



## Synthesis of new phenolics products from R-(-)-carvone and the study of their impacts on some fungal decay of apple in post-harvest

A. OUBAIR<sup>1</sup>, R. FIHI<sup>1</sup>, H. MAZOUZ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire des substances naturelles & synthèse et dynamique moléculaire, Faculté des sciences et techniques Errachidia, Université Moulay Smail Meknès Maroc.

<sup>2</sup>Laboratoire de Biotechnologies Végétales & Biologie Moléculaire, Faculté des Sciences Meknès, Université Moulay Smail Meknès Maroc.

\*Auteur Correspondent. E-mail: [oubair\\_hmad@yahoo.fr](mailto:oubair_hmad@yahoo.fr)

### Abstract

In this study, we were interested, first, in the synthesis of new phenolics compounds from a natural substance R-(-)-carvone and second, the study their impact on the mycelial growth of the three fungal strains (*Penicillium expansum*, *Alternaria sp* and *Rhizopus stolonifer*), isolated from rotten apples in post-harvest. These diphenols compounds are obtained by condensation of the R-(-)-carvone with arylaldehyde in the presence of p-toluene sulfonic acid and reflux during 24h. The structures of these new compounds were identified by the usual spectral methods <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR and IR. Furthermore, an X-ray cristalographic study was carried out on the single crystal of the product 2,2'-diméthyl-5,5'-dipropan-2-yl-4,4'-(phénylméthylène)diphénol **3a**.

Keywords: R-(-)-carvone, arylaldehyde, *Penicillium expansum*, *Alternariat sp*, *Rhozopus stolonifer*, apple.

## Synthèse de nouveaux produits phénoliques à partir de la R-(-)-carvone et l'étude de leurs impacts sur certains champignons responsables de la pourriture de la pomme en post-récolte

### Résumé

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés, dans un premier temps, à la synthèse de nouveaux composés phénoliques à partir d'une substance naturelle la R-(-)-carvone et dans un second temps, à l'étude de leurs impacts sur la croissance mycélienne de trois souches fongiques (*Penicillium expansum*, *Alternariat sp* et *Rhozopus stolonifer*), isolées des pommes pourries en post-récolte. Ces composés diphenoliques sont obtenus par condensation de la R-(-)-carvone avec l'arylaldehyde en présence de l'acide p-toluène sulfonique (APTS) et à reflux pendant 24h. Les structures de ces nouveaux composés sont identifiées à l'aide des analyses spectroscopiques usuelles à savoir RMN <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C et IR. Par ailleurs, une étude radiocristallographique a été réalisée sur le monocristal du produit 2,2'-diméthyl-5,5'-dipropan-2-yl-4,4'-(phénylméthylène)diphénol **3a**.

Mots clés : R-(-)-carvone, arylaldehyde, *Penicillium expansum*, *Alternariat sp*, *Rhozopus stolonifer*, pomme

### 1. Introduction

Les polyphénols contiennent au moins un groupe hydroxyphénolique relié directement au composé aromatique à anneau phénolique à base de carbone. Cette structure leur confère la capacité de piéger les radicaux libres. D'après la littérature, des études ont montré que l'activité antimicrobienne des composés phénoliques (carvacrol, thymol, eugénol) peut être attribuée à la présence d'un noyau aromatique et d'un groupement hydroxyle OH, connus par leurs activités en engendrant des liaisons hydrogènes avec le groupe -SH dans les sites actifs des enzymes dans les champignons [1, 5]. Les terpènes phénoliques agissent aussi en se fixant sur les groupes amines et hydroxylamines des protéines membranaires de la cellule microbienne en provoquant

l'altération de la perméabilité et la fuite de contenus intracellulaires [6, 7]. L'importance du groupement hydroxyle des phénols a été confirmée par la faible activité qui a été observée avec des composés contenant uniquement un cycle aromatique substitué par des groupements alkyles tel que le p-cymène [8]. Il est à noter que l'importance du noyau aromatique dans ce type de composés a été démontrée par l'absence d'activité de menthol [5].

Les polyphénols constituent une grande classe de substances présentes dans le règne végétal. Ils existent sous forme de molécules monomères et de polymères condensés et sont synthétisés par les végétaux en réponse à un stress environnemental comme les rayons ultra-violet ou encore certains champignons pathogènes.

Les métabolites secondaires dont fait partie les composés phénoliques contiennent des substances très recherchées par les industries des cosmétiques, de la pharmacie et de la phytothérapie [9]. De nombreuses substances naturelles contenant les polyphénols, présentent des propriétés antioxydantes [10] et antibactériennes contre *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger* et *Penicillium digitatum* [11, 16]. Ainsi des études ont montré que les composés phénoliques sont utilisés pour l'amélioration de la production agricole [17].

C'est dans ce contexte, que nous nous sommes intéressés à la synthèse de nouveaux composés phénoliques à partir d'une substance naturelle très abondante la R-(-)-carvone et d'explorer leurs activité antifongique vis-à-vis de certains champignons responsable de la pourriture de la pomme dans les entrepôts de stockage.

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Synthèse des composés phénoliques [2,2'-diméthyl-5,5'-dipropane-2-yl-4,4'-(arylméthylène)diphénol] **3a-c**

Dans un ballon surmonté d'appareil de Daen-stark, on mélange dans 60 cm<sup>3</sup> de toluène 3g (0,02 mol) de la R-(-)-carvone, 1,06g (0.01 mol) de l'arylaldéhyde et 0,24g (0,001 mol) de l'acide p-toluène sulfonique. Le mélange réactionnel est porté à reflux pendant 24h. La réaction se manifeste par l'apparition d'une couleur rouge. Après avoir rincé le mélange réactionnel avec l'eau distillée, on récupère la phase organique. Après séchage par Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, on évapore le solvant et on purifie le produit obtenu par chromatographie sur colonne de gel de silice (éliant : hexane/dichlorométhane : 60/40). Les produits désirés **3a-c** sont récupérés avec des rendements de **3a**= 85%, **3b**= 82%, **3c**= 70% (Schéma1).

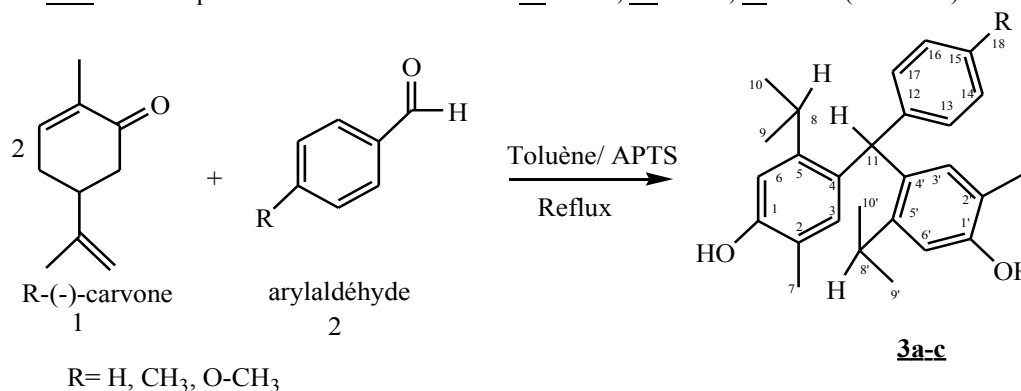


Schéma 1

Schéma 1: **3a**. R= H, **3b**. R= CH<sub>3</sub>, **3c**. R= O-CH<sub>3</sub>

### 2.2. Préparation des agents phythopathogènes ou (Isolement des souches fongiques)

Les isolats de *Penicillium expansum*, *Alternariat sp* et *Rhizopus stolonifer* dans cette étude ont été obtenus à partir des plants des pommes présentant des pourritures. Ces derniers sont prélevés des entrepôts de stockage. L'identification des espèces fongiques est basée sur plusieurs clés de détermination [18- 21].

### 2.3. Activité antifongique des [2,2'-diméthyl-5,5'-dipropane-2-yl-4,4'-(arylméthylène)diphénol] **3a-c** vis-à-vis des trois souches de champignons *P. expansum*, *Alternariat sp.* et *R. stolonifer*.

L'activité antifongique a été étudiée par la méthode de contact direct dans le milieu de culture PDA [22, 23]. Cette technique consiste à placer un disque mycélien (2mm de diamètre) au centre d'une boîte de Pétri contenant le milieu PDA mélangé avec le produit phénolique à tester qui est solubilisé dans DMSO (à 0.05 % dans de l'eau distillée stérilisée). Trois concentrations en produits phénoliques ont été testé (10<sup>-2</sup> mol/l, 10<sup>-3</sup> mol/l et 10<sup>-4</sup> mol/l comme concentration minimale).

L'incubation est réalisée à 25°C pendant sept jours. Des notations concernant l'inhibition de la croissance du diamètre de la colonie *P. expansum*, *Alternariat sp.* et *R. stolonifer* par le produit phénolique incorporé dans le milieu de culture sont effectuées chaque jour.

Le témoin est formé par superposition de deux boîtes, l'une contenant le milieu PDA et le produit phénolique, alors que l'autre ne contient que le milieu PDA (figure 2).

La mesure du diamètre moyen des colonies traitées est réalisée lorsque les filaments mycéliens atteignent la périphérie de la boîte dans les lots témoins.

L'évaluation de l'inhibition est estimée par le calcul du pourcentage d'inhibition de la croissance mycelienne selon la formule suivante :  $I (\%) = [(D_1 - D_2)/D_1] \times 100$

Avec  $D_1$  : le diamètre de la colonie sur le milieu de culture sans produit et  $D_2$  : le diamètre de la colonie sur le milieu de culture avec produit [24].

### 3. Résultats et discussions

#### 3.1. Identification des produits synthétisés

Avant d'entamer l'étude biologique, nous avons synthétisé une série des composés diphenoliques par condensation de la R(-)-carvone avec une série d'arylaldehydes. Ce protocole opératoire nous a donné des nouveaux composés diphenoliques **3a-c** avec des rendements remarquables.

Les structures de ces nouveaux composés ont été établies sur la base de leurs données spectroscopiques à savoir : la RMN du proton, du  $^{13}\text{C}$  et infra-rouge ainsi par une étude radiocristallographique réalisée sur le monocristal du composé **3a** (figure 1).

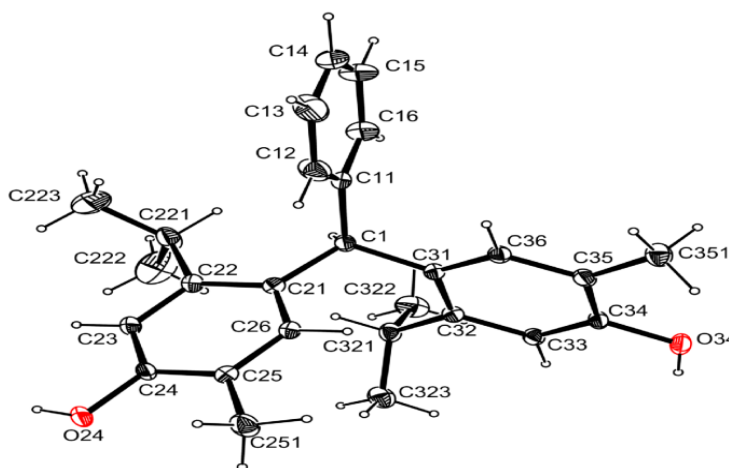


Figure 1: Structure moléculaire donnée par le monocristal du produit [25] **3a**

#### 3.1.1. Identification du produit 2,2'-diméthyl-5,5'-dipropan-2-yl-4,4'-(phénylméthylène)diphénol ( $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{O}_2$ )

##### **3a**

Rdt = 85%, Pf = 202°C, Couleur : Jaune claire.

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (en ppm) : 1.00 – 1.03 (m, 12H,  $^{9-10-9'-10'}$ CH<sub>3</sub>); 2.08 (s, 6H,  $^{7-7'}$ CH<sub>3</sub>); 2.99 - 3.04 (m, 2H,  $^{8-8'}$ CH); 4.53 (s, 2H,  $^{1-1'}$ OH); 5.81 (s, 1H,  $^{11}$ CH); 6.43 - 7.26 (m, 9H, CH aromatiques).

RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (en ppm) : 15.8 – 23.9 – 24.4 – 28.7 – 47.9 (C saturés); 112.6 – 120.3 – 126.2 – 128.4 – 130.0 – 132.7 – 133.7 – 145.5 – 146.4 – 152.7 (C aromatiques).

IR (KBr), ( $\nu$  en  $\text{cm}^{-1}$ ) : 3397 (O-H); 3030 ( $\text{C}_{\text{sp}^2}\text{-H}$ ); 2960 ( $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$ ); 1645 et 1588 ( $\text{C}_{\text{sp}^2}\text{-C}_{\text{sp}^2}$  aromatiques) ; 1027(C-O).

#### 3.1.2. Identification du produit 2,2'-diméthyl-5,5'-dipropan-2-yl-4,4'-(p-tolylméthylène)diphénol ( $\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{O}_2$ )

##### **3b**

Rdt = 82%, Pf = 190°C, Couleur : Jaune claire

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (en ppm) : 0.9 – 1.06 (m, 12H,  $^{9-10-9'-10'}$ CH $_3$ ); 2.0 (s, 6H,  $^{7-7'}$ CH $_3$ ); 2.25 (s, 3H,  $^{18}$ CH $_3$ ); 3.6 - 3.73 (m, 2H,  $^{8-8'}$ CH); 4.75 (s, 2H,  $^{1-1'}$ OH); 5.73 (s, 1H,  $^{11}$ CH); 6.4 - 7.0 (m, 8H, CH aromatiques).  
RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (en ppm) : (15.50 – 23.58 – 24.09 – 28.31 – 49.10 – 58.0 (C saturés); 112.23 – 120.40 – 128.79 – 129.49 – 132.33 – 133.61 -135.1 – 141.95 – 146.01 – 152.30 (C aromatiques).  
IR (KBr), ( $\nu$  en  $\text{cm}^{-1}$ ) : 3466 (O-H); 2960 ( $\text{C}_{\text{sp}^3}$ -H); 1618 et 1508 ( $\text{C}_{\text{sp}^2}$ - $\text{C}_{\text{sp}^2}$  aromatiques); 1027(C-O).

### 3.1.3. Identification du produit 2,2'-diméthyl-5,5'-dipropan-2-yl-4,4'-(p-méthoxy phényl méthylène)diphénol ( $\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{O}_3$ ) **3c**

Rdt = 70%, Pf = 240°C, Couleur : Jaune claire

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (en ppm) : 1.05 - 1.13 (m, 12H,  $^{9-10-9'-10'}$ CH $_3$ ); 2.11 (s, 6H,  $^{7-7'}$ CH $_3$ ); 3.05 - 3.2 (m, 2H,  $^{8-8'}$ CH); 3.85 (s, 3H,  $^{18}$ CH $_3$ ); 4.59 (s, 1H,  $^{11}$ CH); 5.82 (s, 2H,  $^{1-1'}$ OH); 6.49 - 7.40 (m, 8H, CH aromatiques).

RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (en ppm) : 15.50 – 23.58 – 24.09 – 28.31 – 47.10 – 58.59 (C saturés); 112.23 – 120.40 – 128.79 – 129.49 – 132.33 – 133.61 – 135.22 – 141.95 – 146.01 - 152,30 (C aromatiques).

IR (KBr), ( $\nu$  en  $\text{cm}^{-1}$ ) : 3382 (O-H); 2965 ( $\text{C}_{\text{sp}^3}$ -H); 1603, 1507 et 1407 ( $\text{C}_{\text{sp}^2}$ - $\text{C}_{\text{sp}^2}$  aromatiques).

### 3.2. L'impacte des nouveaux produits phénoliques sur les trois souches de champignons

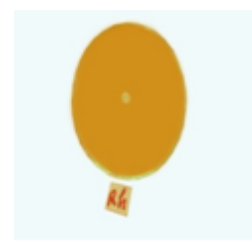
Les résultats obtenus dans la présente étude montrent bien que la série des produits [2,2'-diméthyl-5,5'-dipropan-2-yl-4,4'-(arylméthylène)diphénol] **3a-c** est dotée d'une activité antifongique efficace sur la croissance mycélienne des trois phytopathogènes testés *P. expansum*, *Alternaria sp.* et *R. stolonifer*, dont le pourcentage d'inhibition atteint 100% même à faible concentration  $10^{-4}$ mol/l. Cette efficacité est due à la structure moléculaire phénolique caractérisant ces nouveaux produits (figure 2, 3).



**Figure 2:** Croissance mycélienne des trois phytopathogènes sans incorporation du produit à étudier après sept jours d'incubation (Témoin)



**Figure 3: a)** Effet des produits **3a** ( $10^{-4}$ mol/l) sur le développement des trois souches de champignons après sept jours d'incubation



b) Effet des produits **3b** ( $10^{-4}$  mol/l) sur le développement des trois souches de champignons après sept jours d'incubation



c) Effet des produits **3c** ( $10^{-4}$  mol/l) sur le développement des trois souches de champignons après sept jours d'incubation

Un bon nombre d'auteurs ont rapporté l'effet antifongique des composés phénoliques. En effet, Il a été rapporté que la croissance mycélienne des quatre pathogènes de la pomme, nommés *Vagabundaphlyctema*, *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea* et *Moniliniafructigena*, ont été complètement inhibés quand ils sont exposés à 150  $\mu$ l/l d'eugénol à différentes températures [26]. Des études antérieures ont montré que, le carvacrol est utilisé comme agent de protection contre : les champignons phytopathogènes, les microorganismes attaquant les denrées alimentaires et il est utilisé comme antiseptique et antibactérien [27, 28].

## Conclusion

D'après les résultats de cette étude, on peut conclure, que les produits diphenoliques synthétisés à partir de la substance naturelle la R-(-)-carvone, présentent une activité inhibitrice très importante sur les trois souches de champignons attaquant la pomme dans les entrepôts de stockage à savoir *P. expansum*, *Alternariat sp.* et *R. stolonifer* dont le pourcentage d'inhibition atteint 100% à faible concentration  $10^{-4}$  mol/l.

Cette étude biologique, aura le mérite d'être sûrement une nouvelle piste de la lutte chimique contre les maladies fongiques de la pomme en post-récolte. Il reste à souhaiter que les travaux ultérieurs apporteront des précisions sur la toxicité et l'effet de ces produits sur la qualité du fruit (organoleptique, aspect, odeur...).

## Références

1. Lambert R. J. W., Skandamis P. N., Coote P. J., Nychas G. J. E., *J. appl. microbiology*. 91(3) (2001) 453.
2. Tripathi P., Dubey N. K., Banerji R., Chansouria J. P. N., *Rev. Post harvest biology and Technology*. 32 (2004) 235.
3. Carson C. F., Mee B. J., Riley T. V., *Antimicrob Agents Chemother*. 46 (2002) 1914.
4. Inouye S., Yamaguchi H., Takizawa T., *J. Infect. Chemother*. 7(4) (2001) 251.
5. Ultee A., Bennik M. H. J., Mozelaar R., *Appl. Environ. Microbiol*. 68 (2002) 1561.
6. Ultee A., Kets E. P. W., Smid E. J., *Appl. Environ. Microbiol*. 56 (1999) 4606.
7. Lopez-Malo E. J., Alzamora S. M., Palou E., *Int. J. Food Microbiol*. 99 (2005) 119.
8. Dorman H. J. D., Deans S. G., *J. Appl. Microbiol*. 88 (2000) 308.
9. Gurib-Fakim A., *Mol. Aspects Med*. Vol 27 (2006) 1.

10. Farag R. S., Badei A. Z. M. A., Hewedi F. M., El-Baroty G. S. A., *J. Am. Oil Chem. Soc.* 66 (1989) 792.
11. Havsteen B. H., *J. Pharmacology & Therapeutics*. V 96 (2002) 67.
12. Sosa M. E., Toma C. E., *Phytochem Rev. DOI. 10. 1007/s11101-006-9056-7*, 18 (2006) 509.
13. Hammoudi R., Hadj Mahammed M., Ramdan F., Khodir A. A., *Alg. J. Arid Environment*. V 2 N°1 (2012) 49.
14. Basli A., Chibane M., Madani K., Oukil N., *Phytothérapie*, V 10 (1) (2012) 2.
15. Daas Amiour S., Alloui-Lombarkia O., Bouhdjila F., Ayachi A., Hambaba L., *Phytothérapie*, V 12 (2) (2014) 135.
16. Ghedadba N., Hambaba L., Ayachi A., Aberkane M. C., Bousselsela H., Oueld-Mokhtar S. M., *Phytothérapie*, V13 (3) (2015) 118.
17. Tchaminie N. S., Omoloko C., Nana W. L., Tchana A. N., Nkengfack A., Nwaga D., *Afr. J. Science and Technology (AJST)*. V 9 N°1 (2008) 20.
18. Barnet H. L., Hunter B. B., *Burgess Pub. Com.* (1972) 24.
19. Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J. P., Reymond P., Sarglier J. J., Vayssier Y., *2ème édition Collection Biotechnologies, Masson.* (1990) 512.
20. Pitt J. I., *Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Division of Food.* (1988) 187.
21. Samson R. A., Hoekstra E. S., Van C. A. N., Orschot. O., *2<sup>nd</sup> edition. Centraal bureau Voor Schimmel cultures.* (1984) 248.
22. Michra A. K., Dubey N. K., *Appl. Environ. Microbiol.*, 60(4) (1994) 1101.
23. Hiba Kh., Daami-Remadi M., Khiareddine H., El Mahjoub M., *Biotechnol. Agro.Soc. Environ.*, 9 (3) (2005) 163.
24. Hmouni A., Hajlaoui M. R., Mlaiki A., *OEPP/EPPO Bull.* 26 (1996) 697.
25. Oubair A., Fihri R., Majidi L., Azrou M., Daran J. C., *Acta Crys.* E66 (2010) o2391.
26. Amiri A., Dugas R., Pichot A. L., Bompeix G., *Int. J. Food Microbiol.* 126 (2008) 13.
27. Zambonelli A., D'Aurelio A. Z., Severi A., Benvenuti E., Maggi L., Branchi a., *J. Essent. Oil. Res.* 16 (2004) 69.
28. Mangena T., Muyima N. Y. O., *Lett. Appli. Microbiol.* 28 (1999) 291.

(2015); <http://www.jmaterenvironsci.com>