans le milieu naturel des sols et donc en présence de l'oxygène de l'air.

VII. Etude de la complexation de l'aluminium par l'acide caféique

Le pH des sols peut varier de 3 à 8 suivant le type de sol, les saisons, les cultures... Dans un premier temps, nous avons choisi un pH de 6,5 pour notre étude, pour différentes raisons :

- Cette valeur est celle d'un pH proche d'un sol neutre, ce qui permet de se placer dans des conditions physico – chimiques voisines de celles des milieux naturels.
- A ce pH, on limite l'apparition de photoproduits.
- Comme nous l'avons vu précédemment, pour cette valeur il n'existe en solution aqueuse qu'une seule forme de l'acide caféique : la forme monodéprotonée H_2Caf^- .

Dans un second temps, afin d'observer l'influence de la proportion d'espèces monodéprotonées et non déprotonées de l'acide caféique, nous avons travaillé à pH 5. Ce pH reste courant pour un sol acide.

1. Etude préliminaire et conditions expérimentales

La complexation a été suivie à pH fixe (5 ou 6,5) pour différents rapports $[Al]/[Caf]$. Pour faire varier ce rapport, certaines quantités d'aluminium de concentration allant de 10^{-4} à $10^{-2}M$ ont été ajoutées à une solution de départ en acide caféique au pH choisi. L'addition d'aluminium entraîne une diminution du pH qu'il faut compenser par ajout de soude. Cette méthode entraîne automatiquement une correction des spectres obtenus avant l'exploitation des résultats.

Les expériences en spectrométrie UV-visible ont été menées avec les mêmes paramètres que ceux utilisés lors de l'étude de l'acide caféique en fonction du pH. En ce qui concerne la spectroscopie de fluorescence, nous avons dû déterminer, dans un premier temps, les longueurs d'onde d'excitation les mieux adaptées pour l'enregistrement des spectres d'émission ainsi que l'offset pour l'enregistrement des spectres synchrones.

Pour cela, nous avons enregistré la matrice MEE du complexe aluminium – acide

caféique à pH 6,5 pour un rapport de 1 (Figure 23) afin de la comparer à la matrice MEE de l'acide caféique au même pH (Figure 18).

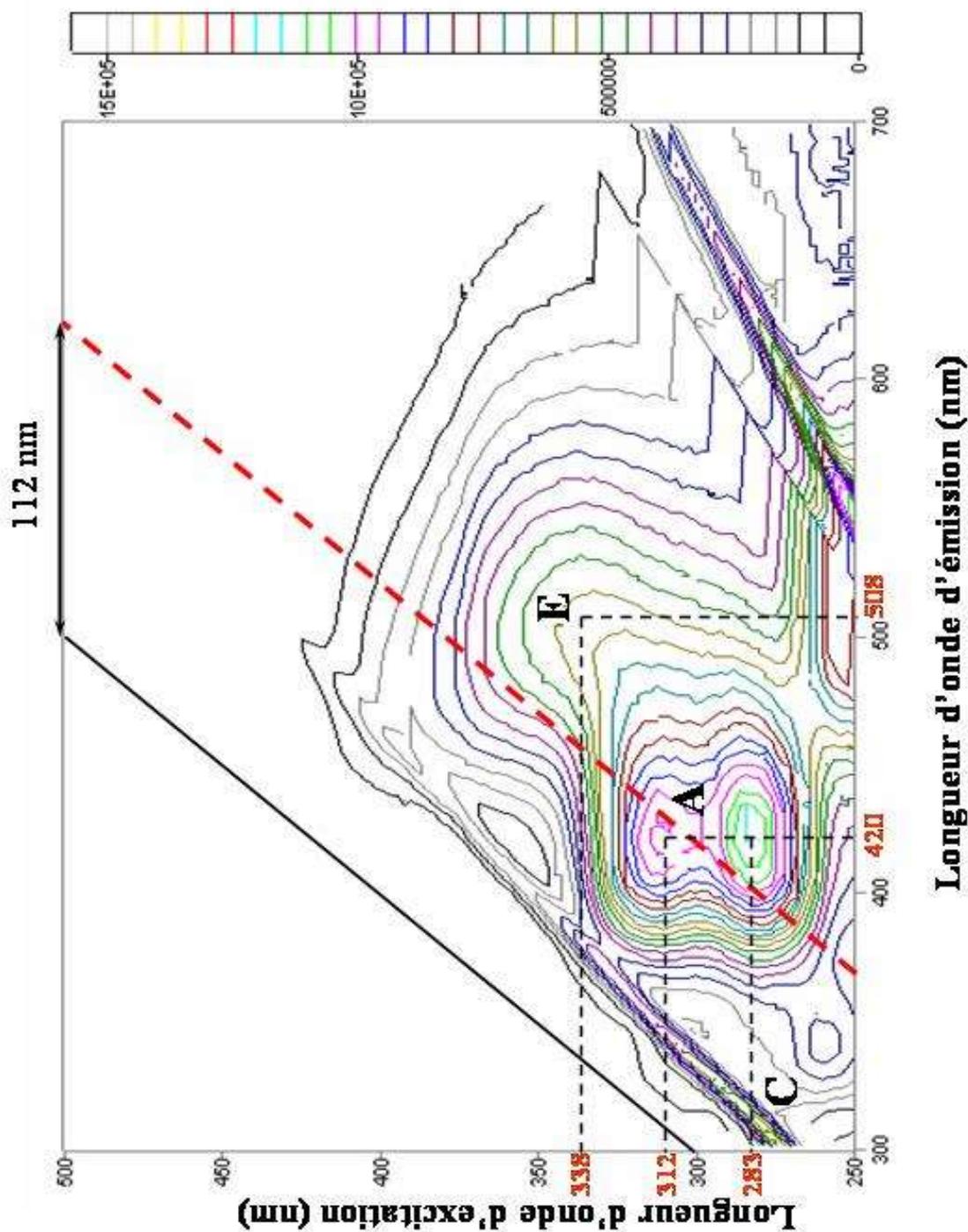


Figure 23 : Matrice MEE du complexe aluminium – acide caféique pour un rapport de 1 à pH $6,5 \pm 0,1$. A : bandes de l'acide caféique ; E : bande du complexe.

On remarque, sur la matrice MEE du complexe, la présence du massif A correspondant aux bandes de l'acide caféique et de l'apparition d'un autre massif E (338/508 nm). Ce dernier est

attribuable à la formation du complexe. On constate aussi la disparition du massif B dû au photoproduit issu de l'acide caféique. Précédemment, nous avons constaté que la substitution des hydroxyles par des méthyles empêche la formation du photoproduit ce qui entraîne la disparition du massif B observé sur la matrice MEE de la Figure 18. Ici, en présence du complexe, la disparition de ce massif montre que les hydroxyles du catéchol sont substitués. On a donc la chélation de l'aluminium sur le site catéchol de l'acide caféique. Cela confirme l'hypothèse d'Adams *et al.* [48] qui supposaient une complexation de l'aluminium sur le site catéchol avec déprotonation de celui-ci.

D'après les deux matrices (Figure 18 et 23), un offset de 112 nm permet de suivre simultanément l'évolution des deux bandes de l'acide caféique ainsi que celle du complexe lors de la chélation de l'aluminium (III) par l'acide caféique. Pour compléter l'étude de la complexation par fluorescence synchrone, deux longueurs d'onde d'excitation ont été choisies pour étudier la complexation par fluorescence d'émission. On a choisi comme longueurs d'onde d'excitation 320 nm afin d'observer simultanément les bandes de l'acide caféique et celle du complexe et ensuite 340 nm qui correspond au maximum d'une des formes complexées.

A pH 6,5, la quantité d'aluminium qu'il est possible d'ajouter à la solution d'acide caféique est limitée à cause de la précipitation d'hydroxyde d'aluminium $\text{Al}(\text{OH})_3$. A pH 5, il est possible d'obtenir des rapports molaires beaucoup plus importants avant d'observer cette précipitation. Le fait d'avoir une gamme de concentration plus étendue favorise l'exploitation des résultats et notamment la décomposition en spectres d'espèces pures. C'est pourquoi nous présentons, dans un premier temps, les résultats à pH 5 qui serviront dans une certaine mesure à l'exploitation des résultats obtenus à pH 6,5.

2 Etude de la complexation à pH 5

a) Résultats

Le faisceau de spectres obtenu par spectrophotométrie UV-visible lors de la complexation de l'aluminium par l'acide caféique à pH 5 (Figure 24) a été enregistré pour différents rapports $R = [Al]/[Caf]$.

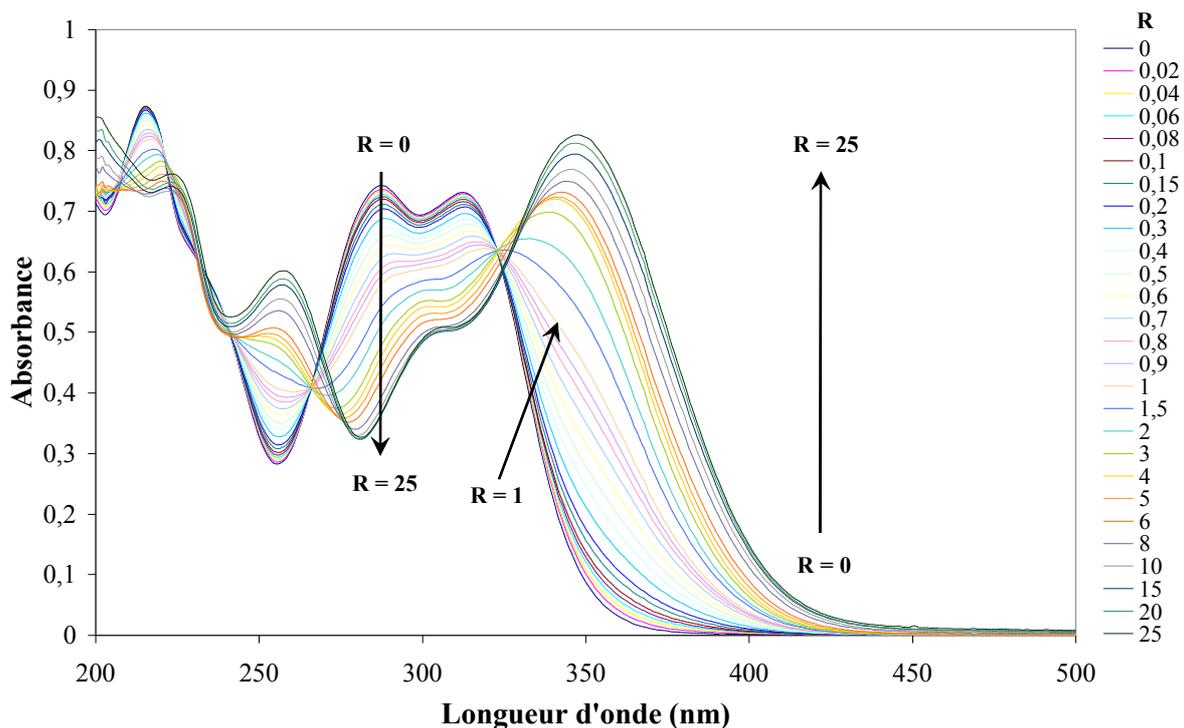


Figure 24 : Etude de la complexation de l'aluminium (III) par l'acide caféique à pH 5. $R = 0$ à 25

On constate sur cette figure, la présence successive de deux points isosbestiques. Le premier se situe à 322 nm pour de petits rapports molaires compris entre 0 et 2 et le second à 333 nm pour les rapports $R > 2$. Nous avons donc au minimum 3 espèces : la molécule d'acide caféique seule en équilibre avec un premier complexe et ce dernier en équilibre avec un second complexe. De plus, on remarque que les déplacements en longueurs d'onde sont relativement faibles entre les complexes formés (21 nm pour le premier équilibre et 15 nm pour le second). On constate que les spectres des différentes espèces présentes sont très proches les uns des autres. Il peut donc exister d'autres espèces minoritaires dont les spectres diffèrent peu de ceux des espèces majoritaires et dont la faible contribution dans le faisceau de spectres est telle qu'il est impossible de les détecter par la présence de points isosbestiques.

La complexation de l'aluminium par l'acide caféique à pH 5 a aussi été suivie par fluorescence d'émission à $\lambda_{\text{ex}} = 320$ nm (Figure 25 A), à $\lambda_{\text{ex}} = 340$ nm (Figure 25 B) et par fluorescence synchrone avec un offset de 112 nm (Figure 25 C). On constate que pour tous les faisceaux de spectres, on a un point où plusieurs spectres se croisent : le point isoémissif. On constate l'existence de plusieurs points isoémissifs très proches les uns des autres et il est impossible de donner les coordonnées précises de ces points. On ne peut fournir qu'une coordonnée approximative à ± 2 nm pour l'ensemble des points. Le point isoémissif se trouve à 445 nm pour les spectres à $\lambda_{\text{ex}} = 320$ nm, à 418 nm pour ceux à $\lambda_{\text{ex}} = 340$ nm et à 327 nm en excitation et donc à 439 nm en émission pour les spectres synchrones.

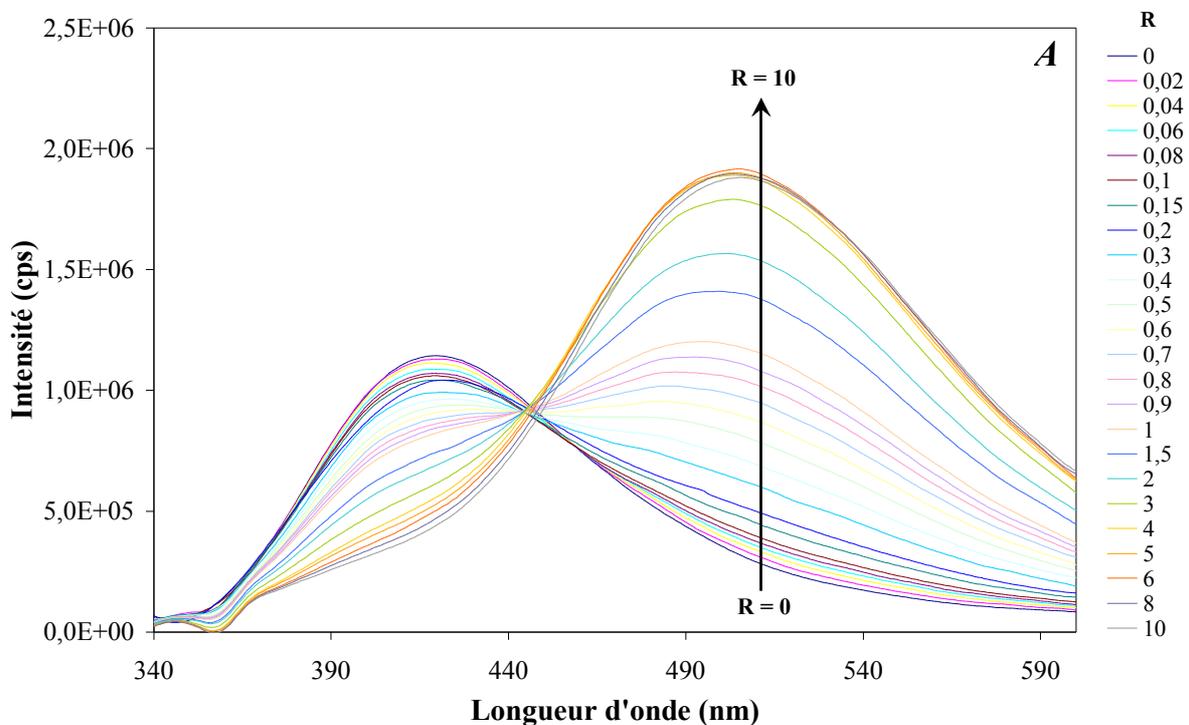


Figure 25 : Etude de la complexation de l'aluminium (III) par l'acide caféique à pH 5. A : spectres d'émission à $\lambda_{\text{ex}} = 320$ nm ; B : spectres d'émission à $\lambda_{\text{ex}} = 340$ nm ; C : spectres synchrones à un offset de 112 nm.

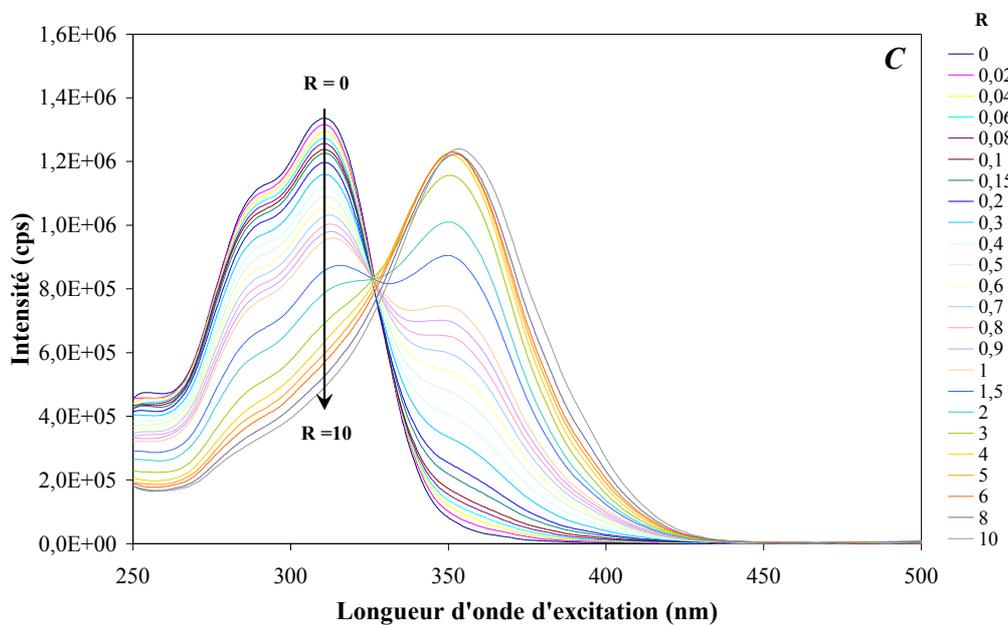
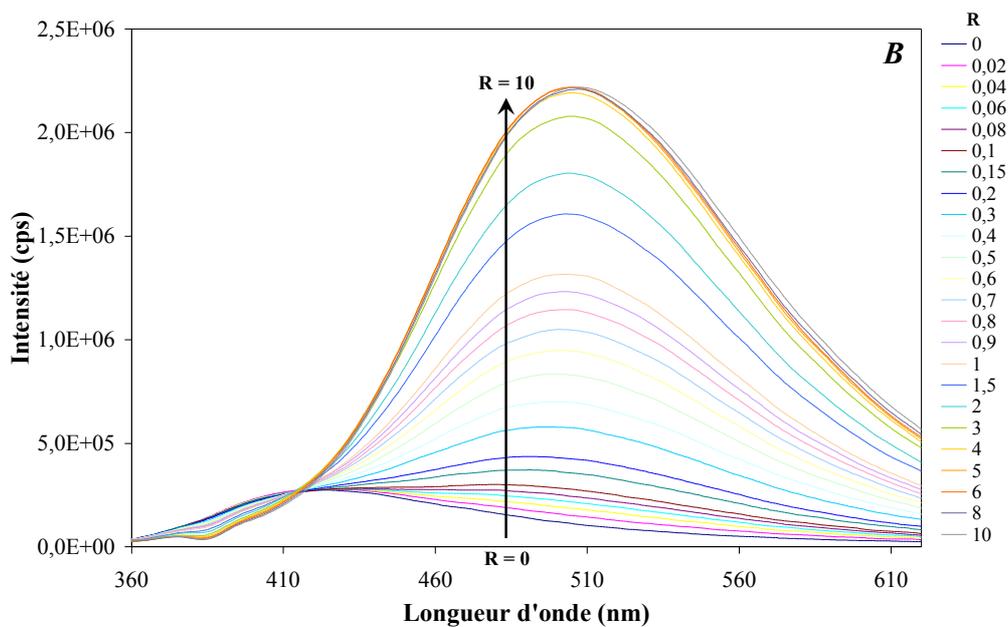


Figure 25 suite : Etude de la complexation de l'aluminium (III) par l'acide caféique à pH 5. A : spectres d'émission à $\lambda_{ex} = 320$ nm ; B : spectres d'émission à $\lambda_{ex} = 340$ nm ; C : spectres synchrones à un offset de 112 nm.

Nous avons donc plusieurs espèces en équilibre dans la solution. Comme en spectrophotométrie UV-visible, il est impossible de distinguer les différents complexes car leurs maxima sont très proches les uns des autres, ce qui explique la présence de plusieurs points isoémissifs si proches les uns des autres.

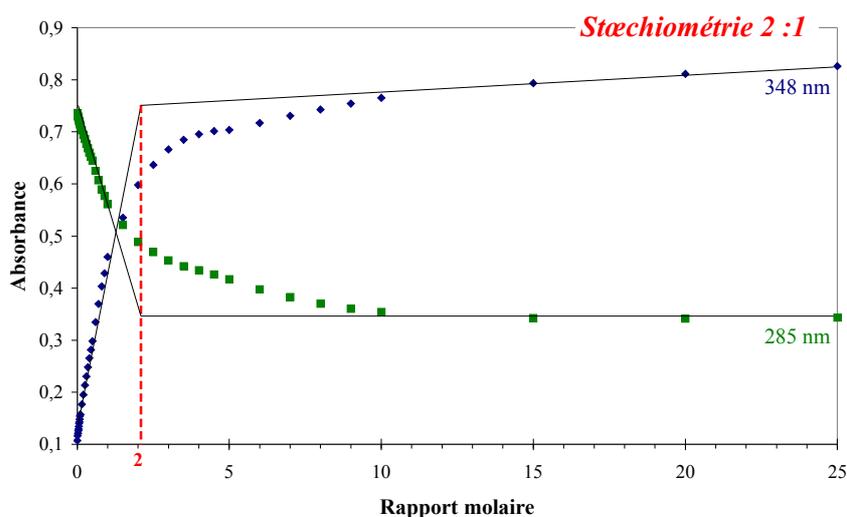
b) Exploitations des résultats

Pour la méthode des rapports molaires, en UV-visible (Figure 26), on a tracé l'évolution de l'absorbance en fonction des rapports molaires à 348 nm au maximum du complexe pour un rapport $R = 25$ et à 285 nm à l'un des maxima de l'acide caféique. Nous obtenons, à pH 5, des complexes de rapport 2 ; 1 ; 0,5 ; 0,33 et 0,166 qui correspond respectivement à des complexes de stœchiométrie (Al :Caf) 2 :1, 1 :1, 1 :2, 1 :3, et 1 :6. On remarque que l'on obtient 3 complexes de plus que le nombre prédit par les points isosbestiques. Dans le faisceau de spectres, on observe donc les points isosbestiques dus aux équilibres entre les espèces majoritaires.

Comme nous avons constaté que l'aluminium se complexe sur le site catéchol doublement déprotoné de l'acide caféique, les complexes possibles ont donc les formules chimiques suivantes :

| Stœchiométrie | Formule |
|---------------|--------------------------------|
| 2 :1 | $[\text{Al}_2\text{Caf}]^{3+}$ |
| 1 :1 | $[\text{AlCaf}]^0$ |
| 1 :2 | $[\text{AlCaf}_2]^{3-}$ |
| 1 :3 | $[\text{AlCaf}_3]^{6-}$ |
| 1 :6 | $[\text{AlCaf}_6]^{6-}$ |

Une des possibilités pour la formation du complexe 1 :6 est la formation d'un complexe 1 :3 avec des dimères de l'acide caféique.



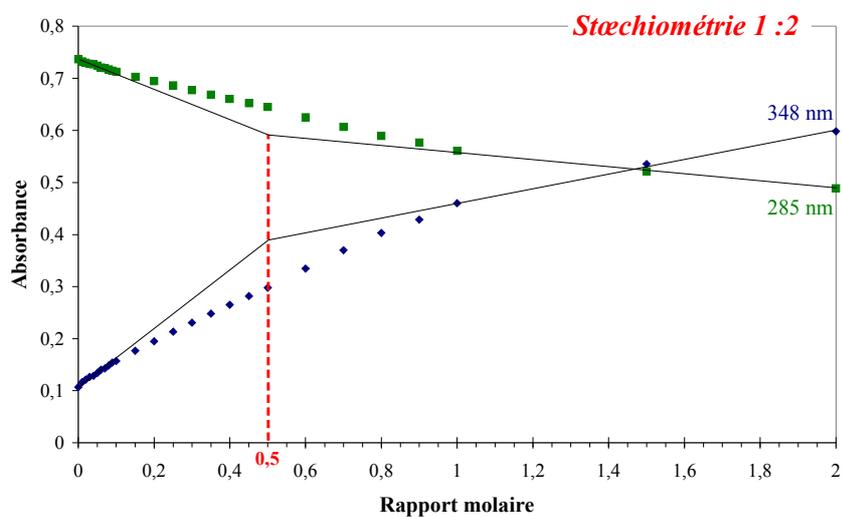
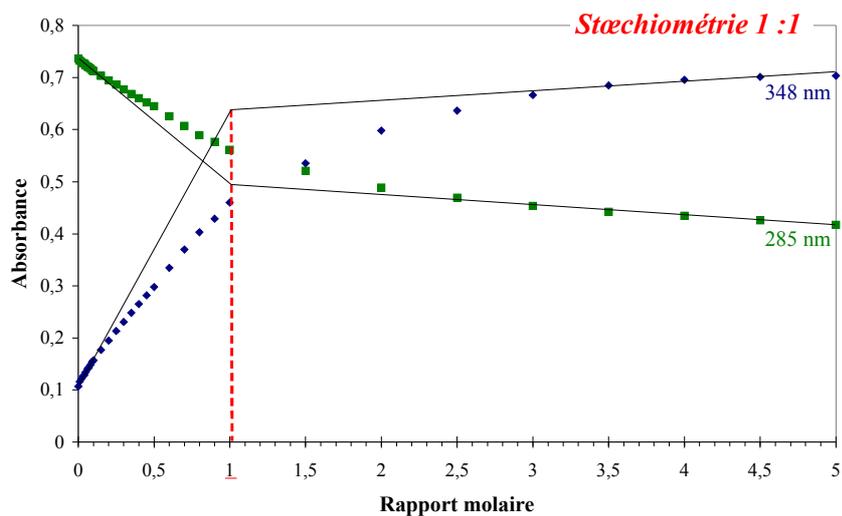
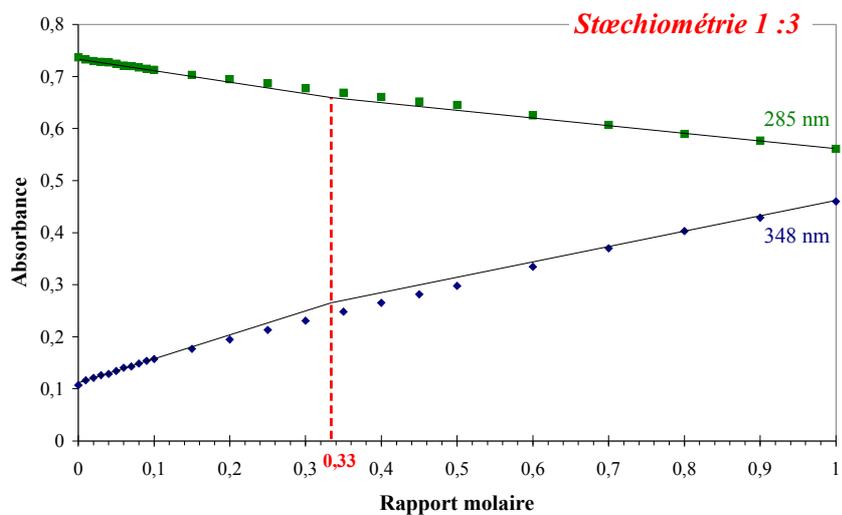


Figure 26 : Méthode des rapports molaires pour la complexation de l'aluminium (III) par l'acide caféique à pH 5 par spectrophotométrie UV-Visible



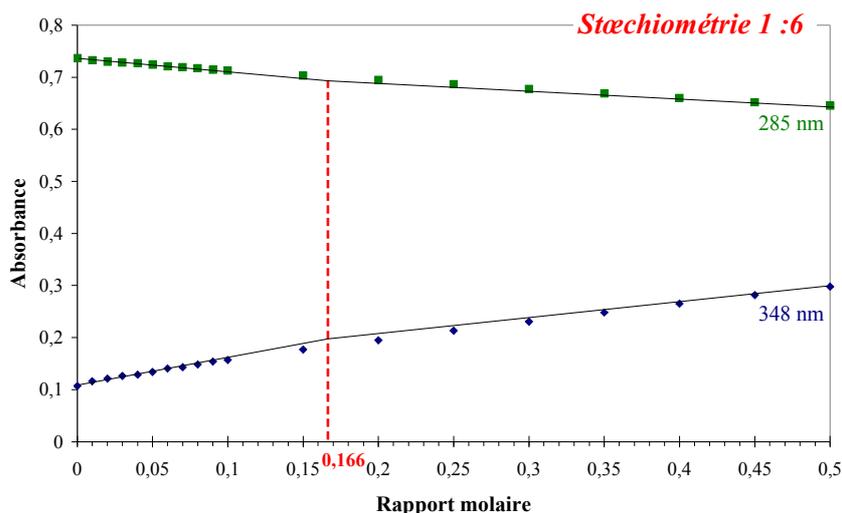


Figure 26 suite : Méthode des rapports molaires pour la complexation de l'aluminium (III) par l'acide caféique à pH 5 par spectrophotométrie UV-Visible.

L'utilisation de la méthode des rapports molaires est un peu plus délicate en spectroscopie de fluorescence. En effet, le bruit sur les spectres de fluorescence est plus important que sur les spectres UV-visible. Les spectres de fluorescence ont donc été lissés (par régression polynomiale de degré 4) avant exploitation.

En spectroscopie de fluorescence, nous avons choisi, comme longueurs d'onde d'exploitation pour la méthode des rapports molaires, les maxima du complexe à $R = 10$ et de l'acide caféique. Pour l'expérience d'émission à $\lambda_{\text{ex}} = 320$ nm (Figure 27), la longueur d'onde maximum du complexe est à 505 nm et celle de l'acide caféique est à 419 nm. Pour celle à $\lambda_{\text{ex}} = 340$ nm (Figure 28), nous n'avons pris que la longueur d'onde du complexe à $\lambda_{\text{em, max}} = 505$ nm. En effet, au maximum de l'acide caféique, l'incertitude est trop importante à cause de la faible intensité du signal à cette longueur d'onde. En fluorescence synchrone (Figure 29), la longueur d'onde maximum du complexe est à 352 nm et celle de l'acide caféique est à 310 nm.

Quelle que soit l'expérience en fluorescence, on obtient des complexes de stœchiométries 1 : 6, 1 : 3, 1 : 2, 1 : 1 et 2 : 1 à pH 5. Malgré le changement de concentration en acide caféique entre les expériences en spectroscopie UV-visible ($5 \cdot 10^{-5}$ M) et celles de fluorescence ($2 \cdot 10^{-5}$ M), on observe les mêmes complexes à pH 5.

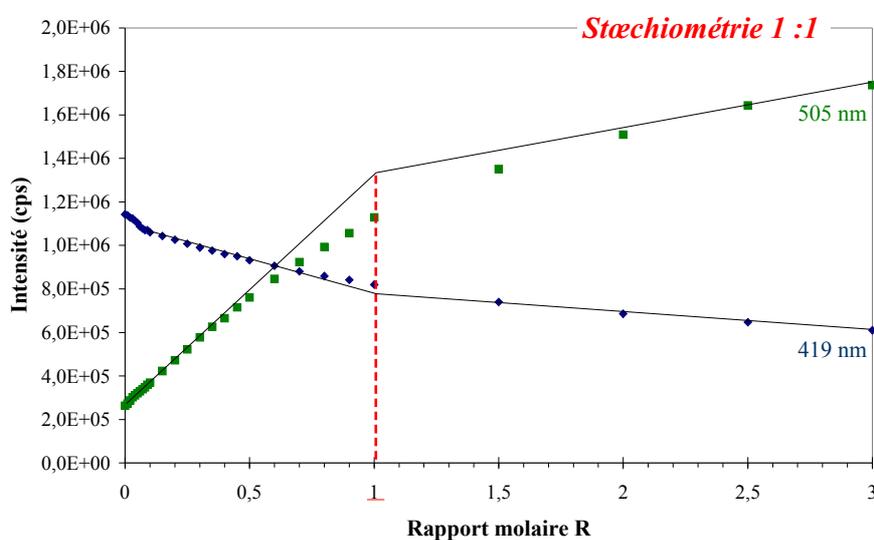
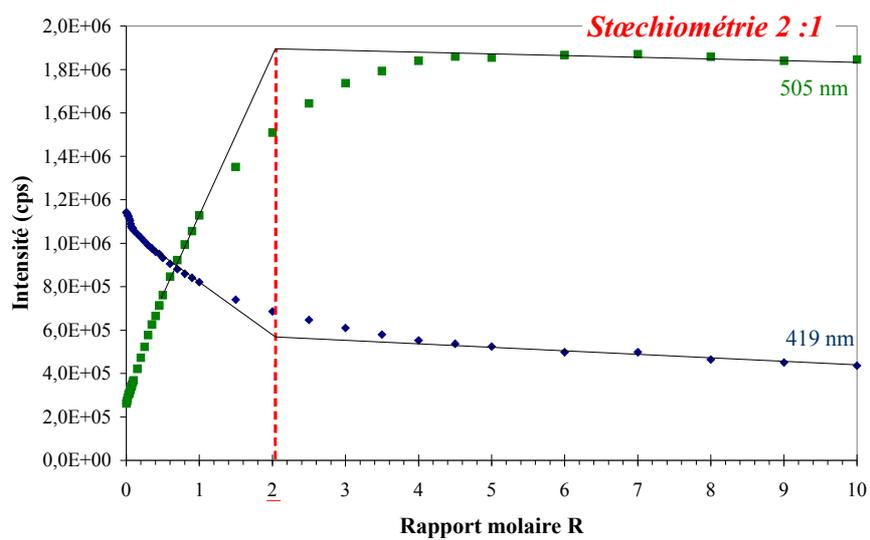
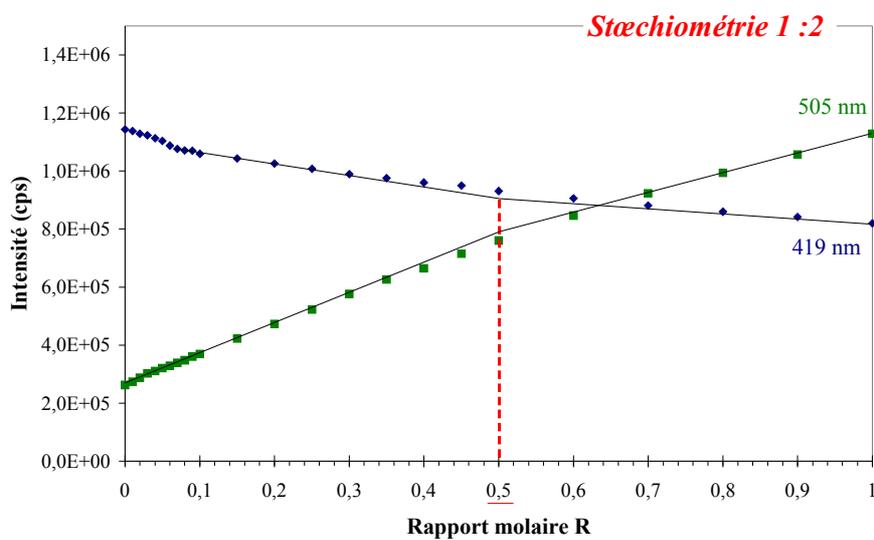


Figure 27 : Méthode des rapports molaires pour la complexation de l'aluminium (III) par l'acide caféique à pH 5 par spectroscopie de fluorescence : émission à $\lambda_{\text{ex}} = 320 \text{ nm}$.



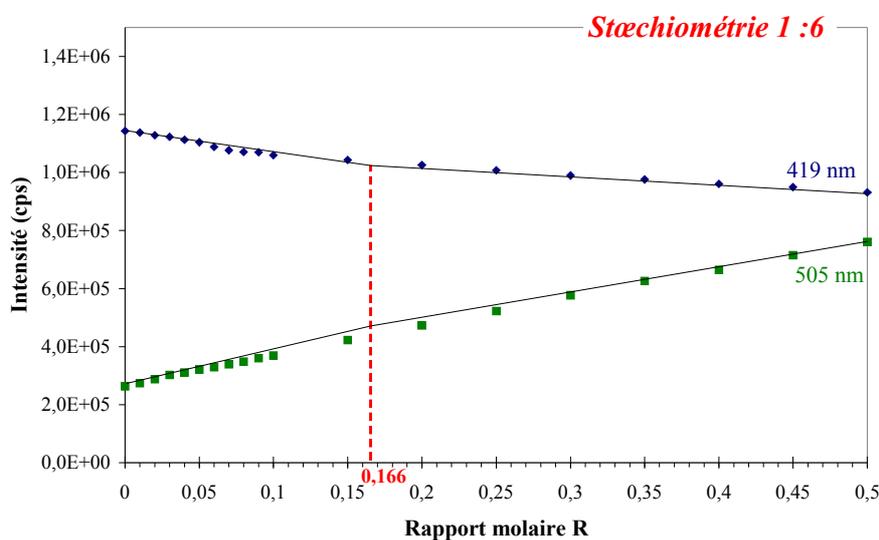
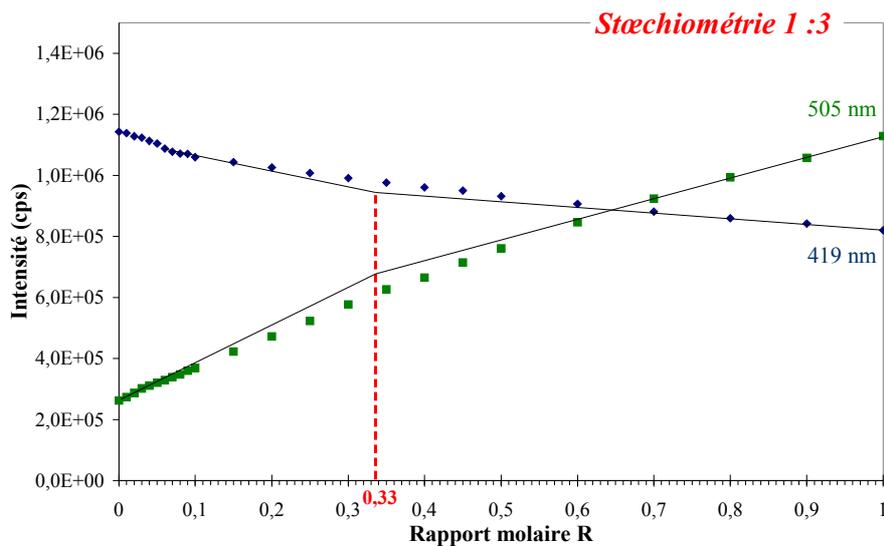
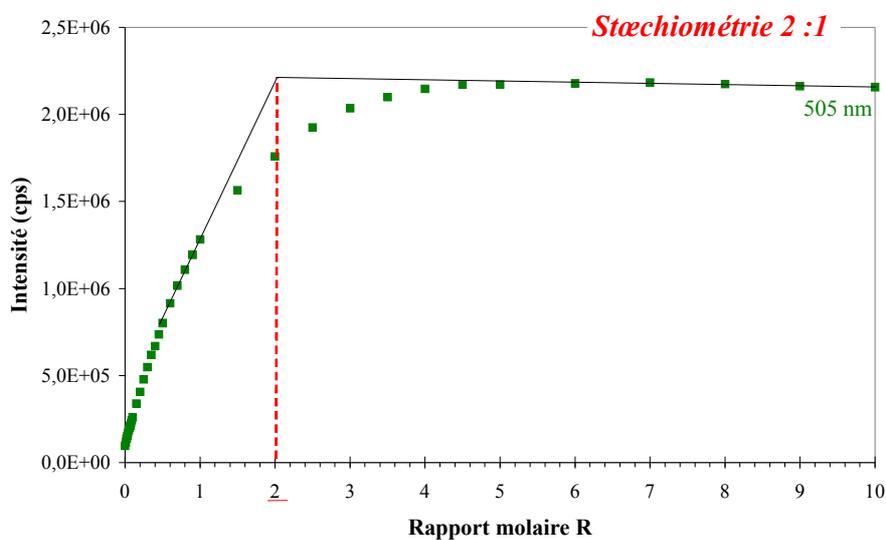


Figure 27 suite : Méthode des rapports molaire pour la complexation de l'aluminium (III) par l'acide caféique à pH 5 par spectroscopie de fluorescence : émission à $\lambda_{ex} = 320$ nm.



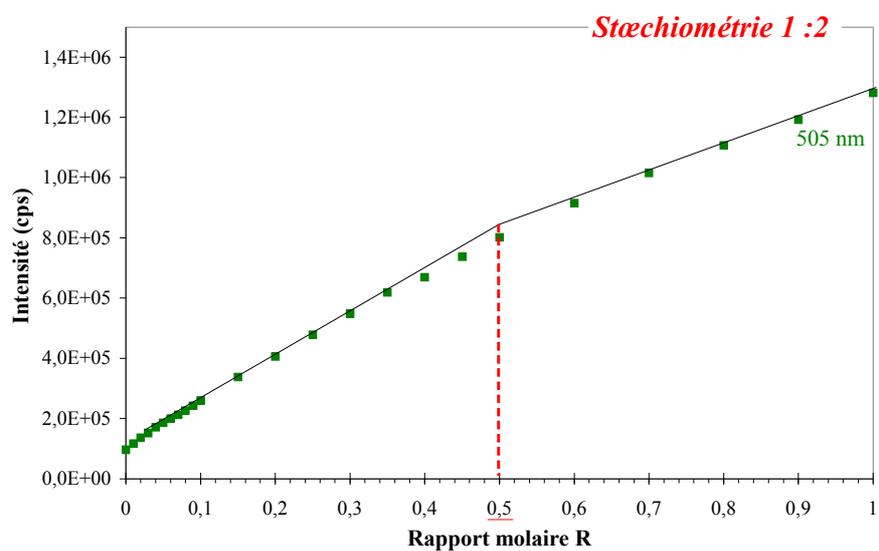
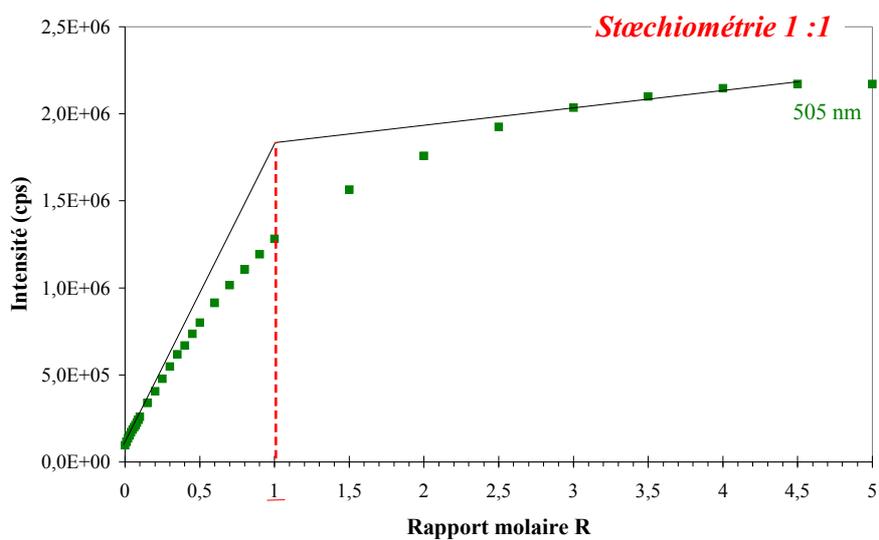
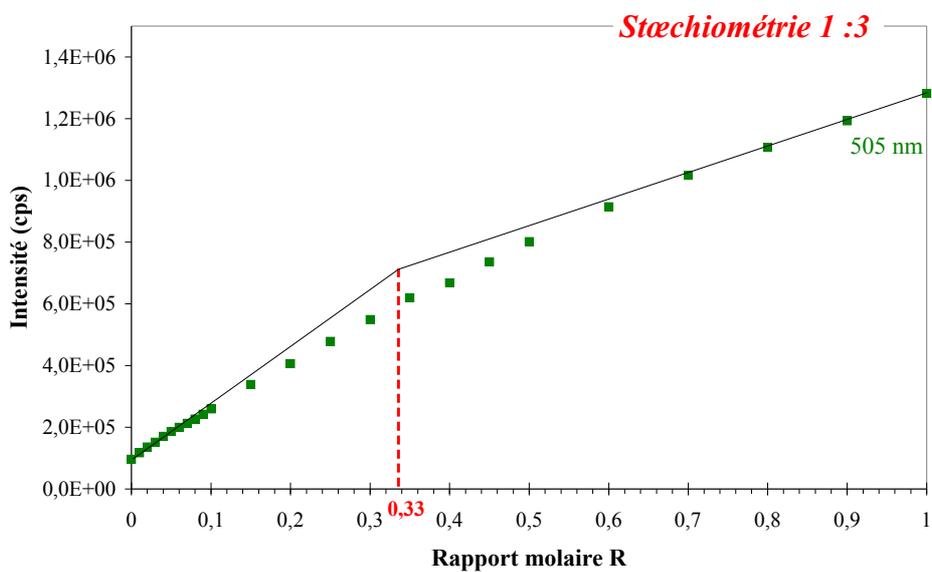


Figure 28 : Méthode des rapports molaires pour la complexation de l'aluminium (III) par l'acide caféique à pH 5 par spectroscopie de fluorescence : émission à $\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$.



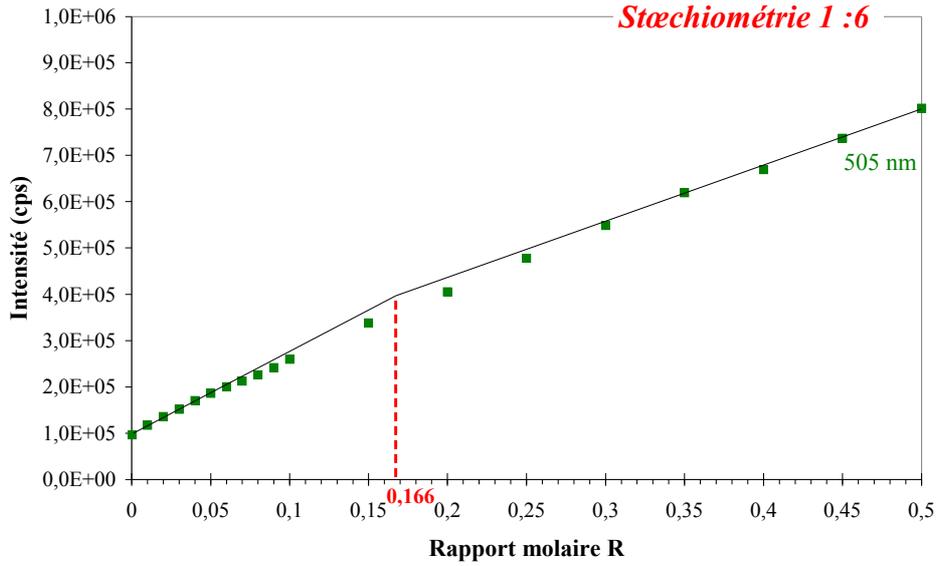
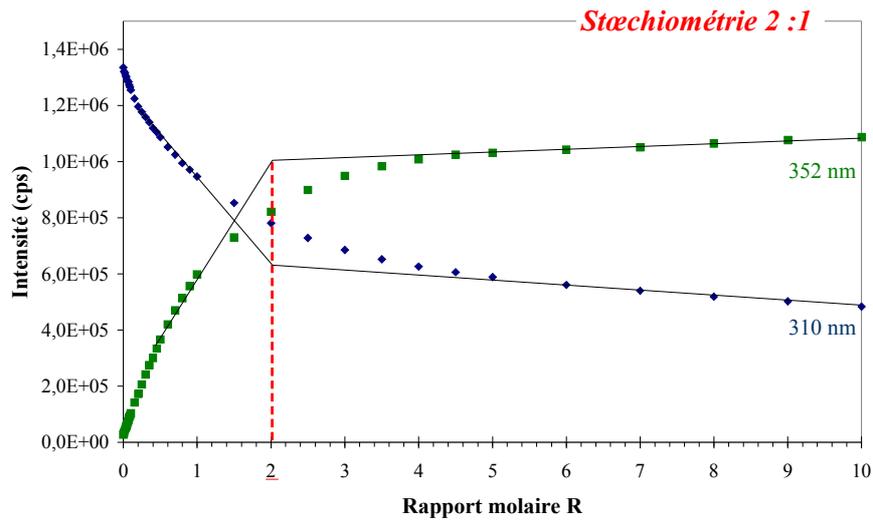


Figure 28 suite : Méthode des rapports molaires pour la complexation de l'aluminium (III) par l'acide caféique à pH 5 par spectroscopie de fluorescence : émission à $\lambda_{ex} = 340 \text{ nm}$.



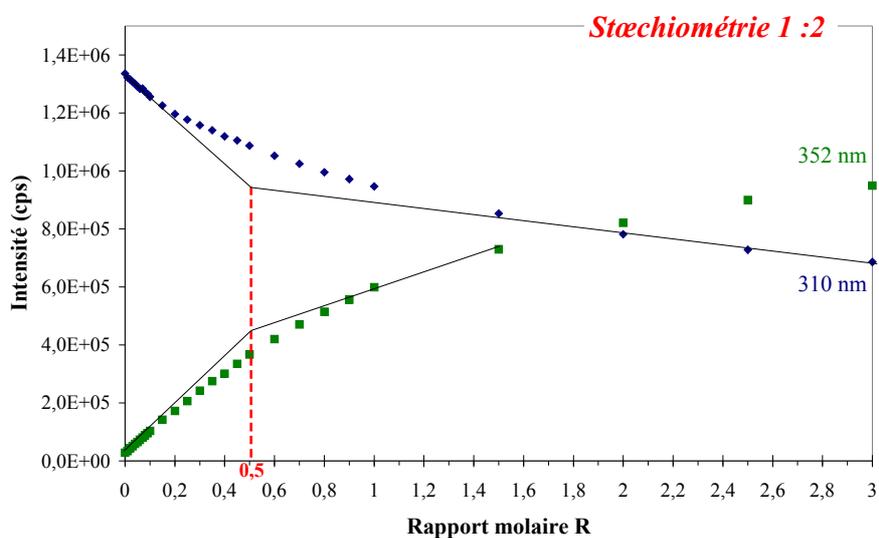
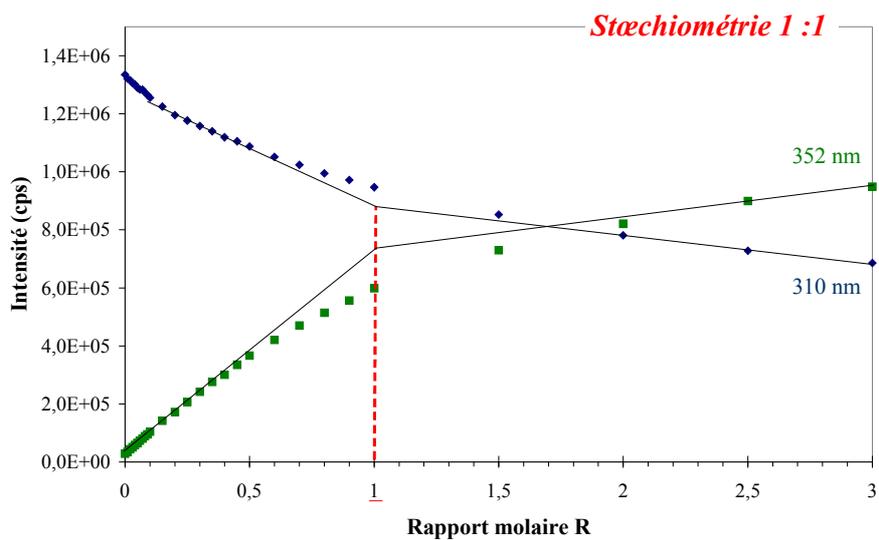
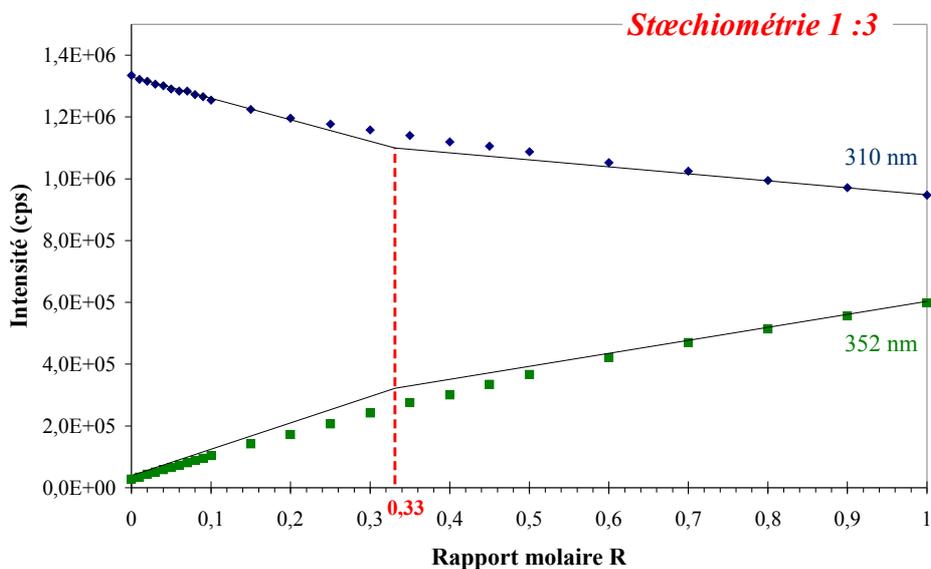


Figure 29 : Méthode des rapports molaires pour la complexation de l'aluminium (III) par l'acide caféique à pH 5 par spectroscopie de fluorescence : synchrone avec un offset de 112 nm.



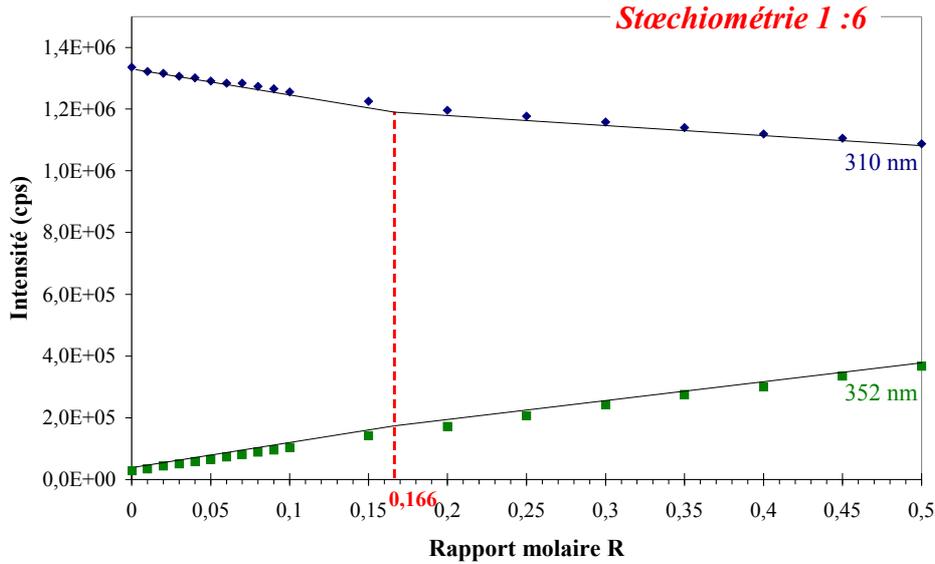


Figure 29 suite : Méthode des rapports molaires pour la complexation de l'aluminium (III) par l'acide caféique à pH 5 par spectroscopie de fluorescence : synchrone avec un offset de 112 nm.

Afin de déterminer les constantes de formation des différentes formes complexées, il est nécessaire d'obtenir les spectres des espèces pures.

Les différentes techniques employées à pH 5 conduisent à l'observation des mêmes espèces, nous utiliseront donc dans tous les cas le même modèle chimique comportant 4 espèces différentes. En effet, seul le modèle constitué de la molécule libre et des espèces complexées prédominantes (1:2, 1:1 et 2:1) conduit à des résultats cohérents. Les spectres des différentes espèces pures obtenus sont représentés sur la Figure 30. En UV-visible, le maximum du complexe 1:2 est à 340 nm, celui de l'espèce 1:1 est à 335 nm et enfin la longueur d'onde maximum du complexe 2:1 est à 347 nm. Pour les deux expériences d'émission, les maxima d'un complexe donné se trouvent aux mêmes longueurs d'onde. Le maximum du complexe 2:1 se trouve à 507 nm, celui de l'espèce 1:1 à 504 nm et enfin le maximum du complexe 1:2 se situe à 510 nm. Il est normal de trouver les mêmes maxima pour les expériences d'émission car le maximum de fluorescence d'une espèce ne dépend pas de la longueur d'onde d'excitation, seule l'intensité du signal change entre les deux expériences. Les spectres synchrones diffèrent des spectres d'émission. Le maximum du complexe 2:1 se situe à 354 nm, celui du complexe 1:1 à 352 nm et enfin le spectre du complexe 1:2 a un maximum à 353 nm. On remarque que dans chaque expérience, les maxima des différents complexes sont très proches les uns des autres.

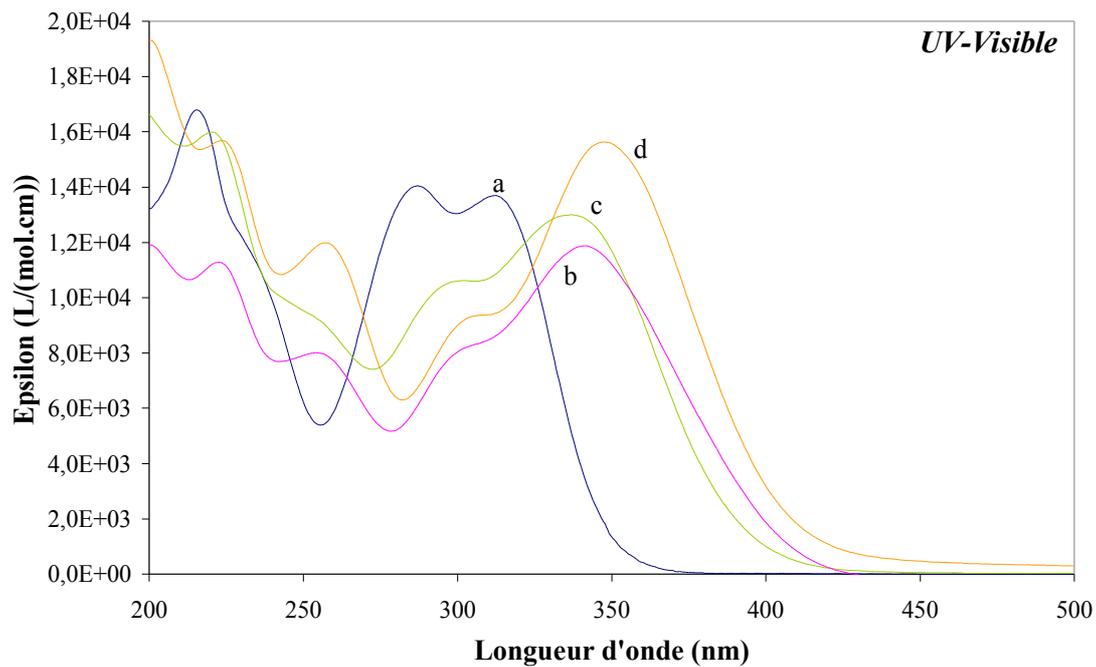
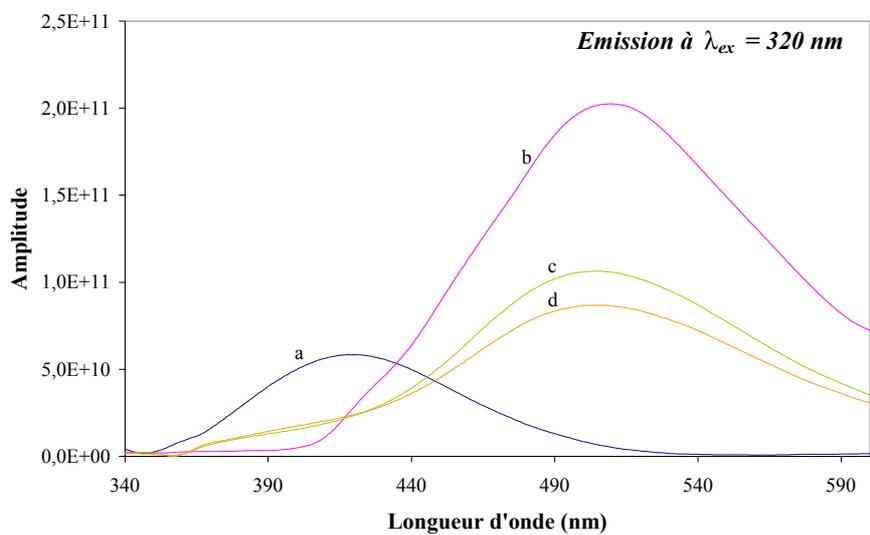


Figure 30 : Spectres des espèces pures obtenues par décomposition à pH 5. a : Acide caféique, b : complexe 1 :2, c : complexe 1 :1, d : complexe 2 :1



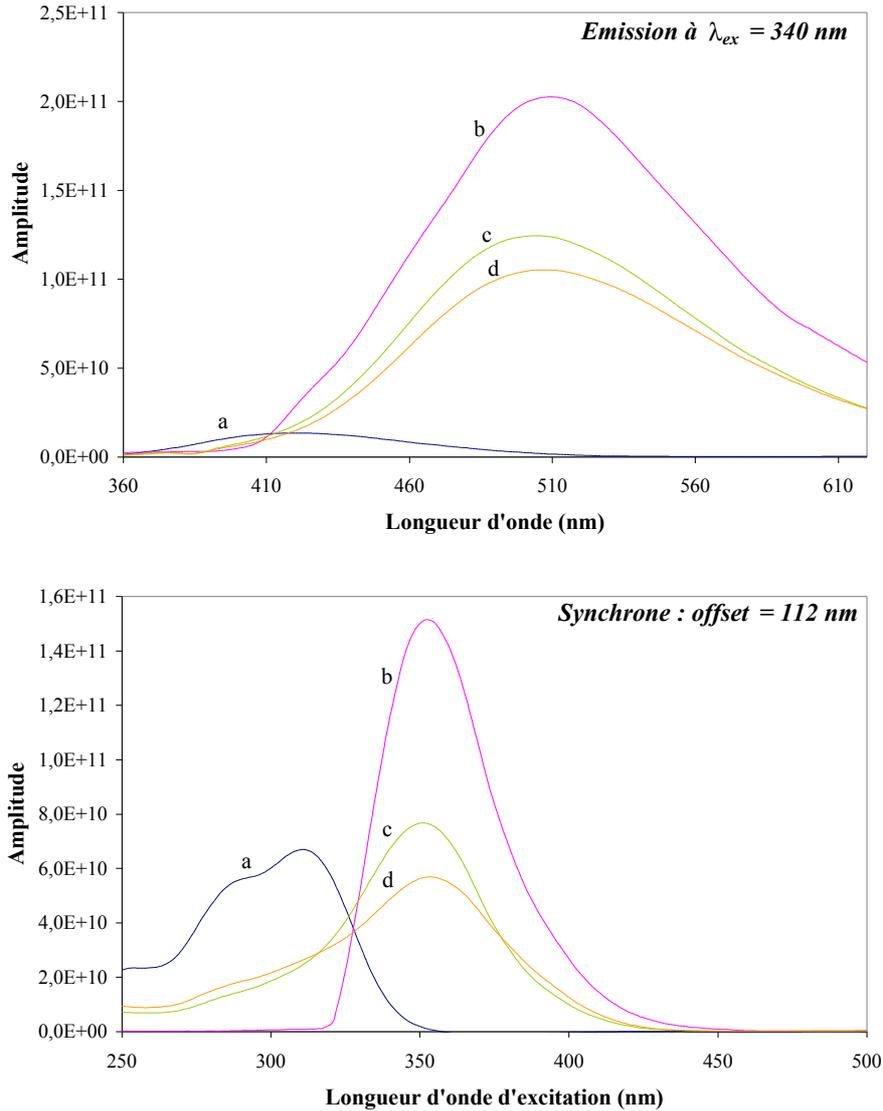


Figure 30 suite : Spectres des espèces pures obtenues par décomposition à pH 5. a : Acide caféique, b : complexe 1 :2, c : complexe 1 :1, d : complexe 2 :1

Après avoir obtenu les différents spectres des espèces pures, nous avons essayé plusieurs modèles. Celui qui donne, après affinement, des résultats corrects est le suivant. Les log des constantes de stabilité β_{ml} des différents complexes pour les expériences à pH 5 sont regroupés dans le Tableau 3,

| | 1 :2 | 1 :1 | 2 :1 |
|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| UV-visible | $8,4 \pm 0,3$ | $5,6 \pm 0,1$ | $9,3 \pm 0,1$ |
| Emission à 320 nm | $9,17 \pm 0,08$ | $4,97 \pm 0,04$ | $8,5 \pm 0,2$ |
| Emission à 340 nm | $8,97 \pm 0,07$ | $5,04 \pm 0,02$ | $8,95 \pm 0,08$ |
| Synchrone | $8,64 \pm 0,07$ | $4,83 \pm 0,02$ | $8,85 \pm 0,07$ |

Tableau 3 : log β_{ml} des différents complexes formés entre l'aluminium (III) et l'acide caféique à pH 5

On remarque que les constantes de stabilité obtenues pour un complexe particulier sont du même ordre de grandeur quelque soit l'expérience utilisée. On pourra donc employer une seule des expériences, la mieux adaptée à l'étude de la complexation de l'acide humique avec l'aluminium.

L'évolution des concentrations des différentes espèces n'est pas comparable quantitativement entre les expériences UV-visible et celles de fluorescence car on ne travaille pas à la même concentration ($[Caf] = 5.10^{-5}M$ en UV-visible et $[Caf] = 2.10^{-5}M$ en fluorescence). Sur les Figures 31 et 32 représentant respectivement l'évolution des concentrations des différentes espèces pour les données UV-visible et celle pour les données de fluorescence synchrone, on remarque que l'allure générale des courbes est semblable. De plus, la concentration de l'espèce 1 :2 est très faible, et par conséquent sa contribution dans les spectres expérimentaux l'est également. Ceci explique les difficultés rencontrées pour déterminer le spectre de ce complexe. Les complexes 1 :3 et 1 :6 sont encore en plus faible concentration que l'espèce 1 :2 et constituent bien des espèces très minoritaires à pH 5.

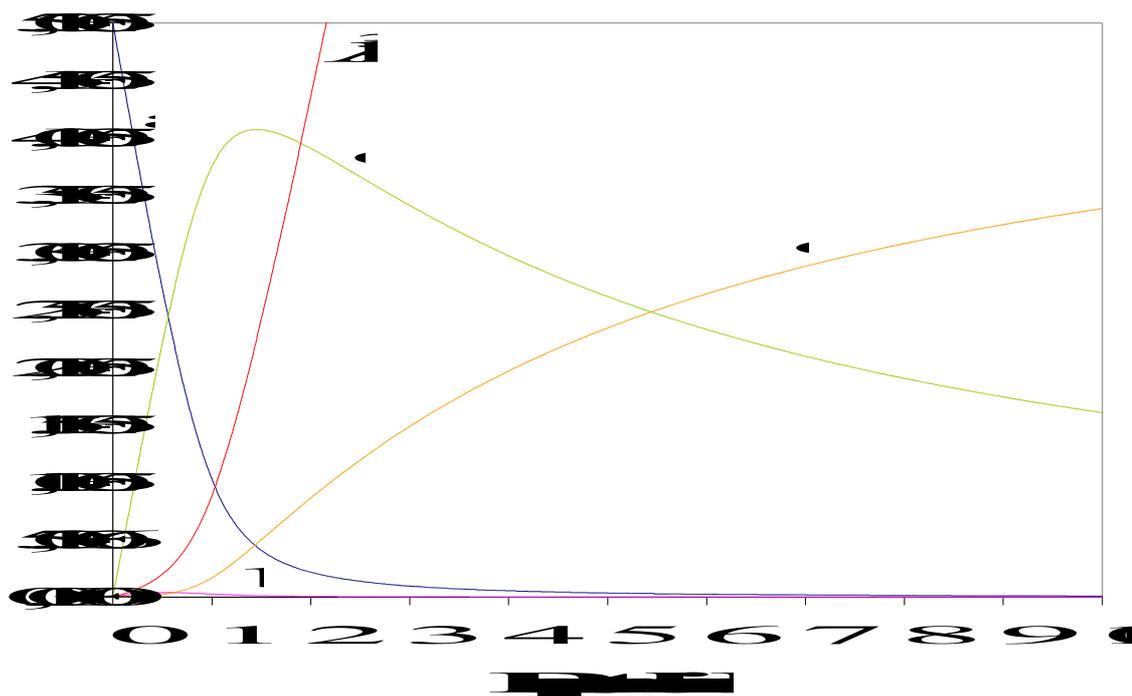


Figure 31 : Evolution des concentrations obtenue à partir des données UV-visible à pH 5. a : Acide caféique, b : complexe 1 :2, c : complexe 1 :1, d : complexe 2 :1

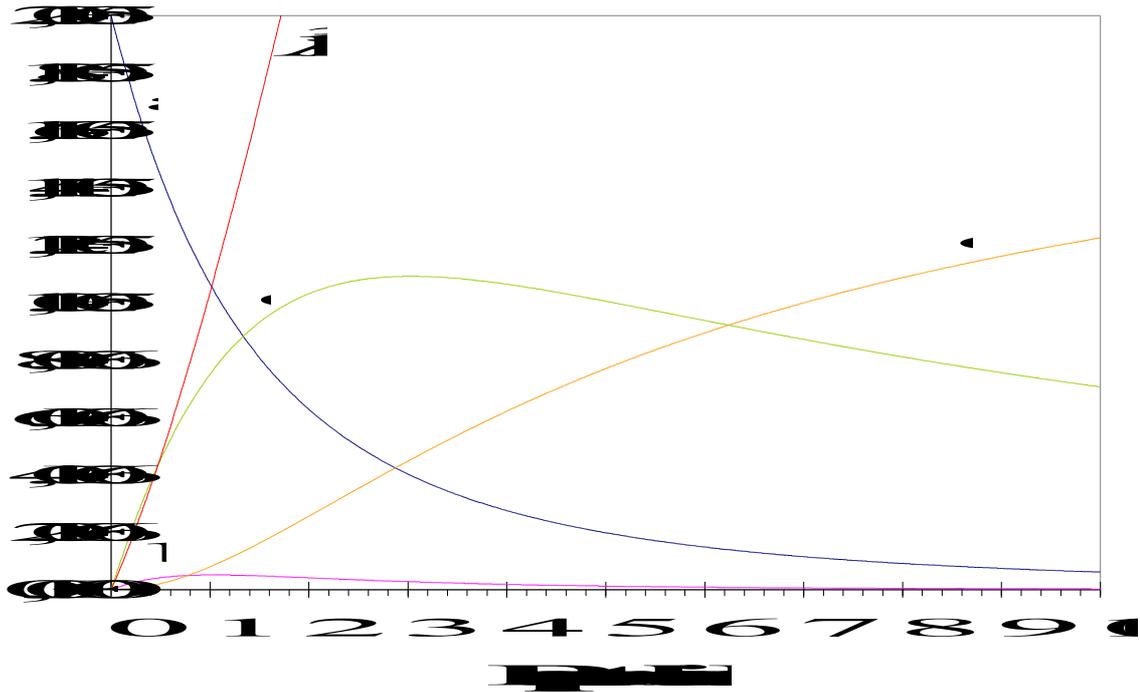


Figure 32 : Evolution des concentrations obtenue à partir des données de fluorescence synchrone à pH 5.
 a : Acide caféique, b : complexe 1 :2, c : complexe 1 :1, d : complexe 2 :1

Si on fait un agrandissement de la zone des faibles rapports molaires (Figure 33), zone qui nous intéresse plus particulièrement car il est improbable de trouver dans la nature des rapports aluminium acide caféique très important, on constate que les complexes 1 :1 et 1 :2 commencent à se former dès le début de la complexation. Le complexe 2 :1 ne commence à apparaître que pour des rapports supérieur à 0,1 en UV-visible et en fluorescence quelle que soit l'expérience.

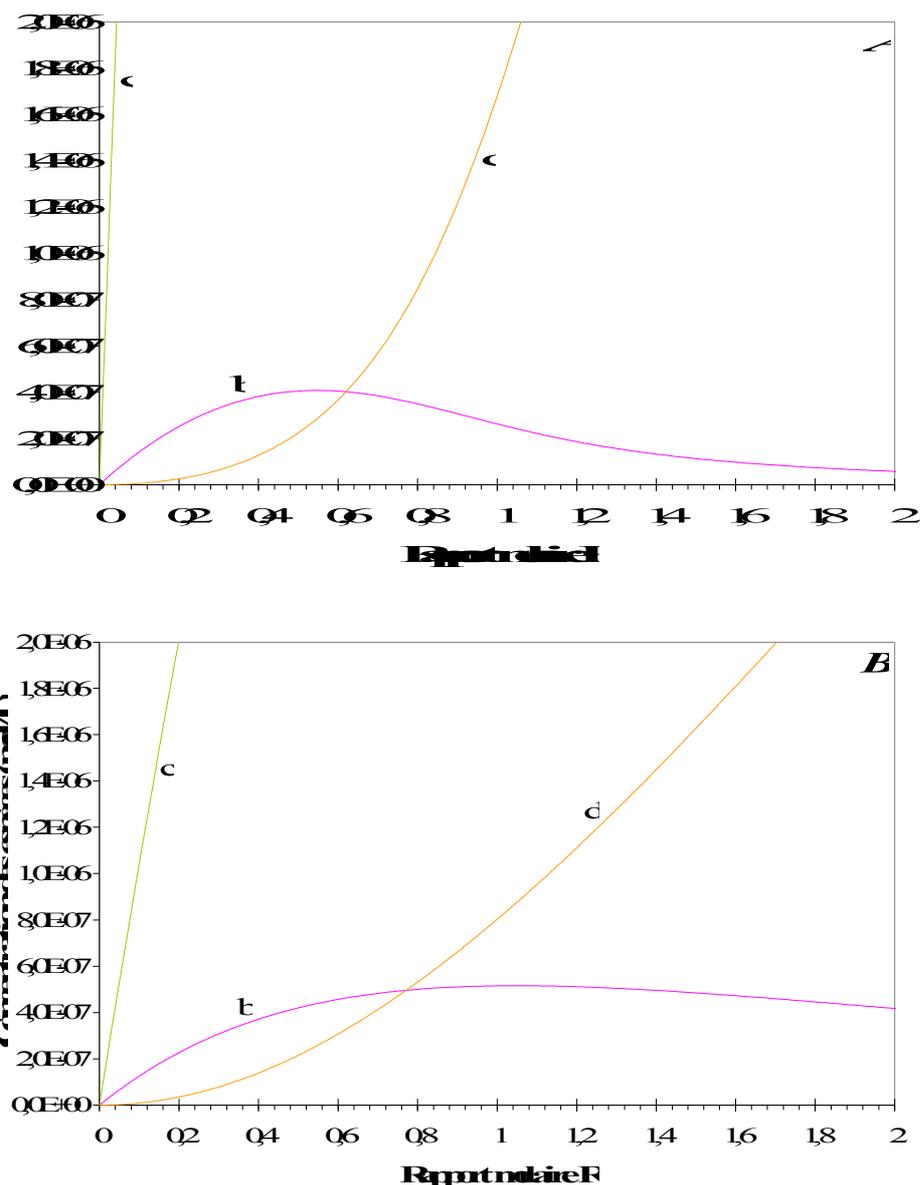


Figure 33 : Zoom de l'évolution des concentrations entre R = 0 et R = 2. A : en UV-visible , B : en synchrone. b : complexe 1 :2, c : complexe 1 :1, d : complexe 2 :1

Ce fait indique que le second site de complexation est impliqué dans la coordination d'Al (III) très rapidement, alors que moins de 10% des premiers sites sont occupés. Cela signifie également que le pouvoir complexant de la fonction carboxylique, bien que plus faible, est relativement proche de celui de la fonction catéchol.

Pour valider les résultats obtenus à la fois dans la décomposition spectrale et dans la détermination des constantes de formation, nous avons simulé la complexation à partir des constantes de stabilité obtenues ainsi qu'à partir des spectres des espèces pures (Figure 34). On constate que le faisceau de spectres obtenu lors de la simulation est assez semblable aux résultats expérimentaux et confirme que le modèle retenu constitue une bonne approche du mécanisme de

complexation. On constate également que le fait de ne pas considérer les espèces 1 :6 et 1 :3 (déterminées par la méthode des rapports molaires) dans le modèle ne constitue pas un handicap dans la reconstitution des données expérimentales, ce qui prouve une contribution négligeable de ces espèces.

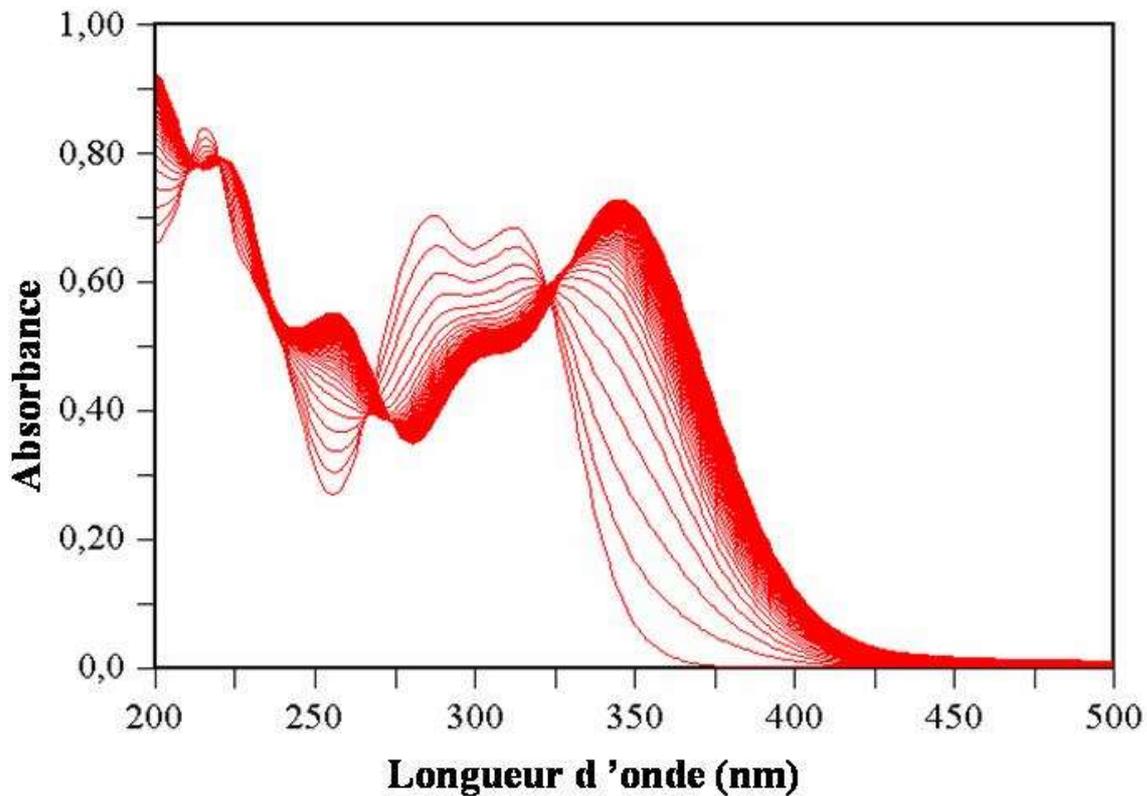


Figure 34 : Simulation de la complexation de l'aluminium (III) par l'acide caféique en spectrophotométrie UV-visible avec une concentration en acide caféique de $5 \cdot 10^{-5} \text{M}$ et une concentration en aluminium de 0 à $5 \cdot 10^{-4} \text{M}$ avec des incréments constants.

3. Etude de la complexation à pH 6,5

a) Résultats

Nous avons enregistré les spectres obtenus par spectrophotométrie UV-visible lors de la complexation de l'aluminium par l'acide caféique pour différents rapports $R = [\text{Al}]/[\text{Caf}]$ à pH 6,5 (Figure 35).

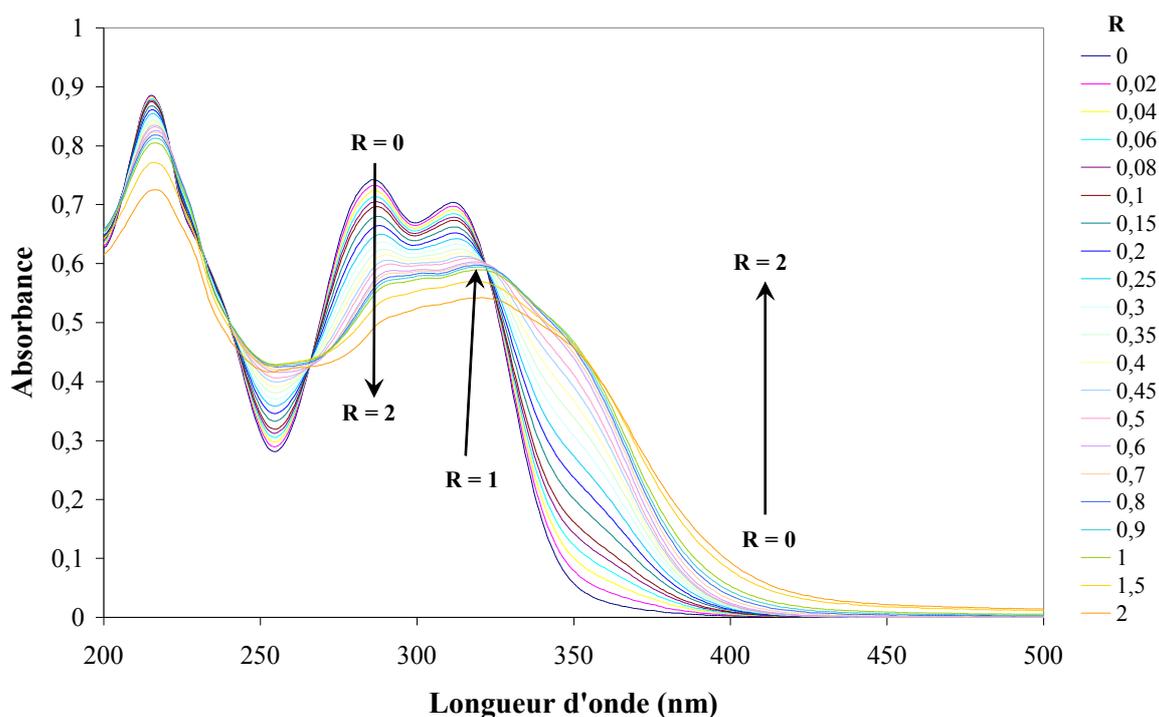


Figure 35 : Etude de la complexation de l'aluminium (III) par l'acide caféique à pH 6,5. R = 0 à 2.

Une précipitation de l'hydroxyde d'aluminium $\text{Al}(\text{OH})_3$ intervient pour une concentration plus faible en aluminium à pH 6,5 qu'à pH 5. Cette précipitation, même infime, augmente la diffusion du faisceau lumineux et donne un bruit de fond important lors de l'enregistrement des spectres et donc des résultats erronés. Pour cette raison, il est préférable de limiter le rapport R à pH 6,5 à une valeur de 2.

Pour un rapport compris entre 0 et 1, les faisceaux de spectres électroniques montrent une allure différente suivant le pH. On peut émettre deux hypothèses :

- Les espèces complexées sont différentes à pH 6,5 et pH 5.
- Il s'agit des mêmes espèces qui présentent des concentrations très différentes suivant le pH.

On observe, à pH 6,5, un point isosbestique à 322 nm comme à pH 5. Cette constatation corrobore la deuxième hypothèse, c'est-à-dire la présence des mêmes espèces mais en quantités différentes. Cette hypothèse doit être confirmée par la détermination des stœchiométries des complexes formés et le calcul des différentes constantes de stabilité. L'observation d'un seul point isosbestique à pH 6,5 montre la co-existence de deux espèces majoritaires en équilibre : l'acide caféique et un complexe. Cependant, il se peut qu'il existe d'autres complexes de faibles

concentrations que l'on n'observe pas, comme à pH 5.

Nous avons également suivi la complexation de l'aluminium (III) par l'acide caféique à pH 6,5 par fluorescence d'émission à 320 nm (Figure 36 A) et à $\lambda_{\text{ex}} = 340$ nm (Figure 36 B) et par fluorescence synchrone avec un offset de 112 nm (Figure 36 C) et de 50 nm (Figure 36 D). Les deux expériences de fluorescence synchrone à différents offset, nous ont permis de vérifier que les stœchiométries et les constantes de formation des complexes formés ne dépendent pas de l'offset choisi pour l'expérience. De plus, nous allons nous servir des données avec un offset de 50 nm par la suite (voir Partie III).

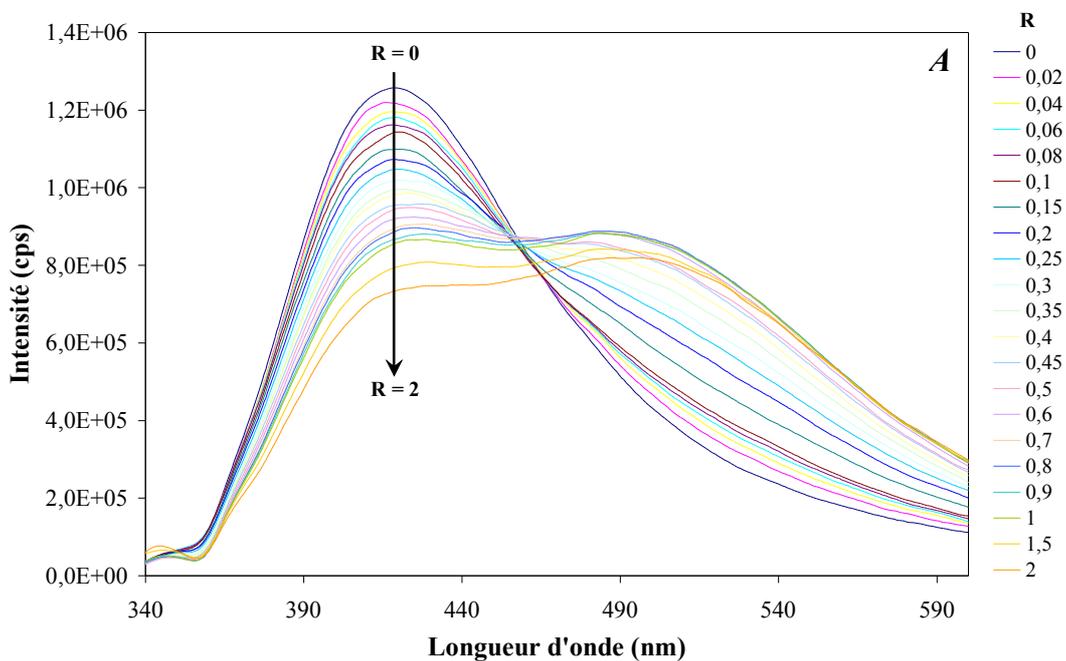


Figure 36 : Etude de la complexation de l'aluminium (III) par l'acide caféique à pH 6,5. A : spectres d'émission à $\lambda_{\text{ex}} = 320$ nm ; B : spectres d'émission à $\lambda_{\text{ex}} = 340$ nm ; C : spectres synchrones à un offset de 112 nm ; D : spectres synchrones à un offset de 50 nm.

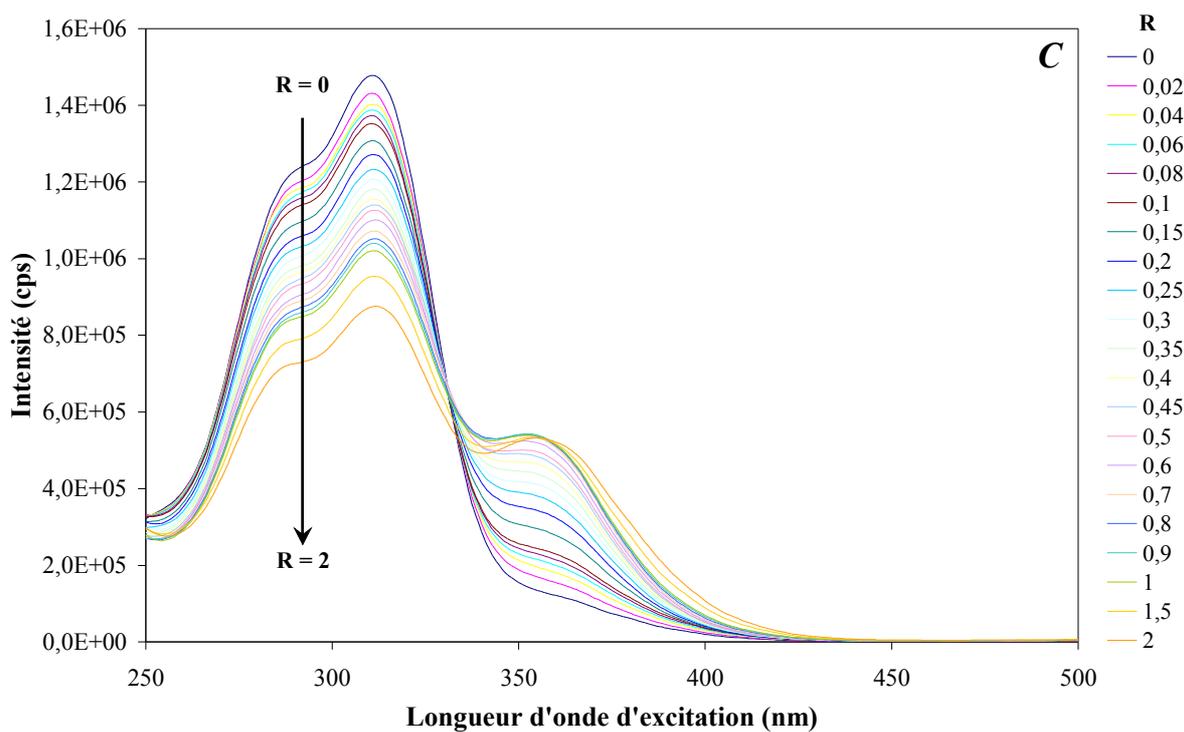
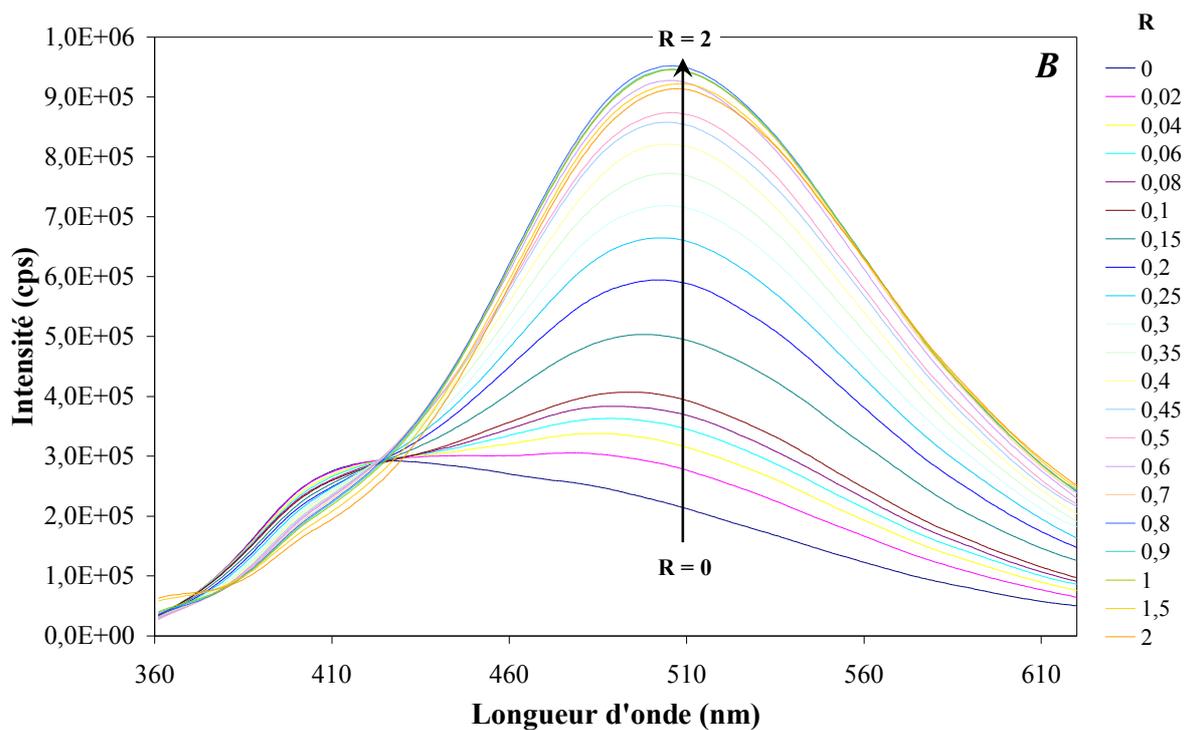


Figure 36 suite : Etude de la complexation de l'aluminium (III) par l'acide caféique à pH 6,5. A : spectres d'émission à $\lambda_{ex} = 320$ nm ; B : spectres d'émission à $\lambda_{ex} = 340$ nm ; C : spectres synchrones à un offset de 112 nm ; D : spectres synchrones à un offset de 50 nm.

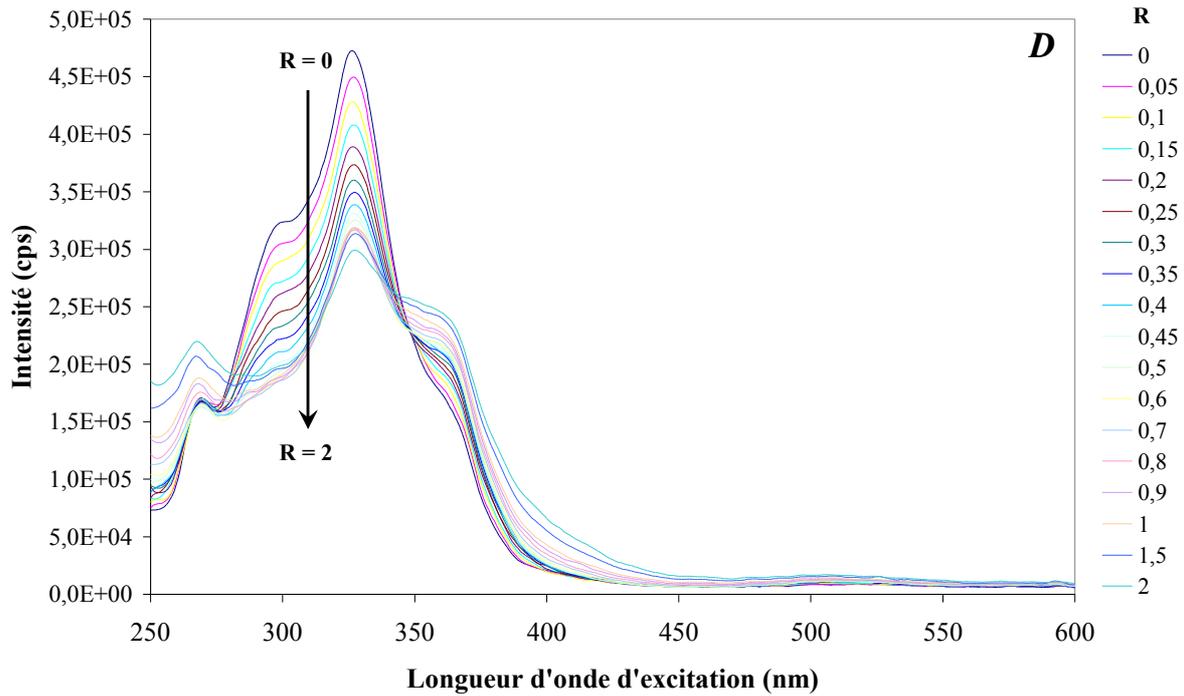


Figure 36 suite : Etude de la complexation de l'aluminium (III) par l'acide caféique à pH 6,5. A : spectres d'émission à $\lambda_{\text{ex}} = 320$ nm ; B : spectres d'émission à $\lambda_{\text{ex}} = 340$ nm ; C : spectres synchrones à un offset de 112 nm ; D : spectres synchrones à un offset de 50 nm.

Le point isoémissif se trouve à 456 nm pour les spectres à $\lambda_{\text{ex}} = 320$ nm, à 425 pour ceux à $\lambda_{\text{ex}} = 340$ nm et à 330 nm en excitation et à 442 nm en émission pour les spectres synchrones avec un offset de 112 nm. Pour les spectres synchrones enregistrés avec un offset de 50 nm, le point isoémissif est plus diffus, il se superpose à la bande Raman de l'eau située à 360 nm.

On remarque, en général, que les points isoémissifs sont à des longueurs d'onde plus faibles à pH 5. Comme la position des points isoémissifs dépend fortement des espèces fluorescentes et de leur quantité, il est donc normal de ne pas trouver exactement les mêmes aux deux pH et dans les différentes expériences.

b) Exploitations des résultats

Pour la méthode des rapports molaires (Figure 37), l'exploitation des résultats s'effectue aux mêmes longueurs d'onde qu'à pH 5 (à 285 et 348 nm). Nous obtenons à pH 6,5, des complexes de stœchiométrie 1 :6, 1 :3 et 1 :2.

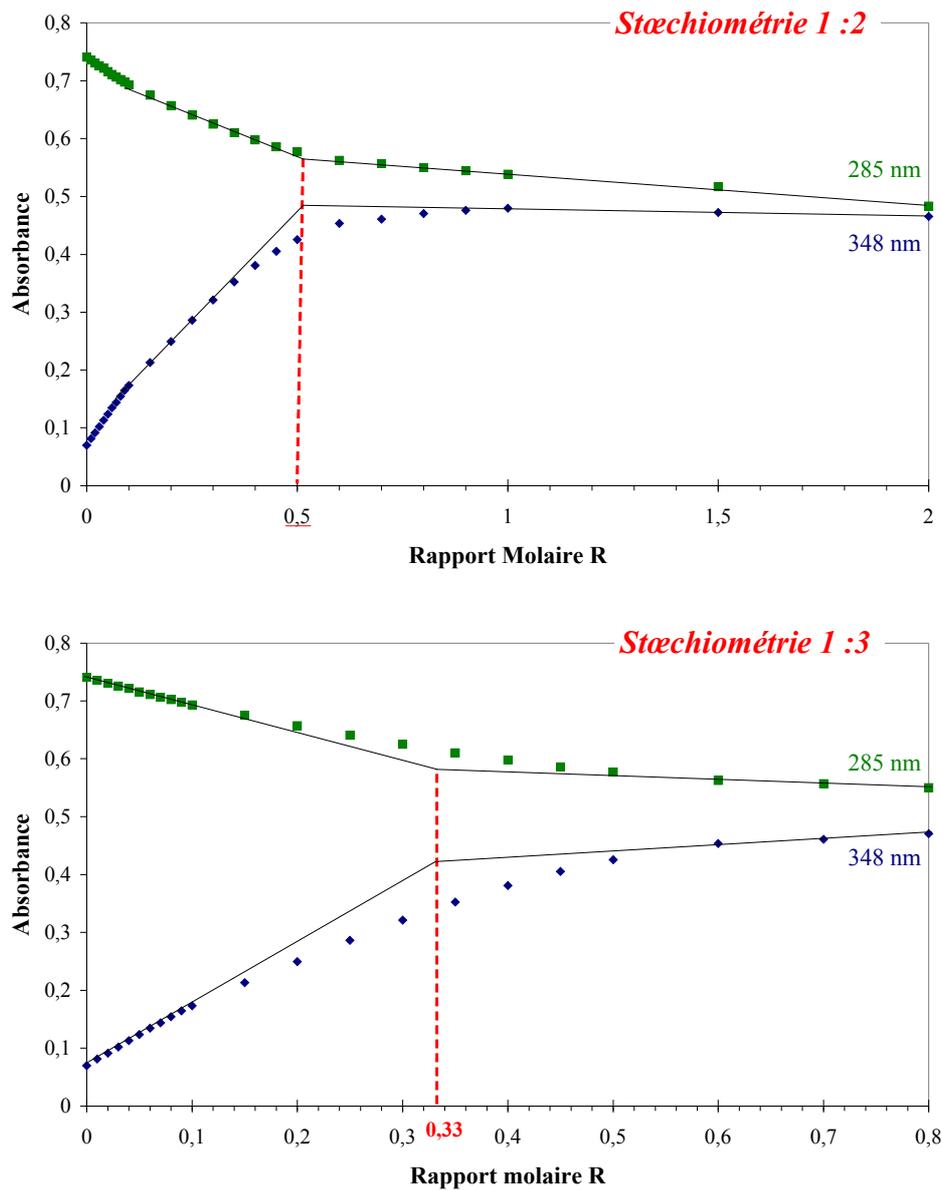


Figure 37 : Méthode des rapports molaires pour la complexation de l'aluminium (III) par l'acide caféique à pH 6,5 par spectrophotométrie UV-Visible.

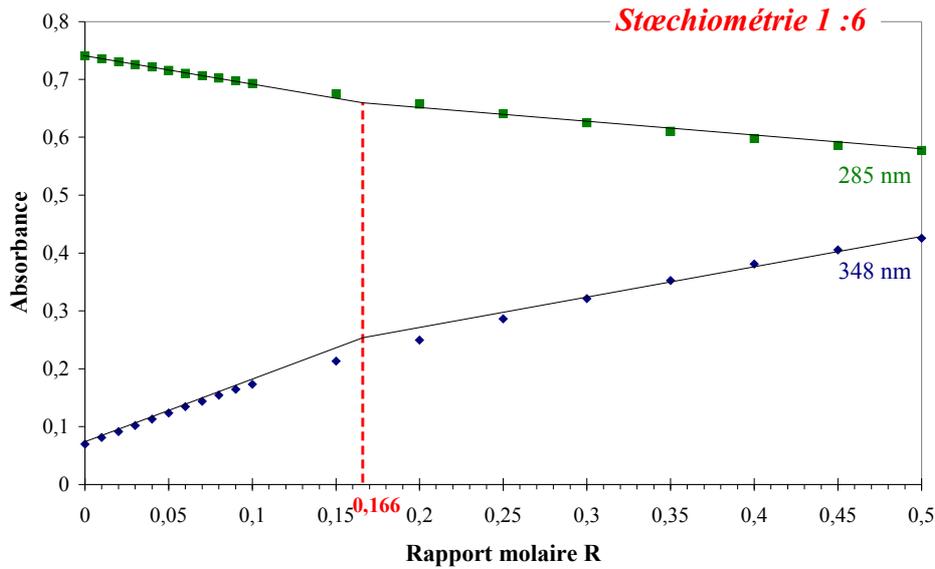


Figure 37 suite : Méthode des rapports molaires pour la complexation de l'aluminium (III) par l'acide caféique à pH 6,5 par spectrophotométrie UV-Visible.

Ces trois espèces ont été détectées à pH 5. Cependant, le fait de limiter la quantité d'aluminium ajoutée ne permet pas d'observer la formation des complexes 1 :1 et 2 :1. La différence entre les faisceaux de spectres n'est pas due aux espèces présentes dans le mélange vu qu'on trouve les mêmes stœchiométries mais sûrement aux quantités différentes de ces espèces.

Avec les données obtenues par fluorimétrie, on trouve les mêmes stœchiométries qu'en UV-visible à l'aide de la méthode des rapports molaires, c'est-à-dire des complexes de stœchiométries 1 :6, 1 :3 et 1 :2. L'exploitation des résultats s'est effectuée à 419 et 505 nm pour les spectres d'émission à $\lambda_{\text{ex}} = 320$ nm (Figure 38), à 505 nm pour l'expérience d'émission à $\lambda_{\text{ex}} = 340$ nm (Figure 39), pour la fluorescence synchrone à 112 nm, l'étude s'est faite à 310 et 352 nm (Figure 40) et enfin pour les spectres synchrones à 50 nm, l'exploitation par la méthode des rapports molaires s'est effectuée à 327 nm au maximum de l'acide caféique et à 360 nm au niveau du complexe (Figure 41). Cette dernière longueur d'onde, nous permet de voir si la présence de la bande Raman de l'eau n'affecte pas l'exploitation des résultats.

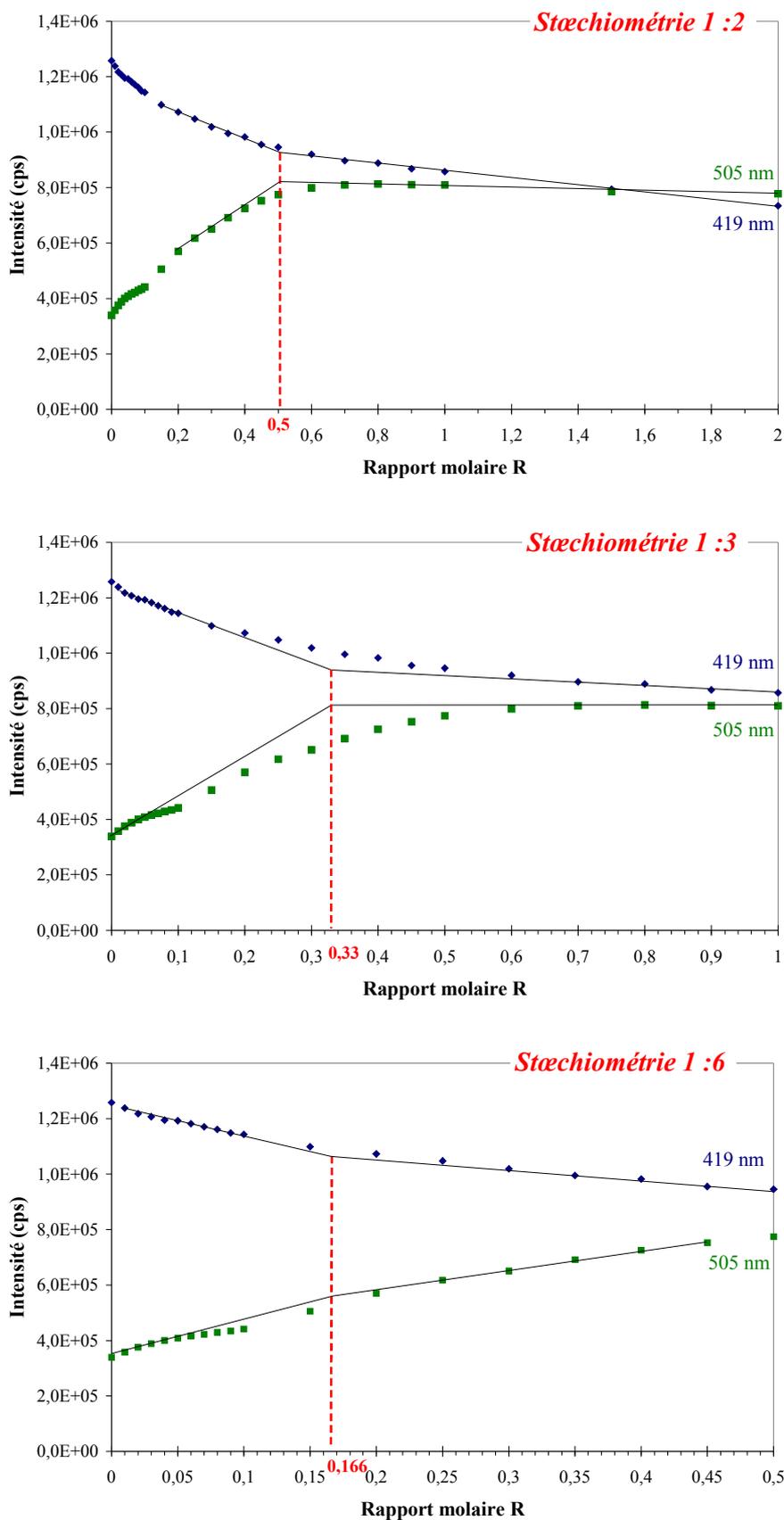


Figure 38 : Méthode des rapports molaires pour la complexation de l'aluminium (III) par l'acide caféique à pH 6,5 par spectroscopie de fluorescence : émission à $\lambda_{\text{ex}} = 320 \text{ nm}$.

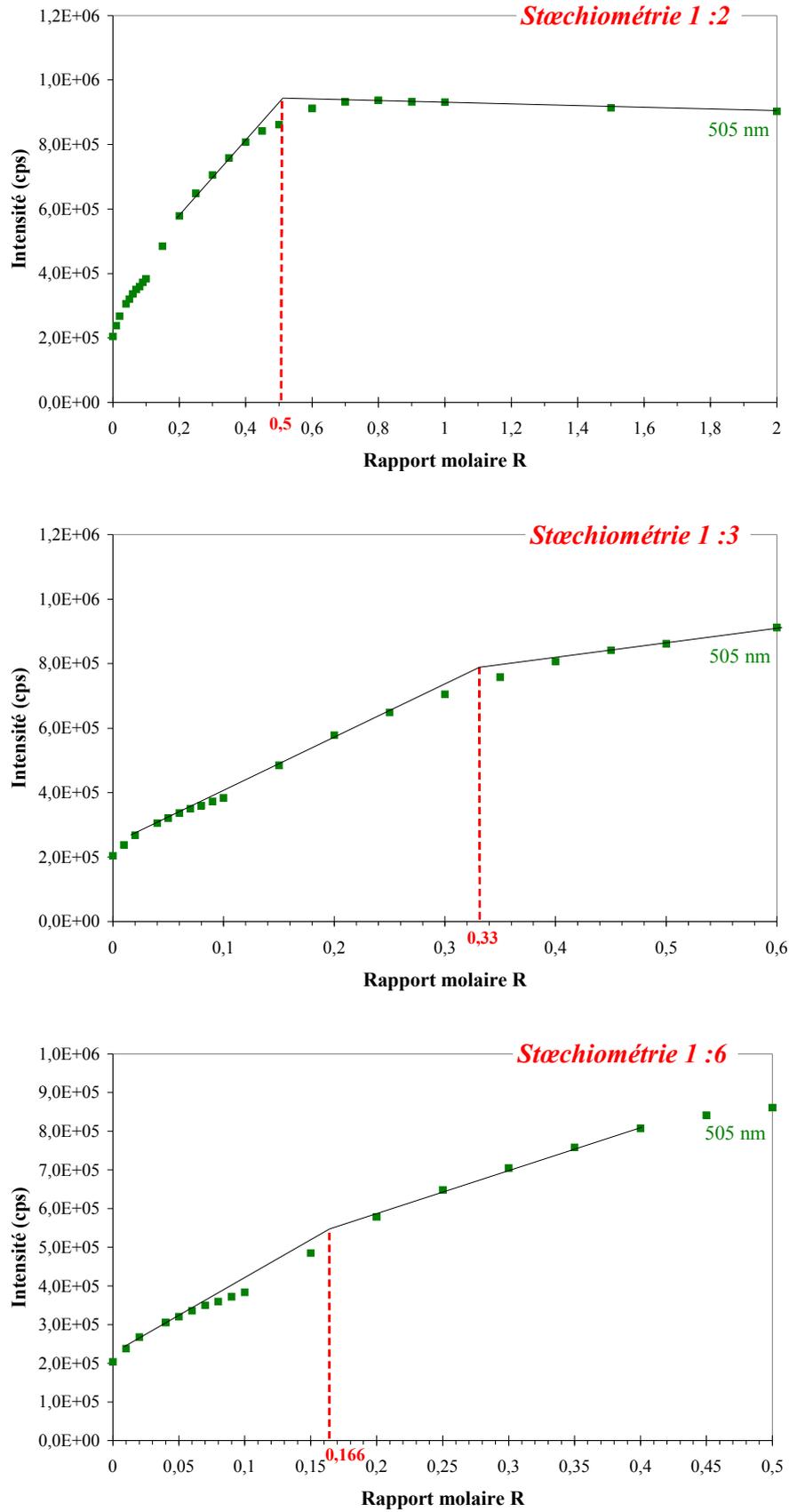


Figure 39 : Méthode des rapports molaires pour la complexation de l'aluminium (III) par l'acide caféique à pH 6,5 par spectroscopie de fluorescence : émission à $\lambda_{ex} = 340$ nm.

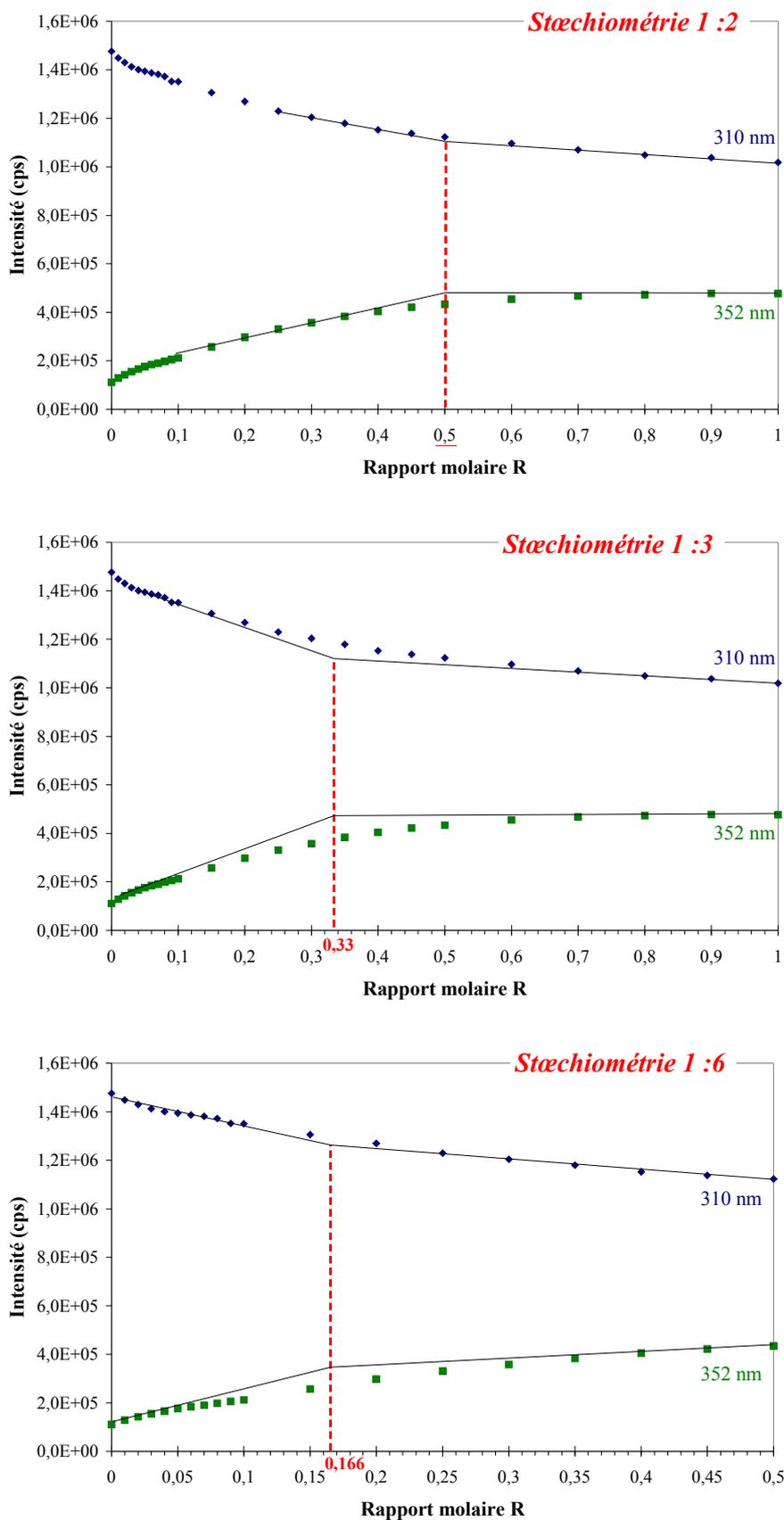


Figure 40 : Méthode des rapports molaires pour la complexation de l'aluminium (III) par l'acide caféique à pH 6,5 par spectroscopie de fluorescence : synchrone avec un offset de 112 nm.

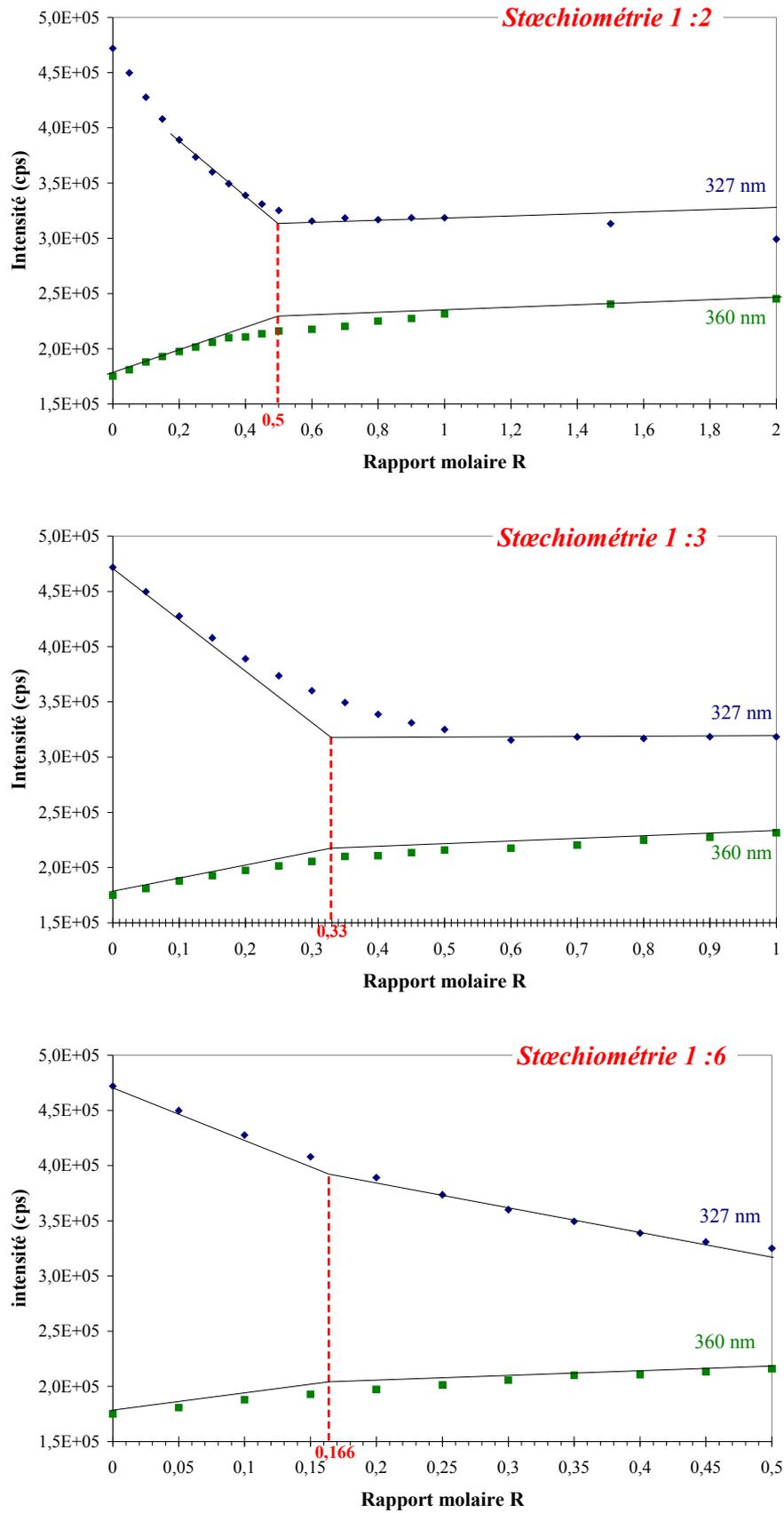


Figure 41 : Méthode des rapports molaires pour la complexation de l'aluminium (III) par l'acide caféique à pH 6,5 par spectroscopie de fluorescence : synchrone avec un offset de 112 nm.

Lors de la complexation à pH 6,5, à cause de la limitation de la quantité d'aluminium ajoutée, le dernier spectre ne correspond pas au spectre final mais à un mélange de différents complexes. Ce fait ne permet pas d'obtenir les spectres des espèces pures par décomposition spectrale. Il nous faut donc déterminer si les complexes trouvés à pH 5 sont les mêmes qu'à pH 6,5.

Une étude en fluorescence avec polariseurs (Figure 42) a montré qu'à pH 5 l'aluminium se complexe avec le caféate et non avec l'acide caféique. En effet, lorsqu'on soustrait à un spectre de complexe obtenu avec une polarisation VV, le spectre correspondant avec la polarisation HV, on retrouve le spectre caractéristique de l'acide caféique protoné. En polarisation HV, nous avons l'extinction de l'émission de fluorescence de l'acide caféique protoné. C'est comme cela qu'on retrouve le spectre caractéristique de l'acide caféique lorsqu'on soustrait le spectre de polarisation HV au spectre VV. Ce résultat était prévisible car le monoanion attire plus facilement le cation Al^{3+} que la molécule protonée. Le fait qu'à pH 5 l'aluminium se fixe sur la molécule monodéprotonée et qu'à pH 6,5, l'acide caféique n'existe que sous cette forme, on peut en déduire que les complexes formés sont les mêmes et donc possèdent la même signature spectroscopique. Cette observation nous permet d'utiliser les mêmes spectres pour les espèces pures à pH 5 et à pH 6,5 pour un complexe.

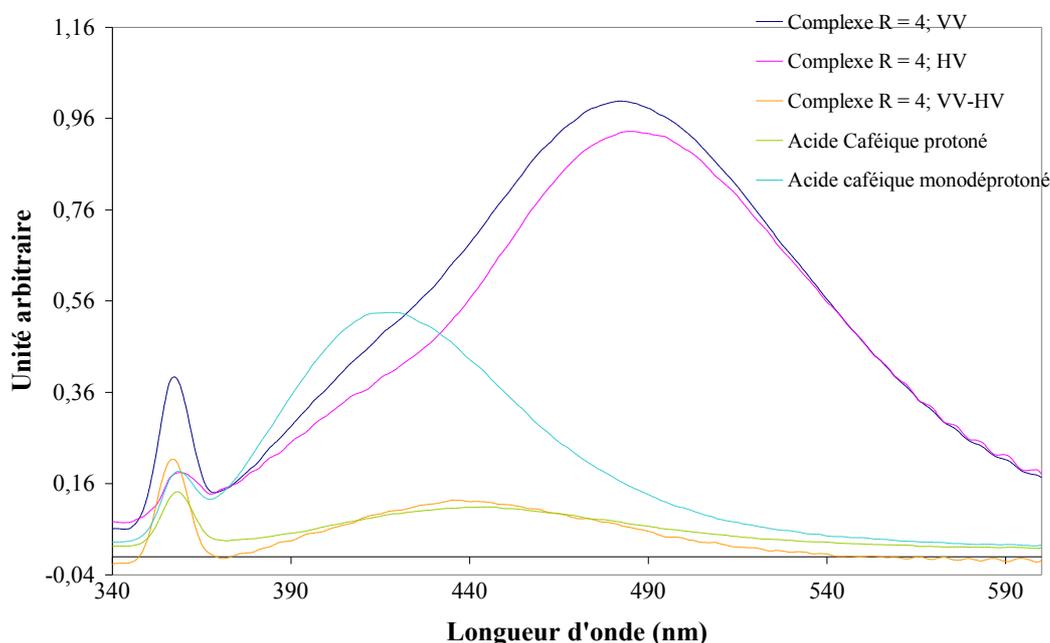


Figure 42 : Etude de la complexation de l'aluminium (III) par l'acide caféique par fluorescence d'émission avec $\lambda_{ex} = 320$ nm avec polariseurs à pH 5.

Pour les expériences en spectroscopie UV-visible et de fluorescence à pH 6,5, un autre modèle a permis d'affiner les données expérimentales. Dans celui-ci, nous avons introduit les complexes 1 :3 et 1 :2. D'après la constatation faite ci-dessus, nous pouvons employer pour le

complexe 1 :2 le même spectre qu'à pH 5. Nous avons pu trouver le spectre pur du complexe 1 :3 grâce à l'utilisation des spectres obtenus à pH 5 pour les différentes expériences (Figure 43). En spectroscopie UV-visible, la longueur d'onde maximum du complexe 1 :3 est à 348 nm. En fluorescence d'émission, ce maximum se situe à 510 nm et en fluorescence synchrone, le maximum du complexe 1 :3 se trouve à 360 nm.

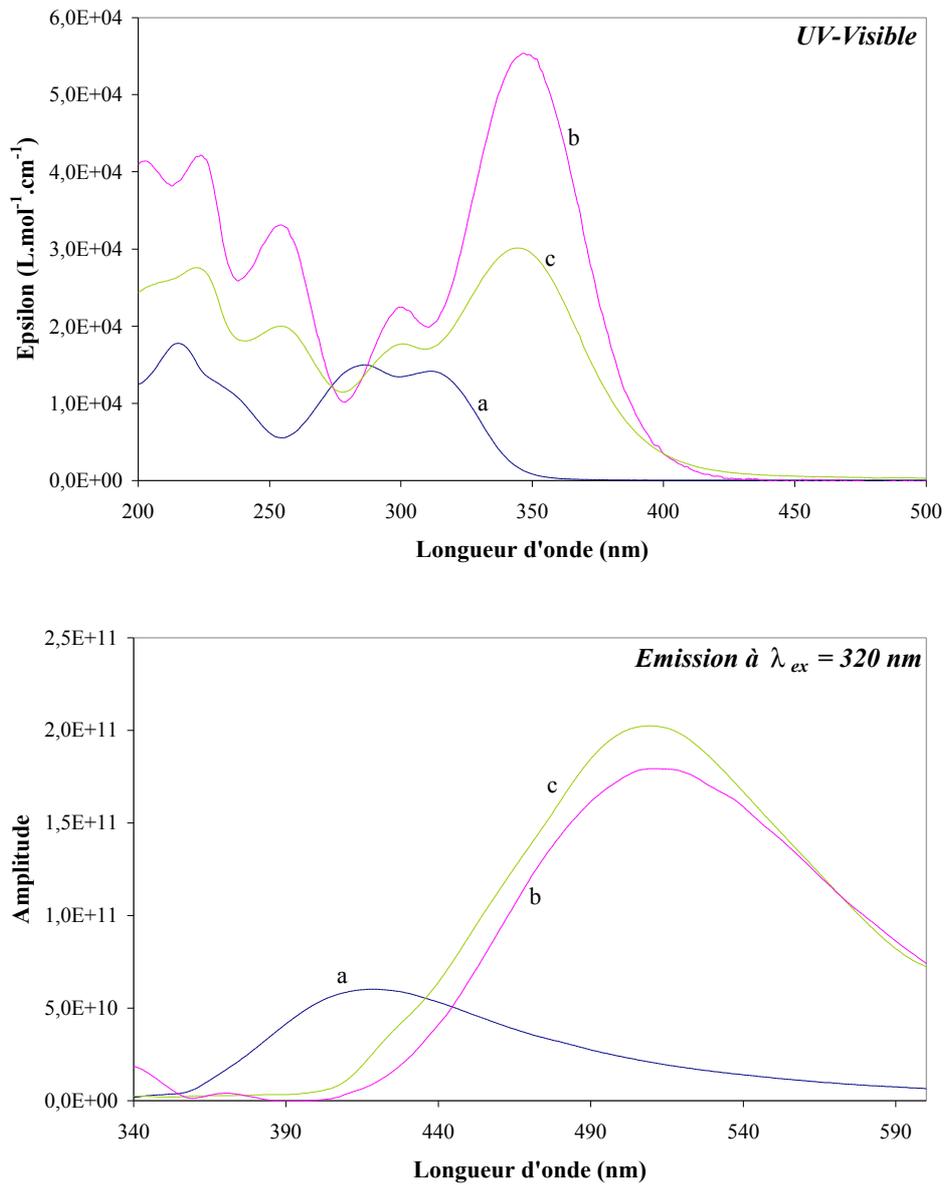


Figure 43 : Spectres des espèces pures obtenues par décomposition à pH 6,5. a : Acide caféique, b : complexe 1 :3, c : complexe 1 :2.

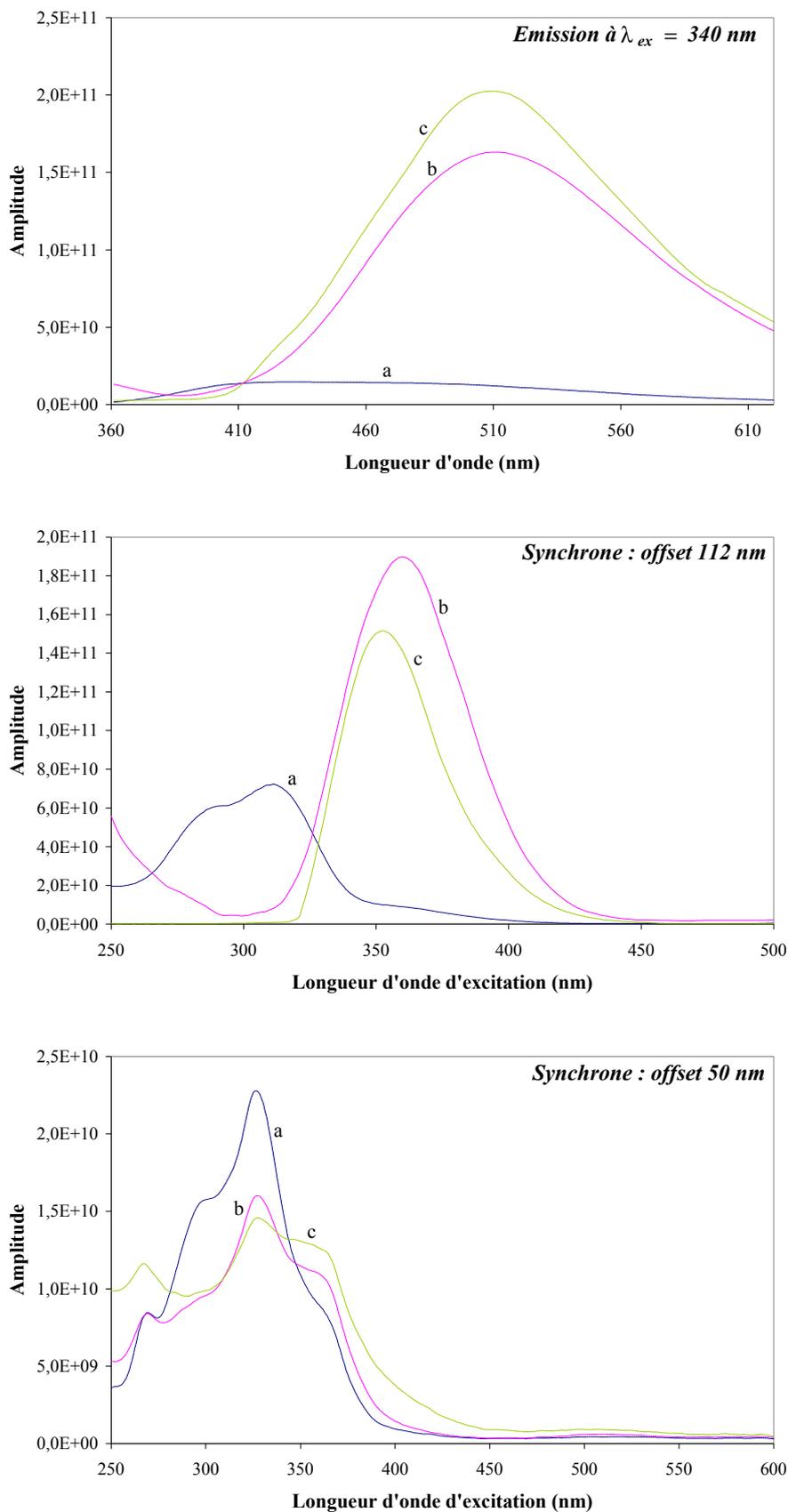


Figure 43 suite : Spectres des espèces pures obtenues par décomposition à pH 6,5. a : Acide caféique, b : complexe 1 :3, c : complexe 1 :2.

Les log des constantes de stabilité β_{ml} obtenus à pH 6,5 sont reportés dans le Tableau 4 :

| | 1 :3 | 1 :2 |
|--------------------|--------------|-------------|
| UV-visible | 12,9 ± 0,1 | 8,6 ± 0,2 |
| Emission à 320 nm | 13,40 ± 0,08 | 8,96 ± 0,04 |
| Emission à 340 nm | 15,2 ± 0,1 | 9,16 ± 0,08 |
| Synchrone à 112 nm | 13,41 ± 0,09 | 8,6 ± 0,1 |
| Synchrone à 50 nm | 14,97 ± 0,09 | 9,65 ± 0,08 |

Tableau 4 : $\log \beta_{ml}$ des différents complexes formés entre l'aluminium (III) et l'acide caféique à pH 6,5

A part l'expérience de fluorescence à 340 nm et la fluorescence synchrone à 50 nm qui ont des constantes un peu élevées, les constantes de stabilité calculées sont assez semblables. On remarque que le complexe 1 :2 a la même constante de stabilité à pH 5 et 6,5. Les complexes à ces deux pH sont donc identiques comme nous l'avions supposé précédemment lors de l'utilisation du même spectre pur au deux pH.

L'évolution des concentrations des différentes espèces en solution pour l'expérience en synchrone avec un offset de 112 nm (Figure 44) montre la formation simultanée des complexes 1 :3 et 1 :2. Au début du dosage, la concentration en complexe 1 :3 est légèrement supérieure à celle du complexe 1 :2. Pour un rapport proche de 1, la concentration du complexe 1 :2 devient supérieure à celle du 1 :3.

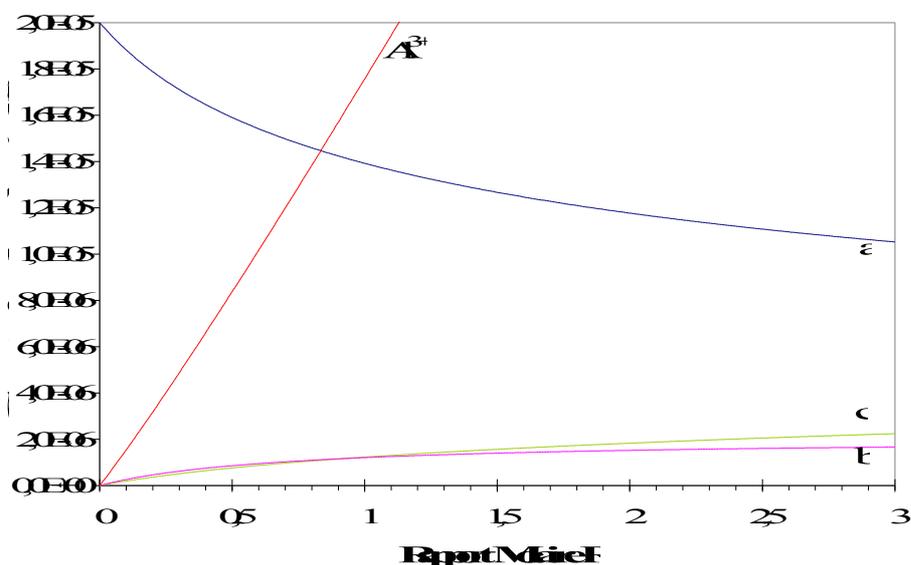
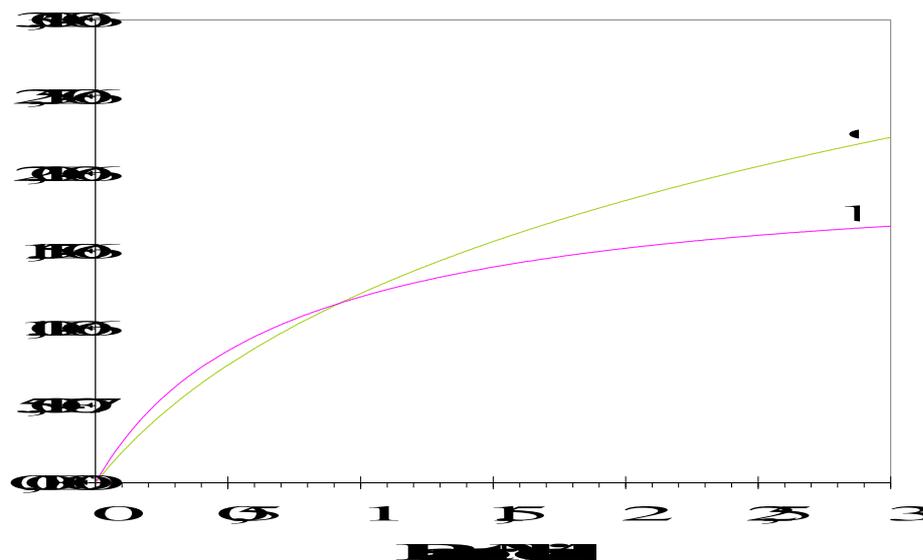


Figure 44 : Evolution des concentrations obtenue à partir des données en fluorescence synchrone à pH 6,5. a : Acide caféique, b : complexe 1 :3, c : complexe 1 :2.



**Figure 44 suite : Evolution des concentrations obtenue à partir des données en fluorescence synchrone à pH 6,5.
a : Acide caféique, b : complexe 1 :3, c : complexe 1 :2.**

L'évolution des concentrations est différente entre pH 5 et pH 6,5, c'est-à-dire que pour un même rapport, à ces deux pH, la composition du mélange réactionnel change. Il est donc normal de ne pas trouver la même forme de faisceau de spectres à ces deux pH.

Lors de l'exploitation des résultats, nous nous sommes heurtés à quelques problèmes. Le plus important concerne les difficultés rencontrées lors de la décomposition des données expérimentales. Tout d'abord, les complexes formés par l'acide caféique avec l'aluminium (III) présentent des spectres très proches, ce qui ne facilite pas la décomposition. Ensuite, le logiciel considère le premier et le dernier spectre du faisceau expérimental comme spectres d'espèces pures, ce qui n'est pas forcément le cas du dernier lorsque la complexation n'est pas totale. En effet, à pH 5, on peut considérer que la complexation est totale pour le dernier rapport $[Al]/[Caf]$ égal à 25 et donc qu'on est bien en présence d'une seule espèce, mais à pH 6,5, pour un rapport de 2, nous sommes en présence d'un mélange d'espèces.

Lors de l'étude spectroscopique de la complexation de l'aluminium (III) par l'acide caféique, nous avons pu voir que le type de complexe formé ainsi que sa quantité dépend fortement du pH. Un pH élevé a tendance à favoriser la formation de complexes de haute stœchiométrie comme les complexes 1 :2 et 1 :3. De plus, nous avons pu vérifier la qualité des résultats obtenus en spectroscopie de fluorescence qui, quelque soit la méthode utilisée (excitation, émission et synchrone) sont comparables à ceux obtenus par spectrométrie UV-visible. Nous pouvons donc employer sans problème la spectroscopie de fluorescence pour l'étude de molécules beaucoup plus

complexes que l'acide caféique qui ne donneraient pas de signal exploitable en absorption UV-visible.

4. Comparaison

La complexation de l'aluminium par l'acide caféique a déjà été étudiée par potentiométrie [48]. Pour certains rapports aluminium – acide caféique donnés, les auteurs ont fait varier le pH. Ils obtiennent donc les différents types de complexes formés en fonction du pH. Pour des rapports molaires métal-ligand variant de 1 :1,6 à 1 :4,5, 9 espèces $H_pAl_q(H_3L)_r$ ($p+3q$) ont été trouvées (Tableau 5). Les constantes de stabilité ont été calculées pour la réaction suivante :



Les constantes β_{pqr} sont définies par :

$$\beta_{pqr} = \frac{[H_pAl_q(H_3L)_r]^{(p+3q)}}{[H^+]^p [Al^{3+}]^q [H_3L]^r}$$

| pqr | Log β_{pqr} | Déviati on standard | Produit proposé |
|------|-------------------|---------------------|------------------|
| -101 | -4,382 | 0,001 | H_2L^- |
| -201 | -13,055 | 0,001 | HL^{2-} |
| -301 | -25,7 | 0,2 | L^{3-} |
| -211 | -4,88 | 0,01 | $AlHL^+$ |
| -311 | -9,45 | 0,01 | AlL^0 |
| -411 | -15,53 | 0,04 | $Al(OH)L^-$ |
| -612 | -22,24 | 0,02 | AlL_2^{3-} |
| -712 | -30,73 | 0,06 | $Al(OH)L_2^{4-}$ |
| -913 | -39,23 | 0,04 | AlL_3^{6-} |

Tableau 5 : Constantes d'équilibre des complexes entre l'aluminium et l'acide caféique à 25°C et dans 0,10M de KCl [48].

Ces différentes espèces n'existent pas à tous les pH. Par exemple, à pH 6,5, on trouve majoritairement l'espèce AlL_2^{3-} et un peu d'espèce $Al(OH)L^-$ pour un rapport Al(III) : Ligand

de 1 :2,5 (c'est-à-dire un rapport R de 0,4).

On remarque que les différentes espèces proposées tiennent compte de l'environnement de l'aluminium en milieu aqueux. Dans notre cas, il est impossible d'accéder de façon très précise à cet environnement et donc de calculer les constantes de formation des complexes en tenant compte des protons. Les constantes que nous avons calculées sont des constantes conditionnelles. On constate cependant que l'on trouve le même type de complexe majoritaire à pH 6,5, c'est-à-dire le complexe 1 :2.

L'étude de la complexation de l'acide caféique s'est aussi faite avec d'autres métaux. Bizri *et al.* [49] ont déterminé, grâce à des méthodes potentiométriques, le pouvoir complexant de l'acide caféique avec les ions Cu(II), Pb(II), Cd(II), Mn(II), Fe(III) et Al(III). L'ordre de stabilité des complexes mis en jeu suit la séquence : Cu > Pb > Cd > Mn pour les cations divalents et Al > Fe pour les cations trivalents. Une étude précise de la complexation du cuivre (M) par l'acide caféique (H₃A) a mis en évidence les espèces MHA, MA et MA₂. Les constantes de stabilité sont définies par :

$$\beta_{pqr} = \frac{[M_p H_q A_r]}{m^p h^q a^r}$$

avec m, h et a les concentrations libres respectives des ions métalliques, des protons et de la forme anionique du coordat. Ces constantes sont regroupées dans le Tableau 6.

| pqr | Log β_{pqr} | complexe |
|-------|-------------------|-----------------|
| 1 1 1 | 17,83 (0,01) | MHA |
| 1 0 1 | 12,85 (0,01) | MA |
| 1 0 2 | 22,74 (0,01) | MA ₂ |

Tableau 6 : Constantes de stabilité des complexes Cuivre – acide caféique à 25°C et dans 0,1M de NaClO₄ [49].

Grâce à la méthode potentiométrique, Cocks *et al.* [69] ont déterminé les différents complexes formés entre le dianion de l'acide caféique (CaffH²⁻) et les ions métalliques Mn²⁺, Ni²⁺, Co²⁺ et Cd²⁺ pour un rapport Ligand : métal compris entre 1 :1 et 5 :1, à différents pH. Les

constantes de stabilité β_{pqr} sont définies pour un complexe M_pL_qH_r. Les différents résultats sont reportés dans le Tableau 7 suivant :

| Métal | pqr | Log β_{pqr} | Déviati on standard | complexe | pH |
|------------------|------|-------------------|---------------------------|--|-------------|
| Mn ²⁺ | 11-1 | - 4,88 | 0,004 | MnLH ₋₁ ⁻ | 7,0 – 10, 5 |
| | 11-2 | - 15,55 | 0,008 | MnLH ₋₂ ²⁻ | |
| Ni ²⁺ | 11-1 | - 3,62 | 0,004 | NiLH ₋₁ ⁻ | 6,6 – 9,5 |
| | 11-2 | - 13,45 | 0,016 | NiLH ₋₂ ²⁻ | |
| | 21-1 | - 1,56 | 0,012 | Ni ₂ LH ₋₁ ⁺ | |
| Co ²⁺ | 11-1 | - 4,12 | 0,004 | CoLH ₋₁ ⁻ | 6,7 – 9,0 |
| | 21-1 | - 1,75 | 0,015 | Co ₂ LH ₋₁ ⁺ | |
| Cd ²⁺ | 11-1 | - 4,91 | 0,001 | CdLH ₋₁ ⁻ | 6,0 – 9,1 |
| | 12-2 | - 12,29 | 0,014 | CdL ₂ H ₋₂ ⁴⁻ | |
| | 13-3 | - 19,50 | 0,046 | CdL ₃ H ₋₃ ⁻ | |

Tableau 7 : Constantes de stabilité des complexes formés avec le dianion de l'acide caféique (CaffH²⁻) à 25° C dans 0,1M de NaCl [69].

Quel que soit le métal utilisé, l'espèce majoritaire est le complexe MLH₋₁. Le métal se fixe sur le site catécholate et entraîne le détachement du dernier proton.

Linder et Voyé [58] ont aussi étudié la complexation du cuivre, du zinc et du fer (II) sur l'ion caféate (CaffH²⁻) par potentiométrie. La constante de complexation β_{pqr} fait référence au complexe $L_pM_qH_r$ où L est le ligand, M le métal et H le proton. L'étude de la complexation a été réalisée à différents rapports Ligand : Métal et à différents pH. Tous ces résultats sont regroupés dans le Tableau 8.

| Métal | L : M | pqr | Log β_{pqr} | Déviati on standard | Complexe | pH |
|------------------|-------------|------|-------------------|---------------------------|--|---------|
| Cu ²⁺ | 1 :1 à 7 :1 | 111 | 10,46 | 0,020 | LCuH ⁺ | 3,3 - 7 |
| | | 110 | 6,02 | 0,012 | LCu | |
| | | 11-1 | 0,25 | 0,008 | LCuH ₋₁ ⁻ | |
| | | 12-1 | 3,54 | 0,038 | LCu ₂ H ₋₁ ⁺ | |
| | | 32-3 | 0,97 | 0,016 | L ₃ Cu ₂ H ₋₃ ⁵⁻ | |

| | | | | | | |
|-----------|--------------|------|--------|-------|--------------------|---------|
| | | 23-2 | 7,41 | 0,024 | $L_2Cu_3H_{-2}$ | |
| Zn^{2+} | 1 :1 à 10 :1 | 110 | 2,99 | 0,056 | LZn | 6 - 9 |
| | | 11-1 | - 3,03 | 0,005 | $LZnH_{-1}$ | |
| | | 21-1 | - 0,39 | 0,034 | $L_2ZnH_{-1}^{3-}$ | |
| | | 21-2 | - 8,21 | 0,022 | $L_2ZnH_{-2}^{4-}$ | |
| | | 31-2 | - 5,51 | 0,017 | $L_3ZnH_{-2}^{6-}$ | |
| Fe^{2+} | 1 :1 à 5 :1 | 110 | 3,86 | 0,034 | LFe | 5 – 8,5 |
| | | 11-1 | - 3,83 | 0,054 | $LFeH_{-1}$ | |
| | | 21-1 | - 0,36 | 0,025 | $L_2FeH_{-1}^{3-}$ | |
| | | 31-2 | - 6,14 | 0,023 | $L_3FeH_{-2}^{6-}$ | |
| | | 120 | 6,69 | 0,093 | LFe_2^{2+} | |

Tableau 8 : Constantes de stabilité des différents complexes formés avec l'ion caféate ($CafH^2$) à 25°C dans 0,1M de NaCl [58].

Pour ces métaux, la complexation s'effectue préférentiellement sur le site catéchol.

Tous ces résultats confortent notre observation de la complexation de l'aluminium sur le site catéchol de l'acide caféique à pH 5 et 6,5. Parallèlement à cette étude, un travail réalisé au laboratoire concernant la même molécule, a montré que l'ion Pb(II) se fixe préférentiellement sur le site carboxylate à pH 6,5 ; et qu'il était nécessaire d'ajouter des quantités relativement importantes de Pb(II) pour observer une complexation de la fonction catéchol.

La comparaison des valeurs obtenues des pK_a de l'acide caféique (par UV-visible : 4,47, 8,59 et 10,5, et par fluorescence : 4,22 et 8,28), à celles obtenues par potentiométrie [49] (4,45, 8,66 et 11,8), a permis de valider nos méthodes expérimentales ainsi que celles utilisées pour l'exploitation des résultats.

Par la suite, lors de l'étude de la complexation de Al^{3+} par l'acide caféique à pH fixe, nous avons constaté que les résultats obtenus par la spectrométrie UV-visible et ceux obtenus par spectroscopie de fluorescence étaient semblables (complexe de même stœchiométrie, constante de stabilité des complexes formés semblables). Cependant les techniques de fluorescence synchrone présentent l'avantage de fournir une signature spectroscopique plus fine des différents composés d'un mélange complexe

CHAPITRE III

Étude de l'acide humique

Comme il a été dit dans la présentation du sujet, dans le milieu naturel l'acide humique est associé à de petites molécules organiques pour former la matière organique des sols. Ces dernières pouvant complexer les ions métalliques, elles peuvent tout naturellement entrer en compétition avec l'acide humique. D'autre part, ces petites molécules peuvent interagir avec les macromolécules d'acide humique elles – mêmes par différents types d'interactions (Van der Waals, ...) et modifier leur comportement. Dans cette partie, nous présentons une étude de la complexation de l'aluminium par l'acide humique, que nous complétons par une première approche de la compétition entre la petite molécule organique qu'est l'acide caféique et la macromolécule.

VIII. Étude préliminaire de l'acide humique

Sous le vocable « acide humique », on désigne une grande variété de substances de structures mal définies et de composition très variable suivant l'origine, les types de cultures et les conditions climatiques. Dans le cadre de ce travail, qui met plus l'accent sur une étude de faisabilité, nous avons employé un acide humique d'origine commerciale (Fluka).

1. Purification de l'acide humique

Comme l'acide humique employé peut contenir une fraction insoluble relativement importante, une étape de purification [70] s'est avérée nécessaire :

- 10g d'acide humique sont mis en contact, sous atmosphère inerte, avec 100 mL d'une solution de soude 0,1M dans un flacon bouché et agité pendant 24h.
- Le mélange est centrifugé pendant 1h à 2000 tr/min, le surnageant est ensuite filtré au travers d'une membrane micropores 0,45µm.

Ces deux premières étapes de la purification permettent d'enlever la fraction insoluble en milieu basique de l'acide humique utilisé.

- La solution récupérée est acidifiée par ajout d'acide chlorhydrique 0,1M jusqu'à pH 1,00, puis laissée décanter pendant 24h.
- La solution est de nouveau centrifugée pendant 1h à 2000 tr/min.

En acidifiant la solution, on récupère l'acide humique, par précipitation, qui n'est pas soluble à pH très acide. La centrifugation permet de récupérer toute la partie solide en suspension dans le mélange.

- La partie insoluble (acide humique) est ensuite lavée par HCl 0,1M afin d'éliminer l'excès de sel formé pendant la purification.

Ce mode opératoire a été répété autant de fois que nécessaire, jusqu'à ce qu'aucune partie insoluble n'apparaisse lors du mélange avec la soude. Après la purification, l'acide humique est séché sous vide, la masse récupérée est environ moitié de celle de départ et purifié de ses cendres.

Une analyse élémentaire (Tableau 9), réalisée sur un échantillon d'acide humique purifié de même origine [70], montre des résultats proches des valeurs données par Steelink [9] pour les acides humiques qu'il a étudié.

| | % massique moyen | Littérature [9] |
|---|------------------|-----------------|
| C | 50,9 | 53,8 – 58,7 |
| H | 3,8 | 3,2 – 6,2 |
| N | 0,9 | 0,8 – 4,3 |
| S | 1,1 | 0,1 – 1,5 |
| O | 43,3 | 32,8 – 38,3 |

Tableau 9 : Analyse élémentaire de l'acide humique Fluka purifié [70].

Malgré les phases de purification, cet échantillon contient encore une proportion relativement importante d'impuretés d'origine minérale. En effet, les taux élevés en Si, Fe et Al présentés dans le Tableau 10 peuvent être expliqués par une forte proportion minérale, généralement sous forme de silice, d'alumine et d'oxyde de fer, engendrant des teneurs en oxygène plus élevées que celles généralement données dans la littérature pour différents types d'échantillons.

| | Na | Ca | Fe | Mg | Pb | Si | Al |
|-------|------|-----|------|----|----|------|------|
| mg/kg | 3900 | 300 | 4300 | 0 | 30 | 8400 | 4400 |

Tableau 10 : Dosage des principaux éléments présents dans l'acide humique Fluka purifié [70].

Comme la masse molaire de l'acide humique n'est pas connue, les concentrations seront exprimées en mg/L.

2 Étude spectroscopique

a) Absorption UV-visible

Le spectre d'absorption UV-visible d'un échantillon d'acide humique est présenté sur la Figure 45. Il se caractérise par une bande très large et très intense centrée dans l'UV. Dans le domaine étudié, nous n'observons qu'un fond décroissant de 200 à 500 nm.

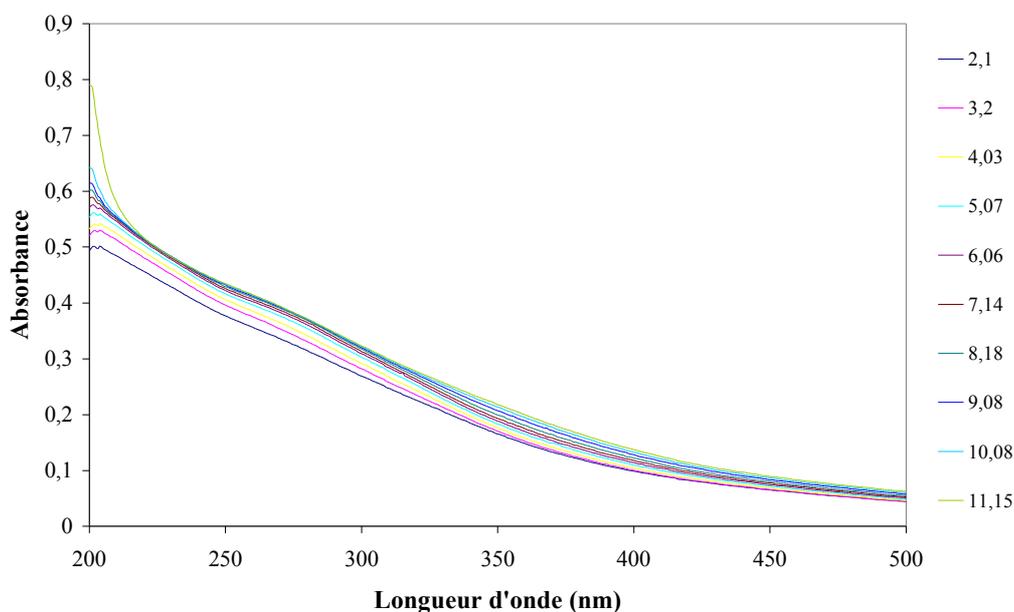


Figure 45 : Etude de l'acide humique (10 mg/L) en fonction du pH.

Dans cet exemple où l'on observe la variation du spectre UV-visible de l'acide humique en fonction du pH, les différentes données extraites de ce faisceau (Figure 46) ne permettent pas d'obtenir une exploitation satisfaisante. En effet, on observe une évolution de l'absorbance en fonction du pH, mais celle-ci n'est pas très significative pour être exploitée. Il faut donc utiliser une autre technique analytique pour pouvoir étudier l'acide humique.

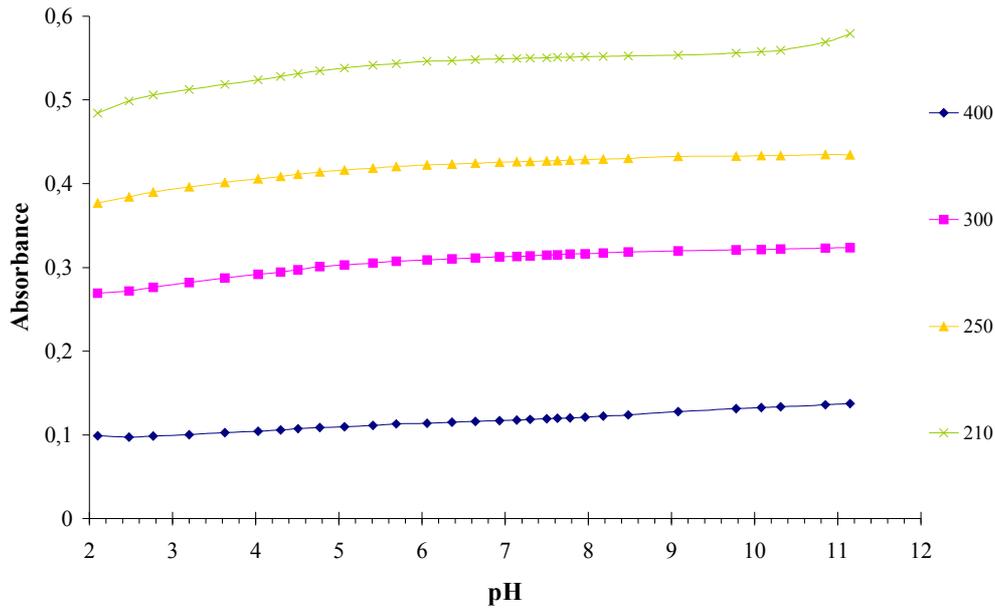


Figure 46 : Evolution de l'absorbance de l'acide humique en fonction du pH pour différentes longueurs d'onde.

b) Fluorescence

La spectrométrie de fluorescence s'avère être plus riche en informations pour l'étude de l'acide humique. En effet, ces macromolécules étant constituées de nombreux cycles aromatiques, on peut s'attendre à observer des signaux de fluorescence caractéristiques de sa composition.

En préambule de cette étude nous avons recherché, comme précédemment pour l'acide caféique, la concentration optimale à utiliser. On remarque, sur la Figure 47, que la linéarité du signal de fluorescence de l'acide humique n'est valable que pour des concentrations inférieures à 20 mg/L. Pour conserver un rapport signal sur bruit exploitable, nous avons, dans la suite de notre étude, utilisé une concentration en acide humique de 10 mg/L.

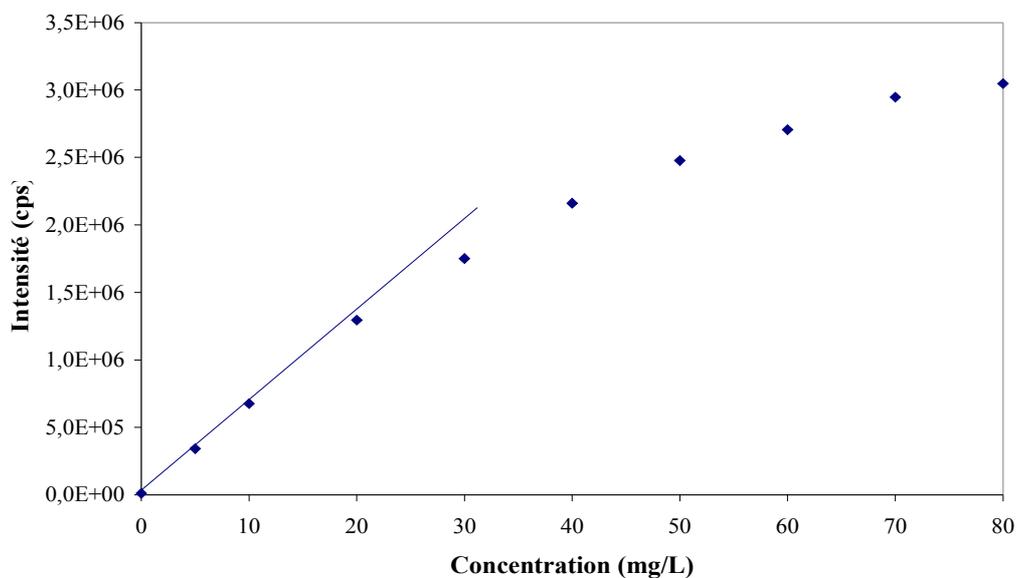


Figure 47 : Linéarité du signal de fluorescence de l'acide humique à pH = 6,50. Spectre synchrone : offset de 50 nm, λ_{ex} = 250 à 600 nm, fente 5 nm, signal Sc/Rc, intégration 0,5 s, incrément 1 nm.

Nous avons enregistré la matrice MEE de notre échantillon d'acide humique purifié pour connaître la position de ses différents massifs de fluorescence. On observe, sur la Figure 48, trois massifs situés respectivement à $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 440/525 nm (A), 365/520 nm (B) et 270/530 nm (C), ce dernier étant beaucoup plus intense que les deux autres. La position de la bande de l'eau, susceptible d'interférer avec ces massifs a été matérialisée comme repère. Un spectre d'excitation enregistré à λ_{em} = 520 nm (Figure 49), montre que le deuxième massif (B) est en fait un simple plateau, tandis que le troisième (A) est dédoublé. Il faut remarquer que pour la longueur d'onde d'enregistrement, la bande de l'eau se positionne à 440 nm.

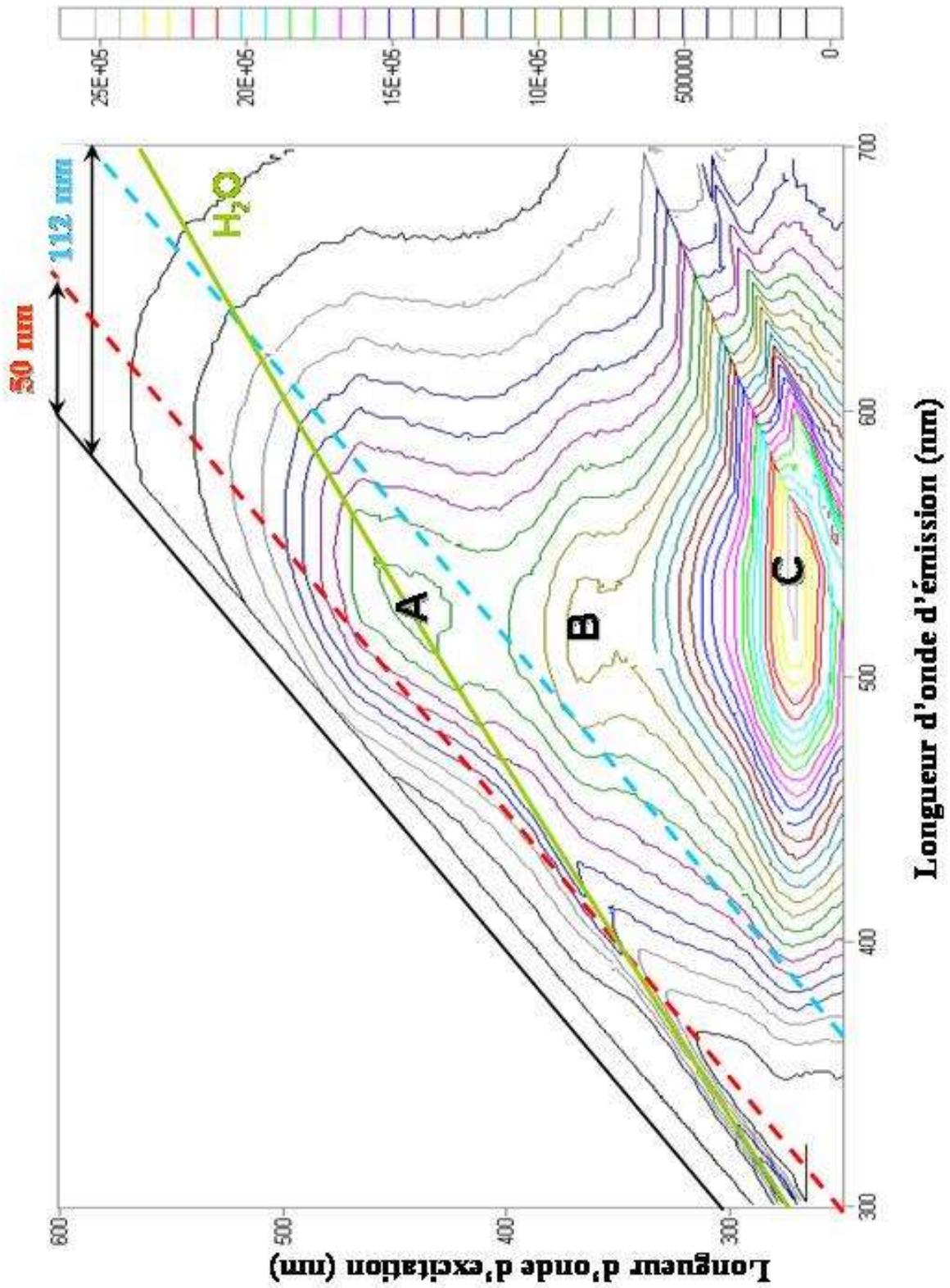


Figure 48 : Matrice MEE de l'acide humique (10 mg/L) à pH = 6,5 ± 0,1.

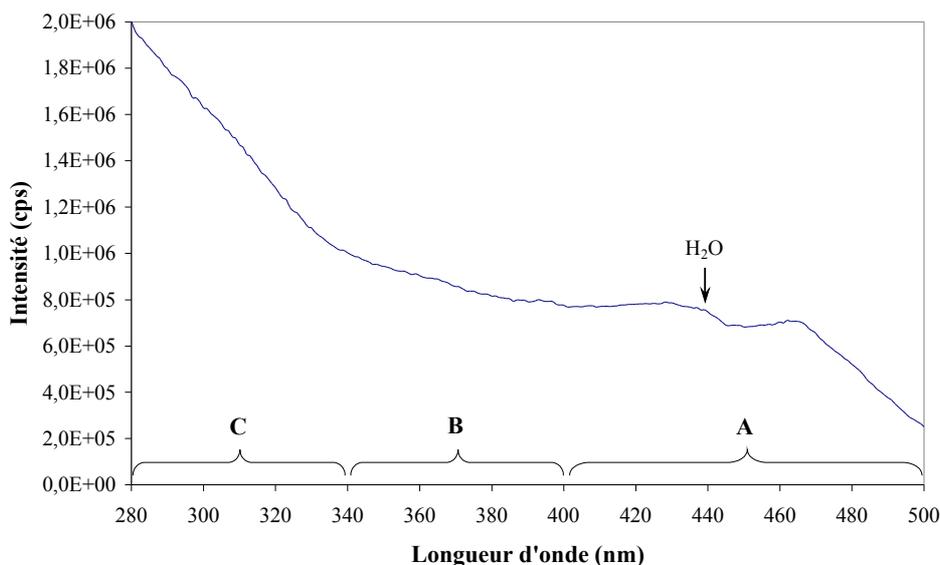


Figure 49 : Spectre d'excitation de l'acide humique (10 mg/L) à pH = 6,5 (λ_{ex} = 280 à 500 nm, λ_{em} = 520 nm).

Comme nous l'avons vu précédemment (chapitre II), la fluorescence synchrone doit permettre une meilleure résolution de ces massifs, mais dans ce cas, le choix de l'offset [15-17, 28-31, 33, 35, 64, 65, 67, 68] est particulièrement important. Sur la Figure 50, nous observons une évolution du profil des bandes du spectre synchrone de l'acide humique pour différentes valeurs de l'offset.

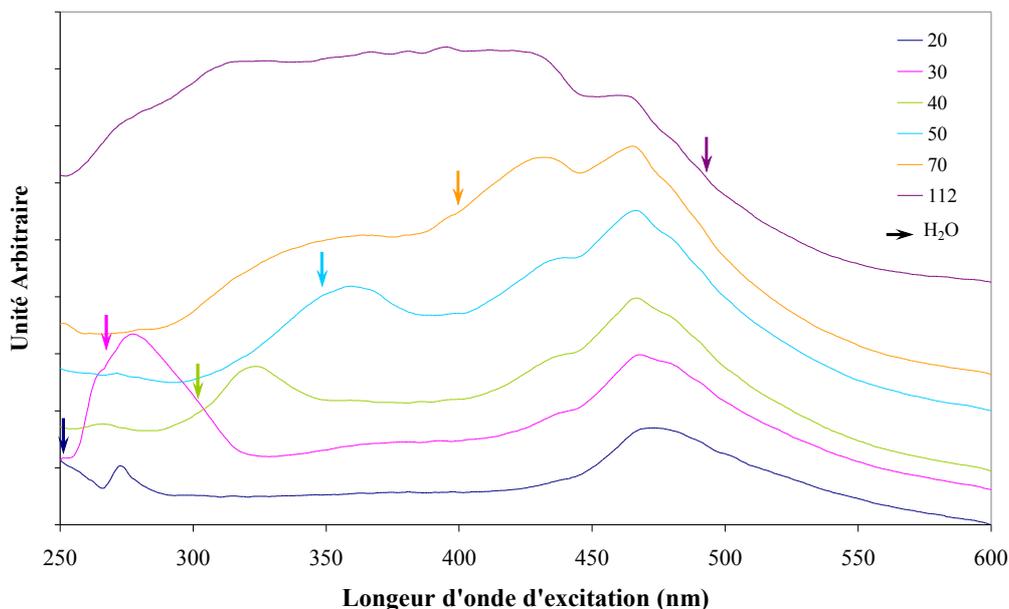


Figure 50 : Effet de l'offset sur le spectre de l'acide humique à 10 mg/L à pH = 6,50 ± 0,05.

Avec une valeur d'offset égale à 112 nm, on observe un massif très large dans lequel il est cependant possible de distinguer certaines composantes : 276 et 315 nm correspondent au massif

précédemment noté C, 380 nm correspond au massif B et le doublet 430 - 465 nm confirme l'existence de deux composantes dans le massif A. La raie Raman de l'eau, attendue ici vers 494 nm, n'est pas observée sans doute à cause du facteur en ν^4 défavorable à son intensité avec une excitation dans le visible.

La résolution s'améliore si la valeur de l'offset diminue, en effet les bandes préalablement distinguées dans le large massif sont maintenant mieux résolues. Toutefois la raie Raman de l'eau, apparaissant à des longueurs d'onde plus courtes, devient de plus en plus intense et perturbe, dans certains cas le spectre enregistré. Sur la Figure 50, nous avons reporté les positions attendues pour cette raie de diffusion lorsque l'on utilise différentes valeurs d'offset.

Le spectre synchrone de l'acide humique obtenu avec un offset de 50 nm, valeur choisie pour la suite de notre étude (Figure 51), est constitué de 2 massifs : l'un vers 359 nm qui contient une contribution importante de la bande Raman de l'eau, et l'autre centré vers 467 nm dans lequel il est possible de visualiser 3 composantes, respectivement à 440, 467 et 476 nm.

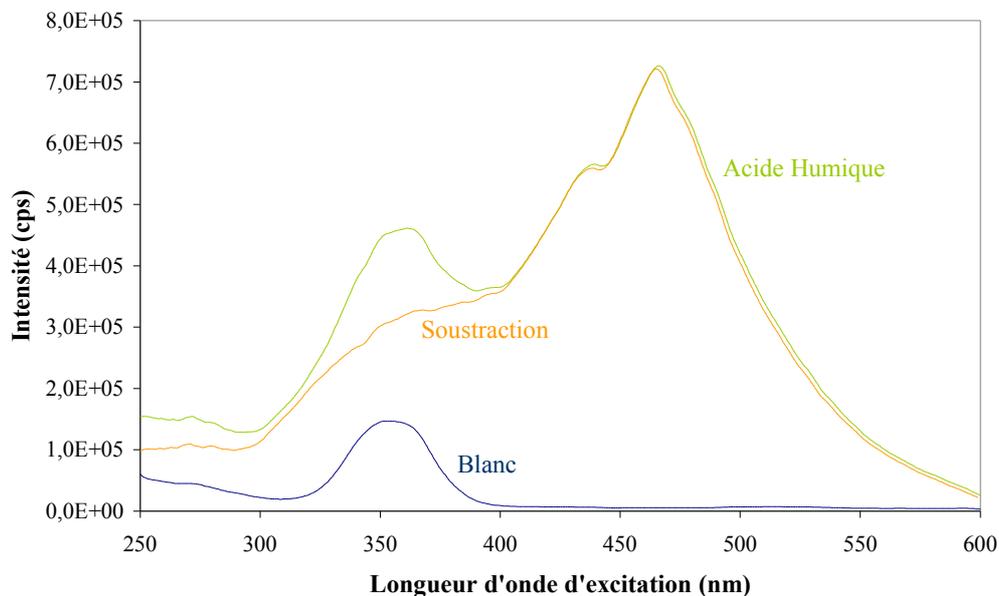


Figure 51 : Spectre synchrone de l'acide humique à pH 6,50 et du blanc avec un offset de 50 nm.

L'attribution de ces bandes est complexe et sort du cadre de cette étude. Cependant, des études antérieures [67, 73] ont pu montrer que la structure fine vers 470 nm pouvait être

corrélée à la présence de substituants attracteurs sur des fractions polyphénoliques condensées, tandis que la bande large vers 390 nm serait plus caractéristique de fractions riches en hydrates de carbone. Il semblerait que plus les structures sont condensées, plus les bandes d'émission se situent dans les grandes longueurs d'onde. Des décompositions de massifs de fluorescence par des méthodes mathématiques ont pu mettre en évidence un certain nombre de structures (aromatiques simples, hydroxyquinoléines, flavones, coumarines...) (chapitre I) caractérisées par des offsets de 50 à 80 nm [42].

3. Influence du pH sur le spectre synchrone de l'acide humique.

L'évolution du spectre de fluorescence synchrone de l'acide humique sur une large gamme de pH (2 à 12) est représentée sur la Figure 52. Parallèlement à une augmentation générale de l'intensité du signal lorsque le pH augmente, on observe un léger déplacement des maxima secondaires du massif situé vers 400 – 500 nm. Le maximum B se déplace de 465 nm à 471 nm. Le maximum A se déplace de 436 à 439 nm pour revenir à 432 nm pour des pH supérieur à 11. La position du maximum à 481 nm (C), qui apparaît pour des pH supérieurs à 6, demeure constante. Cependant son intensité relative par rapport aux autres composantes augmente de manière significative pour les pH basiques.

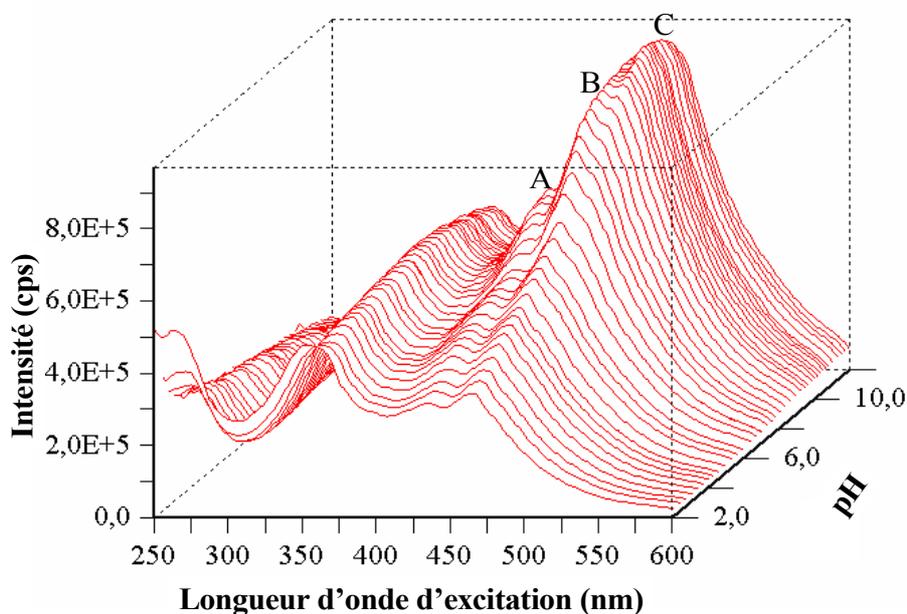


Figure 52 : Evolution du spectre synchrone de l'acide humique à 10 mg/L en fonction du pH.

En traçant l'évolution de l'intensité du signal de fluorescence pour différentes longueurs d'onde caractéristiques (A, B et C) en fonction du pH (Figure 53), on observe, pour ces trois courbes, trois sauts d'intensité respectivement situés vers pH 3,2, 7,5 et 10,2. Les variations sont

plus ou moins importantes selon la réponse des fluorophores impliqués dans les processus de déprotonation.

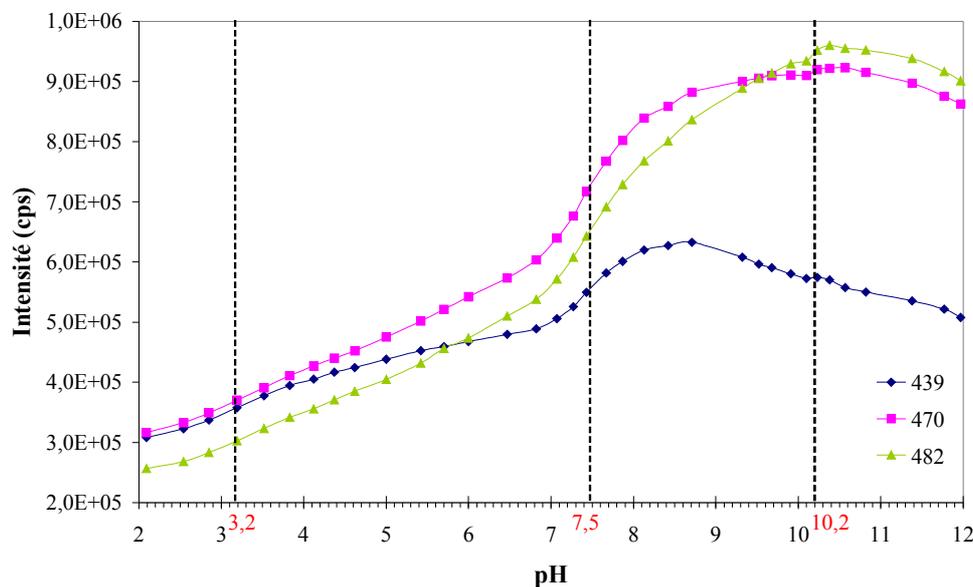


Figure 53 : Evolution de l'intensité du signal de fluorescence de l'acide humique 10 mg/L en fonction du pH pour trois valeurs de longueurs d'onde.

Dans l'acide humique les fonctions déprotonables sont très nombreuses, et il n'est pas possible de considérer la totalité des pK_a associés à chaque fonction pour modéliser le système. Deux modèles sont généralement utilisés : (i) une variation continue des pK_a autour de valeurs moyennes et (ii) des valeurs discrètes représentatives des fonctions majoritaires. Dans chacun des cas, il est possible de résumer les propriétés acido-basiques de la macromolécule par un nombre réduit de pK_a .

Dans notre cas, il est donc possible d'associer chaque saut de pH à des fonctions particulières. Le saut à pH 10,2 peut être attribué essentiellement aux différents groupes phénoliques contenus dans l'acide humique qui ont en général un pK_a compris entre 8 et 11. Il se peut que des groupements amines situés en bout de chaîne aliphatique et dont le pK_a est compris entre 10 et 11 contribuent également à ce saut.

Le saut à pH 7,5 peut être attribué aux groupements acides polycarboxyliques. Comme la présence de polyacides est attendue, le saut à pH 3,2 serait donc dû aux premières acidités de ces acides, les suivantes seraient contenues dans le saut à 7,5.

La position en longueurs d'onde de la bande C et le fait qu'elle apparaisse pour des pH relativement élevés suggèrent que cette émission est due à un fluorophore contenant des fonctions du type phénolique déprotonées.

IX. Complexation de l'aluminium (III) par l'acide humique

L'acide humique étant une macromolécule complexe et de nature colloïdale, tous ses sites ne sont pas immédiatement disponibles pour l'aluminium mis en solution. Il faut donc attendre que les ions Al^{3+} puissent diffuser à travers la molécule d'acide humique pour atteindre les sites internes. L'évolution du spectre après une addition d' Al^{3+} à une solution d'acide humique (Figure 54), montre que l'intensité du signal de fluorescence se stabilise après quarante minutes d'attente. Dans la suite de cette étude, les solutions seront donc préparées 40 minutes avant l'enregistrement du spectre.

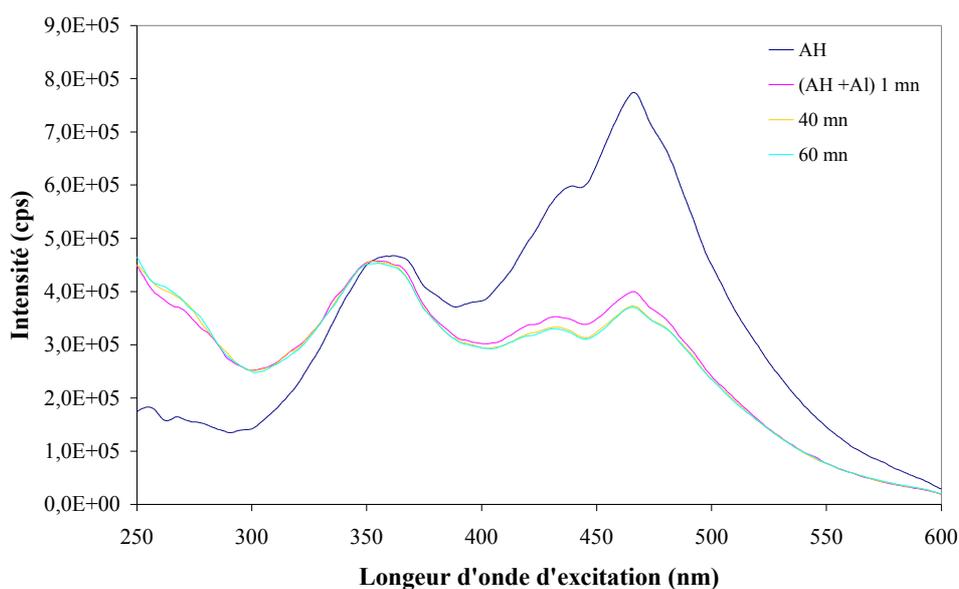


Figure 54 : Evolution du spectre de l'acide humique (10 mg/L à pH 6,5) après une addition d'aluminium (III) ($2.10^{-5}M$)

L'ajout d'une quantité croissante d'aluminium (III) à une solution d'acide humique à pH 6,5 (Figure 55) provoque une diminution importante de l'intensité du signal, sans déplacement de la position des bandes. La formation de complexes moins fluorescents que la molécule initiale est caractéristique d'une extinction statique. On remarque que la bande située vers les 360 nm voit son intensité diminuer moins fortement à cause de la présence de la bande de diffusion de l'eau.

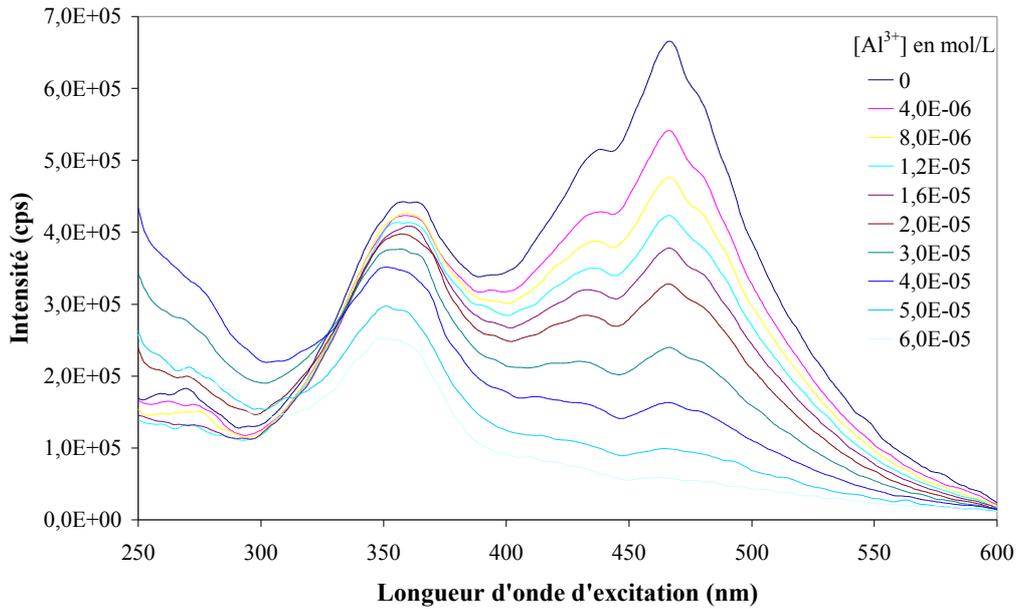


Figure 55 : Etude de la complexation de l'aluminium (III) par l'acide humique 10 mg/L à pH 6,5

Dans le cas d'une extinction statique, la relation de Stern Volmer (voir chapitre I) permet d'obtenir une constante de complexation dans l'hypothèse d'un complexe 1:1. Sur la Figure 56, nous avons tracé l'évolution du rapport I_0/I en fonction de la concentration du quencher : l'aluminium. Sur ce graphique, on remarque deux zones distinctes : la première entre 0 et $2.10^{-5}M$ et la seconde au-delà de $2.10^{-5}M$.

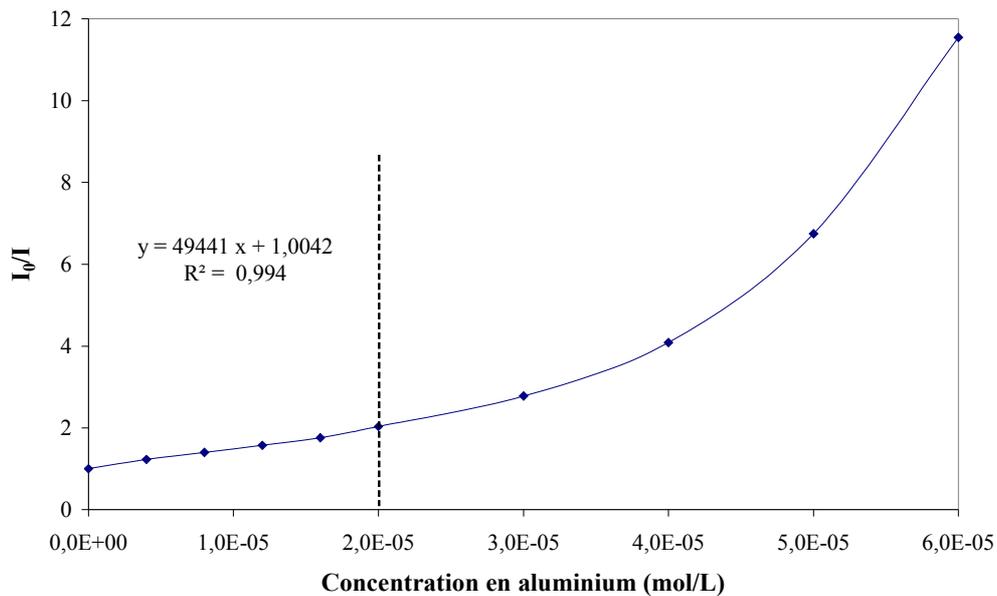


Figure 56 : Courbe de Stern Volmer : $I_0/I = f([Q])$ à $\lambda_{ex} = 467 \text{ nm}$ et $\lambda_{em} = 517 \text{ nm}$

Entre 0 et $2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ d'aluminium, la représentation I_0/I en fonction de la concentration en aluminium (Figure 56) donne une droite passant par 1. La constante de Stern Volmer, déterminée à partir de la pente de cette droite, nous donne donc la constante de complexation. Pour $\lambda_{ex} = 467 \text{ nm}$ et $\lambda_{em} = 517 \text{ nm}$, K_{sv} est de l'ordre de $5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ pour un pH de 6,5. Ce résultat est confirmé pour les bandes observées à 440 et 480 nm.

Dans la seconde zone, nous avons une brutale augmentation de I_0/I en fonction de la concentration, ce qui correspond à la diminution du signal de fluorescence jusqu'à disparition quasi complète du signal de l'acide humique (Figure 55). Cette constatation nous amène à penser que le changement de conformation de l'acide humique devient plus important à partir de cette valeur pour conduire à une extinction quasi complète du signal. Certains auteurs ont proposé une forte agrégation de l'acide humique provoquant une auto - extinction et/ou une précipitation partielle du matériel (anisotropie de fluorescence) [38]. Une coagulation de l'acide humique autour de microcristaux d' $\text{Al}(\text{OH})_3$ a aussi été évoquée (techniques spectroscopiques – RMN ^{27}Al , diffraction X, FTIR) [40]. L'apparition d'un voile blanc dans les solutions, si la concentration en aluminium dépasse $2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, corrobore cette dernière hypothèse.

X. Compétition entre l'acide humique et l'acide caféique

Dans les milieux naturels, l'acide humique est en présence de petites molécules telles que l'acide caféique. Dans cette partie, nous allons voir s'il existe une interaction entre ces deux molécules ainsi que leur comportement vis-à-vis de la complexation d' $\text{Al}(\text{III})$.

1. Interaction entre l'acide caféique et l'acide humique

Avant d'étudier la compétition entre la molécule d'acide caféique et l'acide humique, nous avons voulu savoir s'il existait une interaction entre ces deux entités. Cette interaction pourrait modifier la disponibilité des sites de fixation des molécules vis-à-vis de l'aluminium et donc entraîner une augmentation ou une diminution du pouvoir de complexation des sites.

Les spectres synchrones avec un offset de 50 nm de l'acide humique seul, de l'acide caféique seul puis celui du mélange sont présentés sur la Figure 57. Le spectre du mélange est comparé à la somme mathématique des deux premiers.

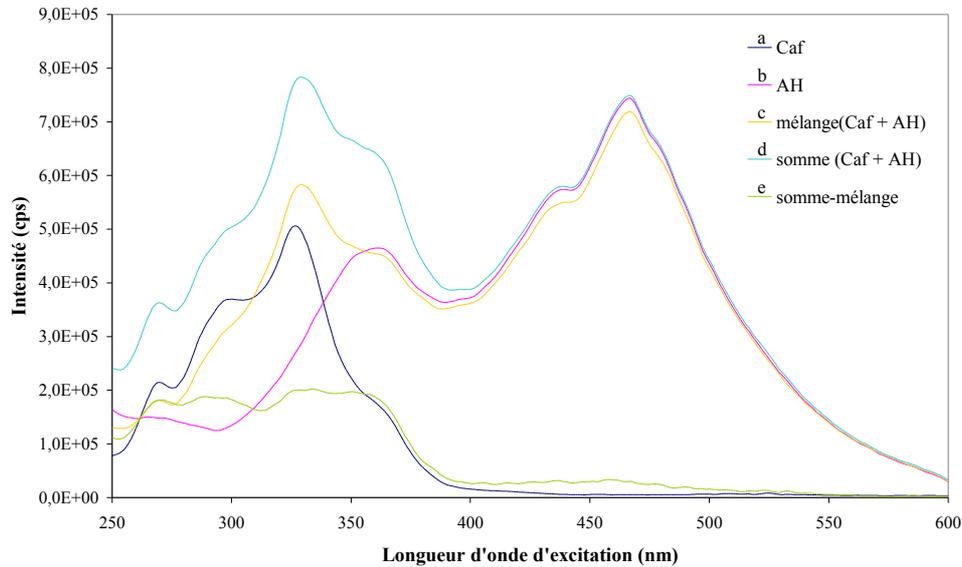


Figure 57 : Spectres synchrones avec un offset de 50 nm de : a- l'acide caféique $2.10^{-5}M$, b- l'acide humique 10 mg/L, c- mélange Caf – AH, d- somme mathématique des spectres a et b, e- soustraction des spectres d et c.

Si aucune interaction n'existait, le résidu obtenu en soustrayant le spectre du mélange de la somme mathématique serait seulement le spectre du blanc. Or, on remarque sur la Figure 53 des différences significatives :

- (i) Le massif situé vers 470 nm correspondant à l'acide humique est légèrement moins intense dans le mélange.
- (ii) Les deux bandes de l'acide caféique (298 et 330 nm) diminuent fortement en intensité dans le mélange.
- (iii) On constate un faible déplacement (3 nm) du maximum de l'acide caféique vers les grandes longueurs d'onde.

En utilisant un offset de 112 nm (Figure 58), les mêmes observations peuvent être mises en évidence : diminution de l'intensité du massif de l'acide humique (400-470 nm) et des bandes de l'acide caféique (286 et 311 nm), léger déplacement bathochrome (3 nm) des raies de l'acide caféique.

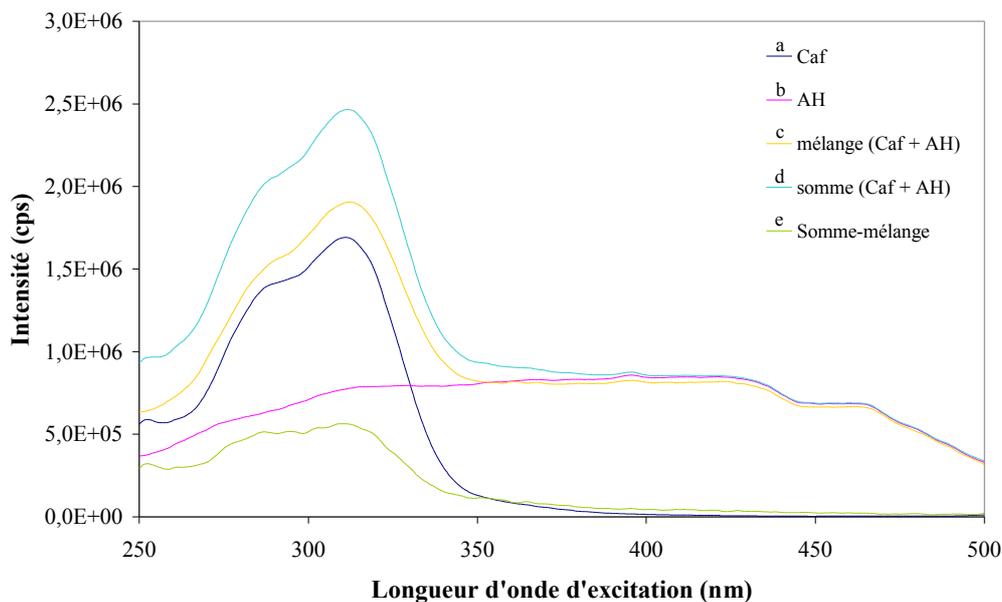


Figure 58: Spectres synchrones avec un offset de 112 nm de : a- l'acide caféique $2.10^{-5}M$, b- l'acide humique 10 mg/L, c- mélange Caf – AH, d- somme mathématique des spectres a et b, e- soustraction des spectres d et c.

D'après ces constatations, il semble bien qu'une interaction entre l'acide caféique et l'acide humique existe. L'existence de cette interaction est beaucoup plus apparente sur le spectre de l'acide caféique que sur celui de l'acide humique. Les extinctions de fluorescence observées peuvent avoir plusieurs origines :

- (i) Une extinction statique avec la formation de complexes π - π entre les nombreux noyaux aromatiques présents dans l'acide humique et le noyau aromatique de l'acide caféique ou la formation de liaisons hydrogène entre l'acide caféique et l'acide humique.
- (ii) Une extinction dynamique, par collisions entre les petites molécules d'acide caféique et la macromolécule humique.

Le déplacement bathochrome des bandes de l'acide caféique serait un argument plus en faveur du premier mécanisme. Dans les deux cas ces différentes interactions pourraient diminuer la disponibilité de l'acide caféique vis-à-vis de l'aluminium.

2. Compétition entre l'acide caféique et l'acide humique

La mise en présence d'aluminium (III) dans une solution contenant à la fois de l'acide humique et de l'acide caféique, doit conduire tout naturellement à la formation de différents complexes (Al-AH, Al-Caf, Al-AH-Caf). Afin de pouvoir caractériser les différentes formes en présence et les possibilités d'échange entre les deux partenaires, nous avons réalisé cette étude en trois étapes. Dans la première, l'aluminium (III) est additionné au mélange d'acide humique et d'acide caféique. Dans la seconde, l'acide caféique est ajouté à une solution contenant le complexe aluminium – acide humique et dans la troisième l'acide humique est ajouté à une solution de complexe aluminium – acide caféique. Pour ces trois expériences, nous avons utilisé une concentration de $2 \cdot 10^{-5} \text{M}$ en acide caféique, de 10mg/L en acide humique et de 10^{-5}M en aluminium. Dans ces conditions, nous sommes toujours dans la zone de linéarité de mesure, les complexes formés entre l'acide caféique et l'aluminium sont de type 1 : 2 et 1 : 3, et la quantité d'aluminium restant libre en solution est faible. D'après les résultats obtenus dans le chapitre II, on peut estimer que la concentration en aluminium (III) est de l'ordre de $8 \cdot 10^{-6} \text{M}$. Le pH est maintenu à 6,5 et les spectres ont été enregistrés après 60 minutes de repos, pour atteindre un état d'équilibre.

Les Figure 59 et 60 représentent l'évolution du mélange acide humique – acide caféique après l'ajout d'aluminium. Sur les deux enregistrements (spectres synchrones à 50 et 112 nm), on remarque une diminution d'intensité à la fois des bandes de l'acide humique et de l'acide caféique. En comparant ces résultats à ceux obtenus lors de la complexation de l'aluminium par l'acide caféique d'une part et par l'acide humique d'autre part, il est évident que l'aluminium est complexé par les deux entités. Si la complexation avec l'acide caféique semble immédiate, l'interaction avec l'acide humique n'atteint un état d'équilibre qu'après une heure de repos.

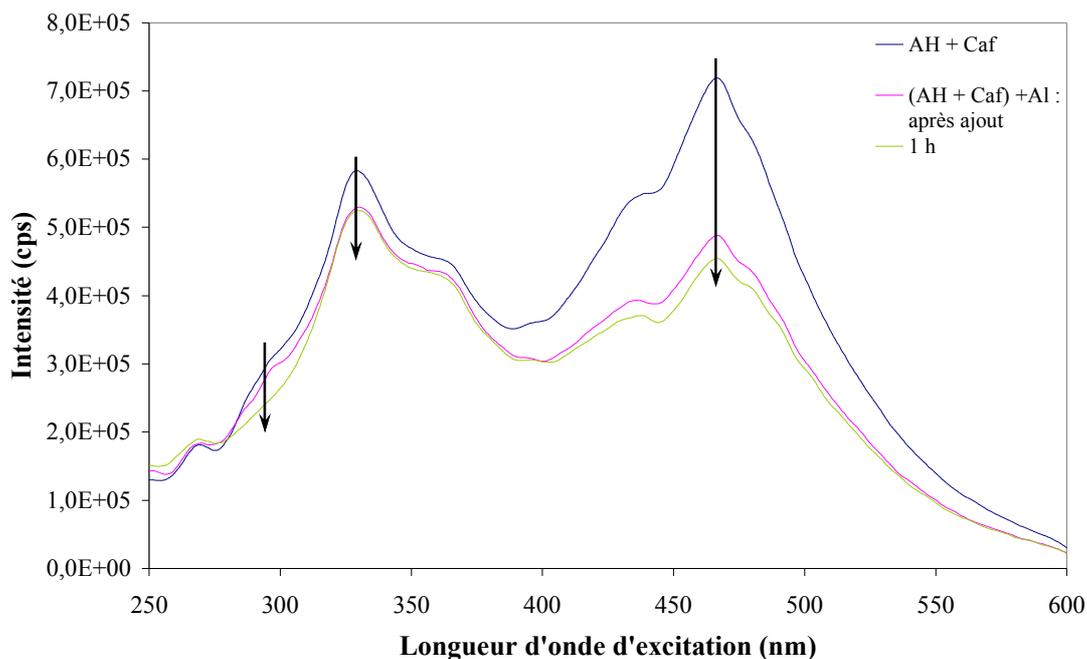


Figure 59 : Evolution en fonction du temps du spectre synchrone (offset de 50 nm) du mélange d'acide humique (10 mg/L) et d'acide caféique ($2 \cdot 10^{-5} \text{M}$) après l'ajout d'aluminium (III) (10^{-5}M).

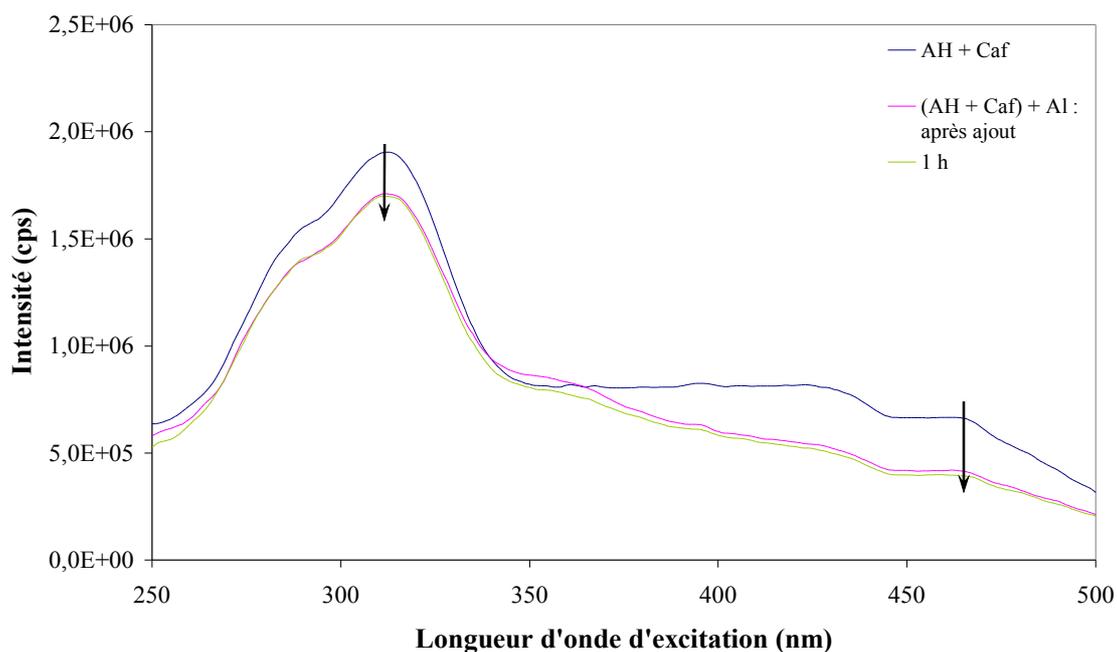


Figure 60 : Evolution en fonction du temps du spectre synchrone (offset de 112 nm) du mélange d'acide humique (10 mg/L) et d'acide caféique ($2 \cdot 10^{-5} \text{M}$) après l'ajout d'aluminium (III) (10^{-5}M).

Une analyse plus fine des extinctions obtenues par la complexation, peut nous permettre d'estimer la répartition de l'aluminium entre les deux entités complexantes. Dans le Tableau 11,

nous avons reporté les valeurs de $\left(1 - \frac{I_X - I_{X-Al}}{I_X}\right)$ mesurées pour certaines longueurs d'onde caractéristiques des deux espèces, où X représente l'acide caféique ou l'acide humique. Cette valeur permet de mesurer le taux d'extinction de fluorescence et ainsi d'estimer approximativement le taux de molécules complexées.

| | | 50 nm | | | |
|-----|-----------------------------|---------|----------|-----------------|--------------------|
| nm | Caractéristique de l'espèce | AH + Al | Caf + Al | (AH + Caf) + Al | Interaction AH/Caf |
| 330 | Caf | 0,97 | 0,70 | 0,90 | 0,73 |
| 467 | AH | 0,65 | 0,99 | 0,63 | 0,96 |

Tableau 11 : $\left(\frac{I_{X-Al}}{I_X}\right)$ pour des bandes de l'acide humique et de l'acide caféique en présence d'aluminium.

| | | 112 nm | | | |
|-----|-----------------------------|---------|----------|-----------------|--------------------|
| nm | Caractéristique de l'espèce | AH + Al | Caf + Al | (AH + Caf) + Al | Interaction AH/Caf |
| 288 | Caf | 0,91 | 0,76 | 0,91 | 0,75 |
| 313 | Caf | 0,90 | 0,76 | 0,89 | 0,77 |
| 466 | AH | 0,61 | / | 0,60 | 0,97 |

Tableau 11 suite : $\left(\frac{I_{X-Al}}{I_X}\right)$ pour des bandes de l'acide humique et de l'acide caféique en présence d'aluminium.

Pour l'acide humique, le taux de complexation semble analogue quand il est seul ou associé à l'acide caféique (0,65/0,63 et 0,61/0,60). Pour l'acide caféique, les extinctions mesurées en présence d'acide humique (intensités relatives voisines de 0,90), sont très inférieures à celles obtenues pour l'acide caféique seul (intensités relatives de 0,70 et 0,76). Ceci semblerait indiquer que la complexation de l'aluminium par l'acide caféique n'est que partielle par rapport à celle obtenue en présence d'acide caféique seul. Cependant les interactions entre l'acide caféique et l'acide humique, qui modifient de manière significative l'intensité des bandes de fluorescence montrent que ces interactions diminuent le pouvoir complexant de l'acide caféique vis-à-vis de l'aluminium (III).

Dans la dernière colonne du tableau, on peut vérifier la constatation faite préalablement, à savoir que les interactions acide caféique – acide humique perturbent beaucoup plus les intensités de fluorescence de l'acide caféique que celles de l'acide humique.

L'évolution du spectre d'un complexe acide humique – aluminium après un ajout d'acide caféique avec un offset de 50 et 112 nm (Figure 61 et 62 respectivement), montre, dès l'addition d'acide caféique, une très faible diminution des bandes caractéristiques de l'acide humique. Les interactions entre ces deux entités, peuvent expliquer cette évolution. Si on laisse le mélange se stabiliser pendant une heure, le massif caractéristique de l'acide humique augmente très légèrement et la bande caractéristique de l'acide caféique diminue. Ces évolutions semblent montrer (i) que l'aluminium est complexé par l'acide caféique et (ii) qu'une très légère fraction du complexe aluminium - acide humique disparaît. Il ne nous est pas possible, à ce stade de l'étude, de caractériser la nature exacte de cet échange à savoir un passage direct des ions aluminium de l'acide humique vers l'acide caféique ou une complexation de l'aluminium libre en solution qui modifierait les conditions d'équilibre, et déplacerait l'équilibre entre l'acide humique et son complexe vers une décomplexation.

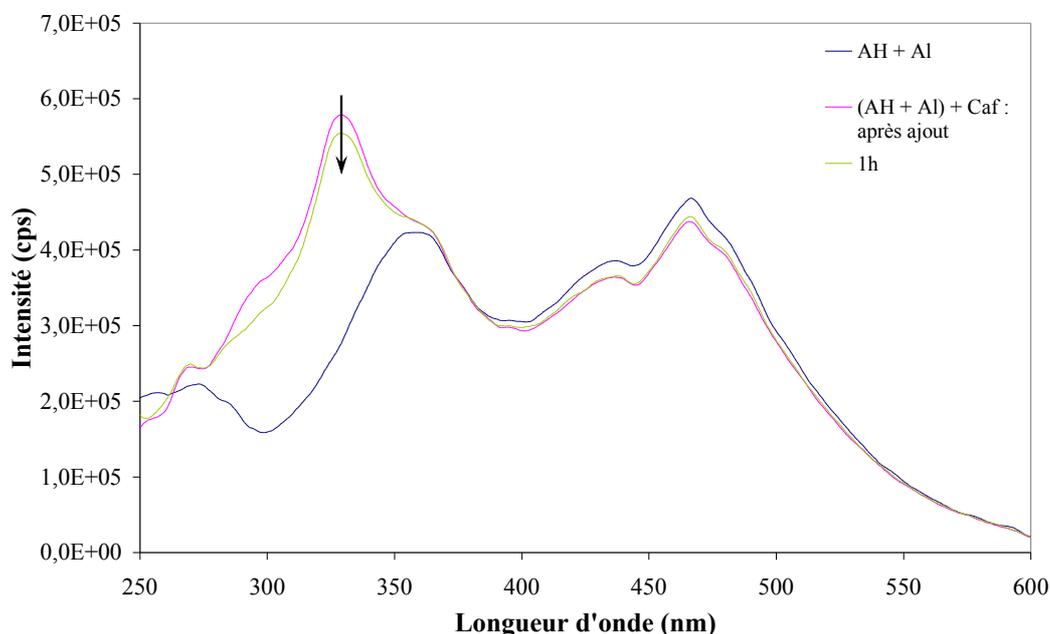


Figure 61 : Evolution en fonction du temps du spectre synchrone (offset de 50 nm) du complexe aluminium (III) - acide humique après l'ajout d'acide caféique.

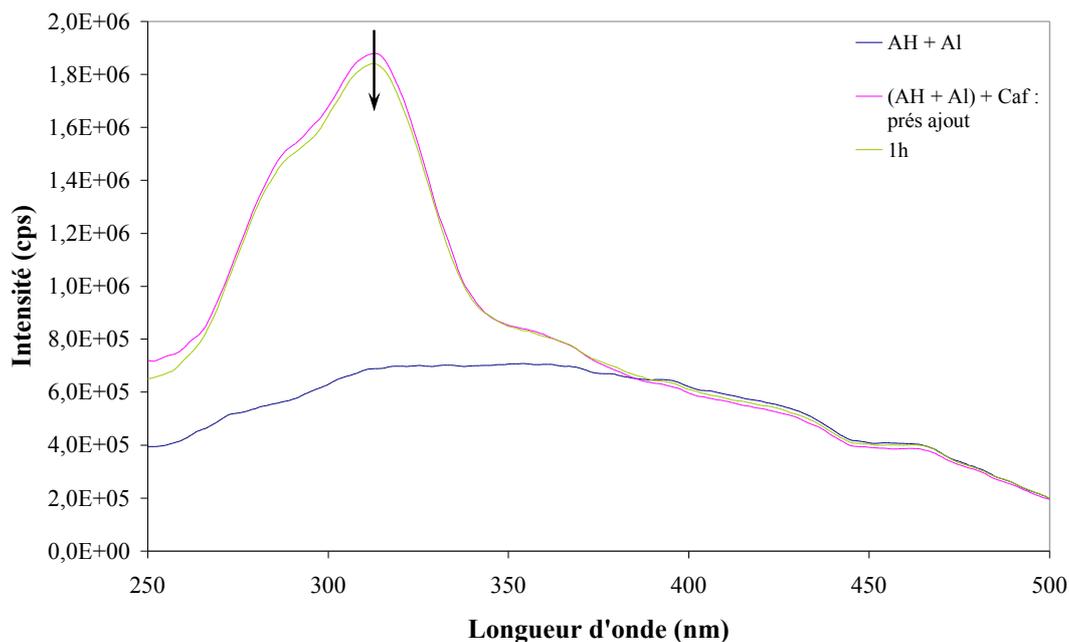


Figure 62 : Evolution en fonction du temps du spectre synchrone (offset de 112 nm) du complexe aluminium (III) - acide humique après l'ajout d'acide caféique.

Pour l'évolution du spectre du complexe aluminium (III) – acide caféique après l'ajout d'acide humique, la comparaison des spectres enregistrés juste après addition d'acide humique et après une heure de repos montre, sur le spectre enregistré avec un offset de 50 nm (Figure 63), une diminution significative du massif caractéristique de l'acide humique et une augmentation de la bande à 330 nm de l'acide caféique. Sur le spectre enregistré avec un offset de 112 nm (Figure 64), on observe également une diminution du massif de l'acide humique mais l'augmentation attendue pour la bande à 313 nm de l'acide caféique est sans doute compensée par la diminution générale du spectre de l'acide humique. Une diminution d'intensité est également visible vers 350 nm, elle peut s'expliquer par une diminution à la fois des bandes de l'acide humique et du complexe aluminium - acide caféique. L'ensemble de ces évolutions montre donc que l'acide humique peut complexer l'aluminium et déplacer de manière significative l'équilibre de formation du complexe aluminium – acide caféique.

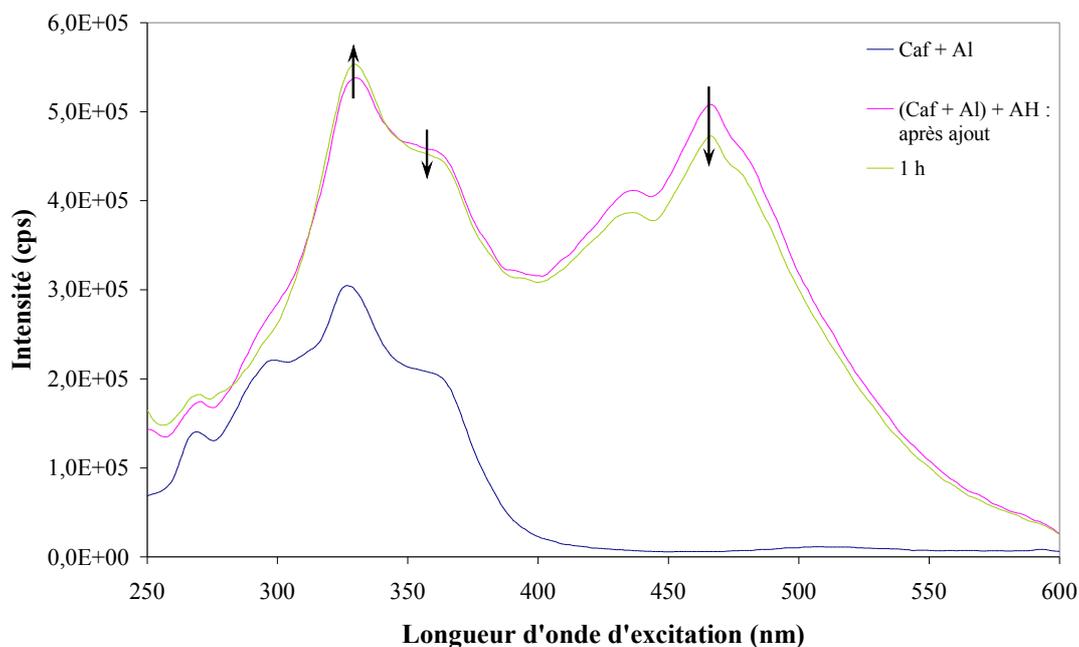


Figure 63 : Evolution en fonction du temps du spectre synchrone (offset de 50 nm) du complexe aluminium (III) - acide caféique après l'ajout d'acide humique.

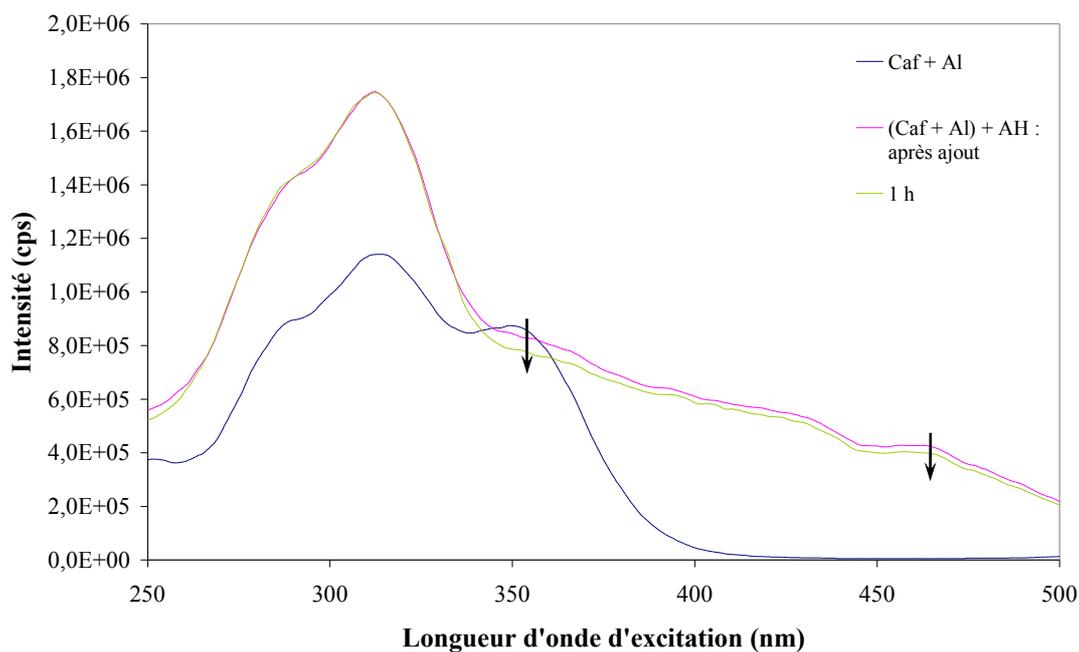


Figure 64 : Evolution en fonction du temps du spectre synchrone (offset de 112 nm) du complexe aluminium (III) - acide caféique après l'ajout d'acide humique.

Ces différentes expériences ont donc mis en évidence une répartition de l'aluminium entre l'acide caféique et l'acide humique. Cependant les intensités de ces évolutions sont en accord avec une plus grande affinité de l'ion métallique pour la macromolécule que pour la petite molécule.

Afin de savoir si les processus de complexation pour les différentes expériences amènent au même état d'équilibre entre l'acide humique, l'acide caféique et l'aluminium(III), nous avons comparé les spectres obtenus au bout d'une heure d'équilibre (Figures 65 et 66). On constate une très grande similitude entre les spectres des expériences (AH + Caf) + Al et (Caf + Al) + AH, alors que l'intensité du spectre (AH + Al) + Caf est légèrement inférieure au niveau du massif de l'acide humique et supérieure au niveau des bandes de l'acide caféique. Dans cette dernière expérience, nous n'avons donc pas atteint le même degré de complexation des différentes entités que celui obtenu dans les autres expériences. Cette constatation confirme que l'aluminium reste plus facilement complexé à l'acide humique qu'à l'acide caféique. A cause d'une dégradation partielle de la molécule d'acide caféique, mise en évidence par une diminution de l'intensité de l'épaule vers 300nm, il ne nous a pas été possible d'observer le spectre du stade final de l'équilibre.

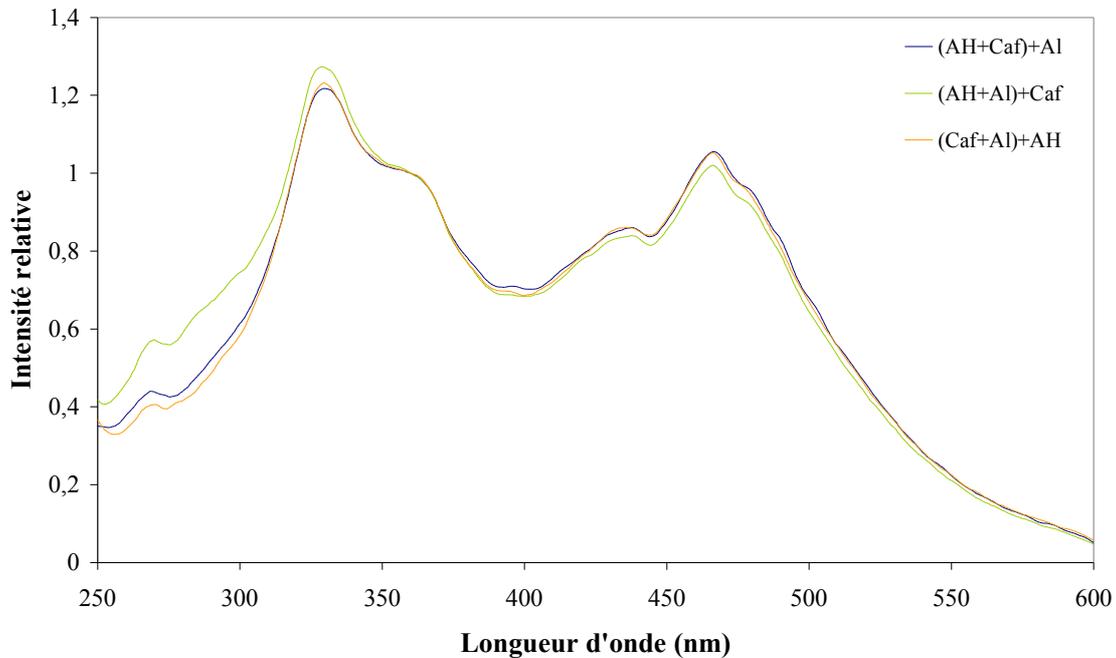


Figure 65 : Spectres de fluorescence synchrone (offset de 50 nm) des différents systèmes obtenus après 1 heure de repos.

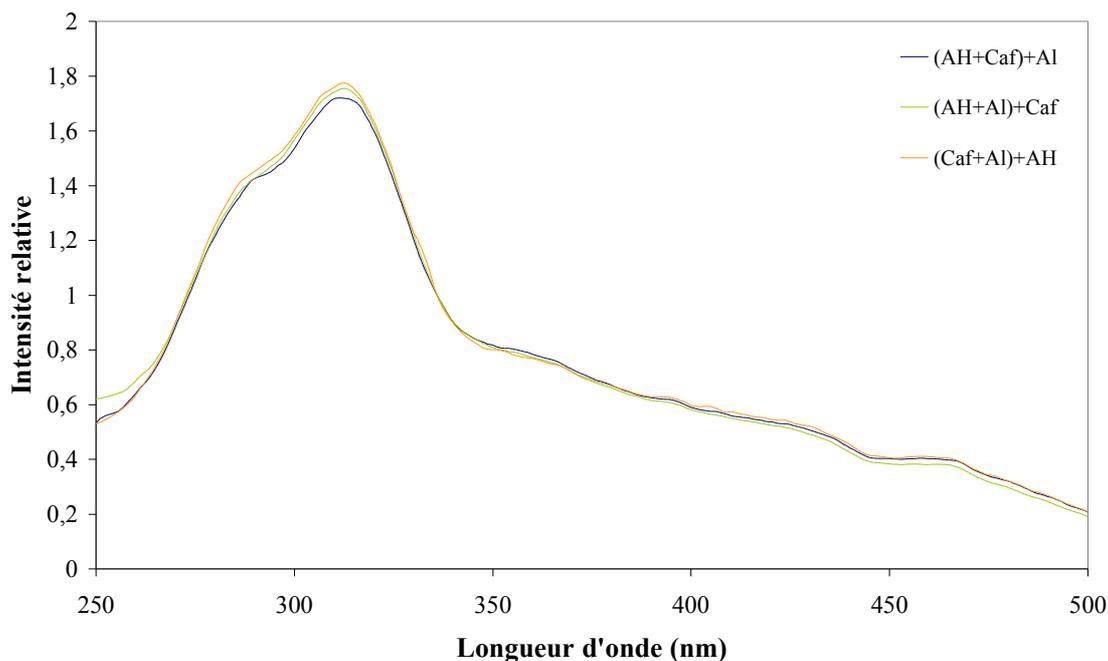


Figure 66 : Spectres de fluorescence synchrone (offset de 112 nm) des différents systèmes obtenus après 1 heure de repos.

Nous avons donc montré qu'il existe une compétition entre l'acide humique et l'acide caféique vis-à-vis de la complexation de l'aluminium (III) en solution aqueuse à pH = 6,5. Cependant, cette compétition semble très nettement favorable à l'acide humique qui présente un pouvoir complexant supérieur à celui de l'acide caféique. Ainsi dans les milieux naturels avec des conditions physico-chimiques proches de celles utilisées dans cette étude, il apparaît difficile qu'une molécule telle que l'acide caféique puisse capter et extraire en grande quantité les ions métalliques aluminium piégés par les substances humiques. Cependant, on peut envisager que la présence de petites molécules organiques perturbe le comportement de l'acide humique vis-à-vis des espèces métalliques en solution. On ne peut également pas exclure la formation de complexes ternaires acide caféique – acide humique – aluminium qui serait potentiellement favorisée par l'interaction entre les deux acides.

CONCLUSION

L'acide caféique est une molécule de choix, représentative des acides humiques. En effet, cette molécule est précurseur des substances humiques et par conséquent présente des fonctions chimiques analogues à celles rencontrées dans les macromolécules qui constituent l'essentiel de la matière organique des sols.

L'étude de la complexation de l'aluminium (III) par l'acide caféique contribue à une meilleure compréhension des interactions entre les métaux et les substances humiques dans le milieu naturel.

De plus, des petites molécules comme l'acide caféique sont également présentes dans la matière organique des sols et peuvent contribuer à la fixation et au transport des métaux dans les sols. Il est donc intéressant de connaître le comportement d'un ion métallique face à la compétition entre l'acide humique et l'acide caféique.

L'étude par les spectroscopies d'absorption UV-visible et de fluorescence de la complexation de l'aluminium (III) par l'acide caféique a mis en évidence la formation de cinq complexes à pH 5 (1 :6, 1 :3, 1 :2, 1 :1 et 2 :1) et de trois espèces à pH 6,5 (1 :6, 1 :3 et 1 :2). On constate qu'une augmentation de pH favorise la formation de complexes de haute stœchiométrie. Seules les constantes de stabilité des espèces majoritaires (1 :2, 1 :1 et 2 :1 à pH 5 et 1 :3 et 1 :2 à pH 6,5) ont pu être déterminées. La constante calculée pour chaque espèce est du même ordre de grandeur quelle que soit la technique spectroscopique employée.

Lors de ce travail, nous avons eu la confirmation que la fonction catéchol est le site préférentiel de complexation de l'aluminium sur l'acide caféique. Un gros excès d'aluminium doit être ajouté pour commencer à observer la complexation sur le groupement acide carboxylique.

Ne donnant pas de réponse exploitable par spectroscopie d'absorption UV-visible, l'étude de l'acide humique s'est effectuée par spectroscopie de fluorescence synchrone. Lors de la

complexation de l'aluminium (III) par l'acide humique, nous avons observé une extinction de l'intensité de fluorescence avec deux zones distinctes. Dans la première zone ($0 < [\text{Al}^{3+}] < 2 \cdot 10^{-5} \text{M}$), nous avons une extinction statique avec une constante de Stern Volmer d'environ $5 \cdot 10^4 \text{M}^{-1}$ (à $\lambda_{\text{ex}} = 467 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{em}} = 517 \text{ nm}$). Dans la seconde, pour des concentrations supérieures à $2 \cdot 10^{-5} \text{M}$, a lieu une extinction complète et rapide de la fluorescence de l'acide humique due à une agrégation de la macromolécule autour de l'aluminium.

La spectroscopie de fluorescence en mode synchrone a également permis l'observation d'une interaction entre l'acide caféique et l'acide humique. Lors de la complexation de l'aluminium par un mélange de ces deux acides, on observe une répartition de l'ion métallique entre les deux entités avec une préférence pour l'acide humique. Le milieu réactionnel tend vers un état quasi équilibré.

La fluorescence synchrone apparaît être une méthode de choix pour l'étude des interactions entre les ions métalliques et la matière organique des sols, de part sa sensibilité qui permet de diminuer les concentrations des espèces utilisées, sa sélectivité par le choix de l'offset de travail et enfin la linéarité du signal en fonction de la concentration permet d'effectuer des mesures quantitatives.

BIBLIOGRAPHIE

- [1]- F.J. Stevenson ; « Humus Chemistry Genesis, composition, reactions » *Second Edition*, ed : John Wiley & Sons, Inc; New York (1994)
- [2]- S.A. Waksman; « Humus »; ed : Williams and Wilkins; Baltimore (1932)
- [3]- G. Toscano, M. L. Colarieti et G. Greco, Jr. ; *Enzyme and Microbial Technology*, 33 {1} (2003) 47 – 54 ; « Oxidative polymerisation of phenols by a phenol oxidase from green olives »
- [4]- O. Milstein, A. Hüttermann, A. Majcherczyk, K. SchulzeRüdiger Fründ et H.-D. Lüdemann ; *Journal of Biotechnology*, 30 {1} (1993) 37-48 ; « Transformation of lignin-related compounds with laccase in organic solvents »
- [5]- C. Mai, W. Schormann, A. Hüttermann, R. Kappl et J. Hüttermann ; *Enzyme and Microbial Technology*, 30 {1} (2002) 66-72 ; « The influence of laccase on the chemo-enzymatic synthesis of lignin graft-copolymers »
- [6]- K. J. Kramer, M. R. Kanost, T. L. Hopkins, H. Jiang, Y. C. Zhu, R. Xu, J. L. Kerwin et F. Turecek ; *Tetrahedron*, 57 {2} (2001) 385-392 ; « Oxidative conjugation of catechols with proteins in insect skeletal systems »
- [7]- A. Leonowicz, A. Matuszewska, J. Luterek, D. Ziegenhagen, M. Wojta-Wasilewska, N.-S. Cho, M. Hofrichter et J. Rogalski ; *Fungal Genetics and Biology*, 27 {2-3} (1999) 175-185 ; « Biodegradation of Lignin by White Rot Fungi »
- [8]- D. Faure, M. L. Bouillant, C. Jacoud et R. Bally ; *Phytochemistry*, 42 {2} (1996) 357-359 ; « Phenolic derivatives related to lignin metabolism as substrates for *Azospirillum* laccase activity »
- [9]- S.I.F.S. Martins, W.M.F. Jongen et M.A.J.S. Van Boekel ; *trends in Food science & technology*, 11 (2001) 364 – 373 ; « A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling »
- [10]- M. K. Lee et I. Park ; *Food Chemistry*, 91 (2005) 57 – 61 ; « Inhibition of potato polyphenol oxidase by Maillard reaction products »
- [11]- A. Jokic, M. C. Wang, C. Liu, A. I. Frenkel et P. M. Huang ; *Organic Geochemistry*, 35 (2004) 747 – 762 ; « Integration of the polyphenol and Maillard reactions into a unified abiotic pathway for humification in nature : the role of γ -MnO₂ »
- [12]- S.I.F.S. Martins et M.A.J.S. Van Boekel ; *Food chemistry*, 90 (2005) 257 – 269 ; « a kinetic model for the glucose / glycine Maillard reaction pathways »
- [13]- D. Machiels et L. Istasse ; *Ann. Méd. Vét.*, 146 (2002) 347 – 352 ; « La réaction de Maillard : importance et applications en chimie des aliments »

- [14]- S.A. Jansen, M. Malaty, S. Nwabara, E. Johnson, E. Ghabbour, G. Davies et J.M. Varnum ; *Materials Science and Engineering, C4* (1996) 175-179 ; « Structural modeling in humic acids »
- [15]- T.M. Miano et N. Senesi ; *The Science of the Total Environment*, 117/118 (1992) 41-51 ; « Synchronous excitation fluorescence spectroscopy applied to soil humic substances chemistry »
- [16]- T.M. Miano, G. Sposito et J.P. Martin ; *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 52 (1988) 1016-1019 ; « Fluorescence spectroscopy of humic substances »
- [17]- Yu-hui Yang et De-he Zhang ; *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 26 {15&16} (1995) 2333-2349 ; « Concentration effect on the fluorescence spectra of humic substances »
- [18]- M.U. Kumke, C.H. Specht, T. Brinkmann et F.H. Frimmel ; *Chemosphere*, 45 (2001) 1023-1031 ; « Alkaline hydrolysis of humic substances – spectroscopic and chromatographic investigations »
- [19]- Yu-hui Yang et Ting Wang ; *Vibrational Spectroscopy*, 14 (1997) 105-112 ; « Fourier transform Raman spectroscopic characterization of humic substances »
- [20]- C. Steelink ; « Humic substances in soil, sediment and water », ed : Aiken G.R., MacKnight R.L., Wershaw R.L., MacCarthy P., Wiley New York, 1985
- [21]- M.P. Sauvant, D. Pepin et J. Guillot ; *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 44 (1999) 47-55 ; « Effects of Humic Substances and Phenolic Compounds on the *In Vitro* Toxicity of Aluminium »
- [22]- V.J. Johnson et R.P. Sharma ; *Neurotoxicology*, 24 {2} (Mars 2003) 261-268 ; « Aluminum Disrupts the Pro-Inflammatory Cytokine/Neurotrophin Balance in Primary Brain Rotation-Mediated Aggregate Cultures: Possible Role in Neurodegeneration »
- [23]- Gui-Wen Guo et You-Xin Liang ; *Brain Resarch*, 888 {2} (12 Janvier 2001) 221-226 ; « Aluminum-induced apoptosis in cultured astrocytes and its effect on calcium homeostasis »
- [24]- A.E. Martell, R.D. Hancock, R.M. Smith et R.J. Motekaitis ; *Coordination chemistry Reviews*, 149 (1996) 311-328 ; « Coordination of Al(III) in the environment and in biological systems »
- [25]- P. Rubini, A. Lakatos, D. Champmartin et T. Kiss ; *Coordination chemistry Reviews*, 228 (2002) 137-152 ; « Speciation and structural aspects of interactions of Al(III) with small biomolecules »
- [26]- K.M. Elkins et D.J. Nelson ; *Coordination Chemistry Reviews*, 228 (2002) 205-225 ; « Spectroscopic approaches to the study of the interaction of aluminum with humic substances »
- [27]- J.C.G. Esteves da Silva et A.A.S.C. Machado ; *Applied Spectroscopy*, 50 {4} (1996) 436-443 ; « Interaction of fulvic acids with Al(III) studied by self-modeling curve resolution of second-derivative synchronous fluorescence spectra »
- [28]- J.C.G. Esteves da Silva et A.A.S.C. Machado ; *Marine Chemistry*, 54 (1996) 293-302 ; « Characterization of the binding sites for Al(III) and Be(II) in a sample of marine fulvic acids »
- [29]- J.C.G. Esteves da Silva, M.A. Ferreira, A.A.S.C. Machado et F. Rey ; *Analytica Chimica Acta*, 333 (1996) 71-82 ; « Classification of binding sites for Al(III) in fulvic acids extracted from leaf litters and soils by synchronous fluorescence spectroscopy and multidimensional chemometric

analysis »

[30]- J.C.G. Esteves da Silva, A.A.S.C. Machado et C.J.S. Oliveira ; *Analytica Chimica Acta*, 349 (1997) 23-31 ; « Study of the interaction of Al(III) with a soil fulvic acid in the acid pH range by self-modeling mixture analysis of synchronous fluorescence spectral data »

[31]- C.S.C.O. Silva, J.C.G. Esteves da Silva et A.A.S.C. Machado ; *Applied Spectroscopy*, 48 {3} (1994) 363-372 ; « Evolving factor analysis of synchronous fluorescence spectra of fulvic acids in the presence of aluminium »

[32]- A.L.R. Sekaly, R. Mandal, N.M. Hassa, J. Murimboh, C.L. Chakrabarti, M.H. Back, D.C. Grégoire et W.H. Schroeder ; *Analytica Chimica Acta*, 402 (1999) 211- 221 ; « Effect of metal/fulvic acid mole ratios on the binding of Ni(II), Pb(II), Cu(II), Cd(II), and Al(III) by two well-characterized fulvic acids in aqueous model solutions »

[33]- J.C.G. Esteves da Silva et A.A.S.C. Machado ; *Analytical Letters*, 28 {13} (1995) 2401-2411 ; « Characterization of the acid-base properties of humic substance by chemometric analysis of synchronous fluorescence and pH potentiometric data »

[34]- B.A. Browne et C.T. Driscoll ; *Environ .Sci. Technol.*, 27 (1993) 915-922 ; « pH-dependent binding of aluminium by a fulvic acid »

[35]- J.C.G. Esteves da Silva, A.A.S.C. Machado, M.A. Ramos, F. Arce, F. Rey ; *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16 {9} (1997) 1845-1850 ; « Variation of the stability of complexes of Al(III) with a fulvic acid extracted from humic cambisol soil in the pH range three to five »

[36]- E. Tombacz, A. Dobos, M. Szekeres, H.D. Narres, E. Klumpp, I. Dekany ; *Colloid Polym. Sci.*, 278 (2000) 337-345 ; « Effect of pH and ionic strength on the interaction of humic acid with aluminium oxide »

[37]- J.P. Pinheiro, A.M. Mota et M.F. Benedetti ; *Environ. Sci. Technol.*, 34 (2000) 5137-5143 ; « Effect of aluminium competition on lead and cadmium binding to humic acids at variable ionic strength »

[38]- C.M. Sharpless et L.B. McGown ; *Environ. Sci. Technol.*, 33 (1999) 3264-3270 ; « Effects of aluminium-induced aggregation on the fluorescence of humic substances »

[39]- S.L. Hemmingsen et L.B. McGown ; *Applied Spectroscopy*, 51 {7} (1997) 921-929 ; « Phase-resolved fluorescence spectral and lifetime characterization of commercial humic substances »

[40]- X.Lu, Z. Chen et X. Yang ; *Wat. Res.*, 33 {15} (1999) 3271-3280 ; « Spectroscopic study of aluminium speciation in removing humic substances by Al coagulation »

[41]- J. Luster, T. Lloyd, G. Sposito et I.V. Fry ; *Environ. Sci. Technol.*, 30 (1996) 1565-1574 ; « Multi-wavelength molecular fluorescence spectrometry for quantitative characterization of copper(II) and aluminium (III) complexation by dissolved organic matter »

[42]- D.S. Smith et J.R. Kramer ; *Environment International*, 25 {2/3} (1999) 295-306 ;

« Fluorescence analysis for multisite aluminium binding to natural organic matter »

[43]- G. Cathalifaud, J. Ayele et M. Mazet ; *Wat. Res.*, 31 {4} (1997) 689-698 ; « Etude de la complexation des ions aluminium par des molécules organiques: constantes et stoechiométrie des complexes. Application au traitement de potabilisation des eaux »

[44]- D.M. Reynolds et S.R. Ahmad ; *Wat.Res.*, 29 {9} (1995) 2214-2216 ; « The effect of metal ions on the fluorescence of sewage wastewater »

[45]- J.P. Martin et K. Haider ; *Soil Sci.*, 111 {1} (1971) 54-63

[46]- E. VanBesien et M.P.M. Marques ; *Journal of Molecular Structure (Teochem)*, XX (2003) 1-11 ; « Ab initio conformational study of caffeic acid »

[47]- F.J. Sikora et M.B. McBride ; *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 54 (1990) 78-86 ; « Aluminium complexation by protocatechuic and caffeic acids as determined by UV spectrophotometry »

[48]- M.L. Adams, B. O'Sullivan, A.J. Downard et K.J. Powell ; *J. Chem. Eng. Data*, 47 (2002) 289-296 ; « Stability constants for aluminium(III) complexes with the 1,2-Dihydroxyaryl ligands caffeic acid, chlorogenic acid, DHB, and DASA in aqueous solution »

[49]- Y. Bizri, M. Cromer, I. Lamy et J.P. Scharff ; *Analisis*, 13 {3} (1985) 128-133 ; « Complexation dans les systèmes organo-minéraux modèles (acide caféique et tiron) et naturels (substances humiques) »

[50]- A-C. Boudet, J-P. Cornard et J-C. Merlin ; *Spectrochimica Acta part A*, 56 (2000) 829-839 ; « Conformational and spectroscopic investigation of 3-hydroxyflavone-aluminium chelates »

[51]- A.M. Khvan, E.L. Kristallovich et Kh.A. Abduazimov ; *Chemistry of Natural Compounds*, 37 {1} (2001) 72-75 ; « Complexation of caffeic and ferulic acids by transition-metal ions »

[52]- S. Sanchez-Cortés et J.V. Garcia-Ramos ; *Applied Spectroscopy*, 54 {2} (2000) 230-238 ; « FT surface-enhanced Raman evidence of oxidative condensation reactions of caffeic acid in solution and on silver surface »

[53]- S. Deiana, C. Gessa, M. Marchetti et M. Usai ; *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 59 (1995) 1301-1307 ; « Phenolic acid redox properties: pH influence on iron (III) reduction by caffeic acid »

[54]- C. Gessa, S. Deiana, A. Premoli et A. Ciurli ; *Plant and Soil*, 190 (1997) 289-299 ; « Redox activity of caffeic acid towards iron (III) complexed in a polygalacturonate network »

[55]- Jiang Hong Chen et Chi-Tang Ho ; *J. Agric. Food Chem.*, 45 (1997) 2374-2378 ; « Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds »

[56]- F. Natella, M. Nardini, M. Di Felice et C. Scaccini ; *J. Agric. Food Chem.*, 47 (1999) 1453-1459 ; « Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants: structure-activity relation »

[57]- S. Sanchez-Cortés et J.V. Garcia-Ramos ; *Journal of Colloid and Interface Science*, 231 (2000) 98-106 ; « Adsorption and chemical modification of phenols on a silver surface »

[58]- G.W. Cheng et C.H. Crisosto ; *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 122 {1} (1997) 95-99 ; « Iron-polyphenol complex formation and skin discoloration in peaches and nectarines »

- [59]- A.L. Petrou, M.V. Koromantzou et J.M. Tsangaris ; *Chimica Chronica New Series*, 22 (1993) 189-204 ; « Coordination complexes of caffeic and ferulic acids with Cu(II), Ni(II), Co(II) and Fe(III) »
- [60]- P.W. Linder et A. Voyé ; *Polyhedron*, 6 {1} (1987) 53-60 ; « Potentiometric investigations of equilibria between caffeic acid and copper(II), zinc(II), iron (II) and hydrogen ions in aqueous solution »
- [61]- A. Oess, M.V. Cheshire, D.B. McPhail, S. Stoll, M. El Alaili et J-C. Vedy ; *The Science of the Total Environment*, 228 (1999) 49-58 ; « Elucidation of phemol-Cu interaction mechanisms by potentiometry, ESR, UV absorption spectroscopy and molecular simulations »
- [62]- T. Kiss, G. Nagy et M. Pécsi ; *Polyhedron*, 8 {19} (1989) 2345-2349 ; « Complexes of 3,4-dihydroxyphenyl derivatives-X. Copper(II) complexes of chlorogenic acid and related compounds »
- [63]- B. Valeur ; « Molecular Fluorescence, Principles and Applications » ; ed : Wiley – VCH (2002)
- [64]- F. Monteil – Rivera et J. Dumonceau ; *Anal. Bioanal. Chem.*, 374 (2002) 1105-1112 ; « Fluorescence spectrometry for quantitative characterization of cobalt(II) complexation by Leonardite humic acid »
- [65]- S.E. Cabaniss ; *Environ. Sci. Technol.*, 26 {6} (1992) 1133-1139 ; « Synchronous fluorescence spectra of metal-fulvic acid complexes »
- [66]- A.A.S.C. Machado et J.C.G. Esteves da Silva ; *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 19 (1993) 155-167 ; « Factor analysis of molecular fluorescence data of marine and soil fulvic acids »
- [67]- J.C.G. Esteves da Silva et A.A.S.C. Machado ; *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 27 (1995) 115-128 ; « Evolving factor analysis of synchronous fluorescence spectra of humic substances in the presence of Cu(II) »
- [68]- A.T. Lombardi et W.F. Jardim ; *J. Braz. Chem. Soc.*, 8 {4} (1997) 339-342 ; « Synchronous-scan fluorescence and the complexation of copper(II) ions by humic substances »
- [69]- S. Cocks, P.W. Linder et A. Voyé ; *J. Coord. Chem.*, 25 (1992) 211-220 ; « Potentiometric investigations of equilibria between caffeic acid and manganese(II), cobalt (II), nickel(II) and cadmium(II) ions in aqueous solutions »
- [70]- P. Gossart ; « Contribution à l'étude des interactions de la matière organique des sols avec les métaux lourds. Etude structurale et analytique de molécules modèles », Thèse à l'Université des Sciences et Technologies de Lille (USTL) (2001)
- [71]- G. J. Smith et T. G. Haskell ; *J. Photochem. Photobiol. B : Biol.*, 55 (2000) 103 – 108 ; « The fluorescent oxidation products of dihydroxyphenylalanine and its esters »

[72]- N. Kerry et C. Rice – Evans ; *FEBS Letters*, 437 (1998) 167 – 171 ; « Peroxynitrite oxidises catechols to *o*-quinones »

[73]- J. Chen, E. J. LeBoeuf, S. Dai et B. Gu ; *Chemospher*, 50 (2003) 639 – 647 ; « Fluorescence spectroscopic studies of natural organic matter fractions »