



COMPORTEMENT ELECTROCHIMIQUE ET ANTIBACTERIENNE DES DERIVES DE (1S, 2S)-2-AMINO-1-(4-NITROPHENYLE)- PROPANE-1,3-DIOL ♦

Cecilia Cristea^{1*}, G. Voiculescu², Maria Jitaru², C. Moinet³

¹*Université de Médecine et Pharmacie « Iuliu Hatieganu », Faculté de Pharmacie, Département de Chimie Analytique, 4 Rue Pasteur, 400 349 Cluj-Napoca, Roumanie*

²*Université Babes-Bolyai Cluj-Napoca, Laboratoire Associé Francophone, 11 Rue Arany Janos, 400 028 Cluj-Napoca, Roumanie*

³*Laboratoire d'Electrochimie et Organométalliques, Institut de Chimie, Université de Rennes 1, Campus de Beaulieu, 35042 Rennes Cedex, France*

*Correspondance : ccristea@umfcluj.ro

Abstract: Derivatives of (1S, 2S)-2-amino-1-(4-nitrophenyl)-propane-1,3-diol were studied because of their potential biological activity. Using the electrogenerated intermediates (hydroxylamine and nitroso derivatives) N-sulphonylphenylhydroxylamines and benzoxazine diones were obtained with good yields. Their antibacterial activity was investigated on several gram-negative and gram-positive bacilli by two techniques: broth-dilution method and agar-dilution method.

Keywords: *electrosynthesis, hydroxylamines, nitrosoderivatives, redox cell*

♦ Paper presented at **COFrRoCA 2006: Quatrième Colloque Franco-Roumain de Chimie Appliquée**, 28 June – 2 July, Clermont-Ferrand, France

INTRODUCTION

Les publications parues depuis plusieurs décennies sur l'électrochimie des produits possédant une fonction nitro confirme l'intérêt porté à ces composés. Bien que peu de produits naturels portent des fonctions nitro ou nitroso, des produits nitrés et nitrosés de synthèse présentent un intérêt certain compte tenu de leurs activités pharmacologiques potentielles; ainsi, plusieurs médicaments portent un groupement nitré. Même si l'on associe souvent la présence du groupement nitré avec les effets toxiques du médicament, ce groupement n'est pas directement impliqué dans le mécanisme d'action. Du point de vue pharmacologique les dérivés nitrés sont largement utilisés dans le traitement des infections anaérobiques et, par suite, ils sont potentiellement utilisables dans la thérapie du cancer selon le mode d'action d'une cytotoxine spécifique. Plus récemment ils ont été étudiés pour leur capacité de marqueurs dans les régions hypoxiques de diverses tumeurs [1].

Les dérivés de (1*S*, 2*S*)-2-amino-1-(4-nitrophényle)- propane-1,3-diol ont été préparés par voie électrochimiques en utilisant deux types des cellules électrochimiques [2]. Des résultats intéressants ont été obtenus dans la cellule « redox » équipé avec un ou deux électrodes poreuses traversées des polarités opposée. En effet, la technique électrochimique de préparation d'hydroxylamines plus ou moins stables ou de dérivés nitroso en cellule à circulation à électrodes poreuses représente actuellement l'une des meilleurs méthodes utilisables [3]. A partir des hydroxylamines et des nitroso dérivés ainsi préparés nous avons obtenu des benzoxazinediones, des hydroxylamines N sulfonées et des N – hydroxy indoles.

Les études électrochimiques ont été complétées par des études de microbiologie, en testant leur activité antibactérienne. Pour cela, nous avons effectué des tests de l'activité antibactérienne en utilisant la méthode de dilution en milieu liquide (bouillon Mueller Hinton) et en milieu solide (milieu Mueller Hinton Agar – Oxoid). Après l'incubation à 37 °C pour 18-20 heures nous avons pu lire la concentration minimale d'inhibition et aussi la concentration minimale bactérienne.

Le but de cette présentation est de montrer une autre alternative de synthèse des intermédiaires ou des produits intéressants pour l'industrie pharmaceutique ou pour la synthèse fine.

MATERIAUX ET METHODES D'ANALYSE

Réactifs

Les réactifs pour la synthèse et pour les électrolyses proviennent de *Aldrich Chemical Co.* et de *Acros Organics Co.* et ont été utilisés sans aucune purification préalable. Les solvants pour la synthèse et les électrolyses ont également été utilisés sans purification préalable. Le méthanol et l'acétonitrile sont d'origine *Merck*. Les solutions tampons ont été préparées à partir d'eau déminéralisée.

Les spectres RMN ^1H et ont été enregistrés à l'aide d'un appareil à transformée de Fourier Bruker DPI 200 FT de 200 MHz (^1H) et 50,5 MHz (^{13}C). Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en partie par million (ppm) par rapport au tétraméthylsilane (TMS) et les constantes de couplage (J) en Hz. Le solvant deutérié utilisé a été le chloroforme (CDCl_3).

Les spectres IR ont été enregistrés en solution (CH_2Cl_2) ou sur des pastilles de KBr à l'aide d'un spectromètre Nicolet type 205 FT-IR. Les nombres d'ondes sont exprimés en cm^{-1} .

Les points de fusion (P.F.) ont été mesurés sur un banc chauffant Kofler et n'ont pas été corrigés.

Mise en œuvre générale des électrolyses à potentiel contrôlé en cellule à cathode de mercure

Le substrat à électrolyser (3-4 mmol) dissous dans un mélange (100-150 mL) de tampon acétique (CH_3COOH 0,5 mol.L^{-1} + CH_3COOLi 0,5 mol.L^{-1}) dans le méthanol ou en milieu tampon acétique (CH_3COOH 0,5 mol.L^{-1} + CH_3COOLi 0,5 mol.L^{-1}) dans le mélange eau-acétonitrile (20:80, v/v) est placé dans la cellule d'électrolyse. La solution est préalablement désoxygénée par barbotage d'azote pendant 15 à 30 min avant d'être électrolysée à potentiel contrôlé sous un faible courant d'azote. Un suivi polarographique de l'avancement de la réaction est réalisé directement sur la solution contenue dans la cellule d'électrolyse. En fin d'électrolyse et après le contrôle de la disparition presque totale du dérivé nitré initial nous avons additionné divers réactifs (anhydrides maléique et phthalique, chlorure de *p*-toluènesulfonyl, dichlorure de phthaloyl) pour piéger l'hydroxylamine. Un suivi polarographique sur la solution résultante maintenue sous un faible courant d'azote et sous agitation permet de contrôler l'avancement de la réaction. La solution est ensuite séparée du mercure dans une ampoule à décanter et les solvants organiques sont éliminés à l'évaporateur rotatif. En présence d'un milieu faiblement acide, le brut de réaction obtenu est neutralisé par NaHCO_3 . La solution est ensuite extraite par l'éther (4 x 30 mL) et la fraction organique est séchée sur MgSO_4 puis concentrée à l'évaporateur rotatif. Les produits isolés sont purifiés par chromatographie « flash » ou par cristallisation.

Electrosynthèse des nitrosobenzènes en cellule "redox" à circulation

La cellule d'électrolyse à circulation, à deux électrodes poreuses consécutives en feutre de graphite (cellule "redox") équipée d'une seule contre-électrode en "amont" a été décrite précédemment [2, 3].

L'électrosynthèse des dérivés nitrosés à partir des composés nitrés correspondants a été réalisée selon le protocole opératoire suivant : le composé nitré en solution (environ 10^{-3} mole) en solution tampon acétique 0,5 M dans le méthanol, est préalablement désoxygénée par barbotage d'azote pendant 30 minutes, avant de percoler la cathode poreuse (diamètre 5,2 cm, épaisseur 1,2 cm) puis l'anode poreuse (épaisseur 0,6 cm)

avec un débit généralement compris entre 2 et 5 cm³/min. Les intensités des courants sur la cathode et l'anode poreuses sont imposées pour correspondre à une réduction à 4F par mole du composé nitré et une oxydation à 2F par mole de la phénylhydroxylamine produite intermédiairement.

Le taux de transformation des composés nitrés est déterminé par dosage polarographique à un potentiel correspondant au palier de diffusion des composés nitrés restants.

La solution contenant le dérivé nitroso en sortie de cellule est neutralisée par une solution saturée de NaHCO₃ jusqu'à pH = 7-8. Le méthanol est éliminé à l'évaporateur rotatif et le résidu est extrait par de l'éther (3 x 30 mL). La fraction organique est séchée sur MgSO₄ puis concentrée à l'évaporateur rotatif. Les produits obtenus sont purifiés par chromatographie sur colonne de silice ou par cristallisation.

Le *p*-toluènesulfinate de sodium, le phénylacétylène et le toluène sont des produits commerciaux (*Aldrich* ou *Sigma*), utilisés sans purification supplémentaire.

Les testes microbiologiques

Les composés III.1 – III.8. ont été testés pour leur activité antimicrobienne en utilisant comme références trois bactéries Gram-positive (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) et deux Gram - négative (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853).

La concentration minimale d'inhibition (CMI) définie comme la concentration minimale du composé testé qui empêche le développement des bactéries a été estimée pour tous les composés en utilisant le milieu Mueller-Hinton agar – oxoid.

Les composés ont été dissous dans un mélange de l'acétone et DMSO (1 :1). Des dilutions binaires ont été réalisées, 10 fois plus concentrée. Des dilutions de 1:10 et 1:100 ont été réalisées pour obtenir une concentration bactérienne 10⁶ UFC/mL. Le temps d'incubation a été entre 18 et 20 heures à 37°C. Avec l'anse de 0,01 nous avonsensemencé les cultures pour arriver d'avoir un spot de 10⁴ UFC/mL.

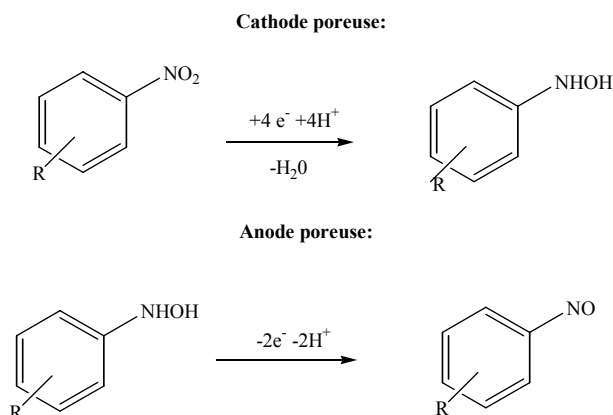
RESULTATS ET DISCUSSIONS

Les dérivés de (1*S*, 2*S*)-2-amino-1-(4-nitrophenyl)- propane-1,3-diol ont été préparés par la condensation des amines avec des composés carboxyliques convenablement substitués [1]. A partir de dérivés issus de (1*S*, 2*S*)-2-amino-1-(4-nitrophenyl)- propane-1,3-diol nous avons électrogénérés les dérivés nitrosés et les hydroxylamines correspondants.

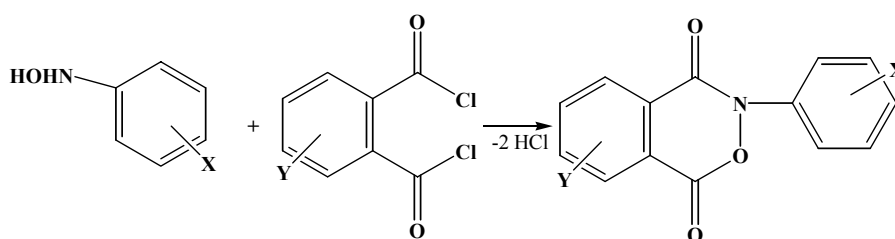
Tableau 1. Les caractéristiques spectrales et le rendement pour les dérivés investigués

Comp. No.	Composé	Rendement (%) Point de fusion	IR (KBr, cm ⁻¹)/ Analyse élémentaire	¹ H-RMN (CDCl ₃ , δ ppm)
III.1.	1-aza-2,8-diisopropane-4-(4-nitrosophényl)-3,7-dioxa-bicyclo[3.3.0]octane	27% P.F. = 119-121 °C.	Calculé : C 67,08 %, H 7,45%, N 9,20 %, O 15,77% ; Obtenu: 67,77%, H 7,65%, N 9,28%.	7,8 (m, 2H), 7,2 (m, 2H), 4,63 (d, <i>J</i> =7,7 Hz, 1H), 4,45 (d, <i>J</i> =4,5 Hz, 1H), 4,29 (d, <i>J</i> =6,3 Hz, 1H), 3,92 (AB, 2H), 3,45 (m, 1H), 1,80 (m, 2H), 1,06 (m, 12H).
III.2.	4-(4-chloro-phényl)- <i>N</i> -[2,2-diméthyl-4-(4-nitroso-phényl)-[1,3]-dioxan-5-yl]-butyramide	68% P.F. = 110-112 °C.		7,83(m, 6H), 7,62 (d, <i>J</i> = 8,3 Hz, 2H), 7,26 (m, 4H), 6,21 (s, 1H), 6,16 (s, 1H), 4,8 (d, <i>J</i> = 7,3 Hz, 1H), 4,32 (AB, 2H), 3,71 (m, 1H).
III.3.	[4-(4-nitrosophényl)-[1,3]dioxan-5-yl]-benzylidénamine	95% P.F. = 168-170° C.		8,34 (s, 1H), 7,82 (m, <i>J</i> =7,9 Hz, 5H), 7,59 (d, <i>J</i> =8,6 Hz, 2H), 7,42 (d, <i>J</i> = 8Hz, 2H), 5,2 (s, 2H), 4,8 (m, 1H), 3,80 (AB, 2H), 3,55 (d, <i>J</i> = 9 Hz, 1H).
III.4.	[2,2-diméthyl-4-(4-nitrosophényl)-[1,3]dioxan-5-yl]-benzylidénamine	93% P.F. = 148-150 °C.		7,89 (d, <i>J</i> = 8,1 Hz, 2H), 7,85 (d, <i>J</i> =7,9 Hz, 2H), 7,61 (m, 5H), 7,43 (s, 1H), 5,20 (d, 6,3 Hz, 1H), 4,30 (AB, 2H), 3,20 (m, 1H), 1,62 (s, 6H).
III.5.	Acétate de 3-acétoxy-2acétylamino-1-[4-(1,4-dioxo-1,4-dihydro-benzo[d][1,2]oxazin-3-yl)-phényl]propyle	47%		8,30 (d, <i>J</i> = 8,7 Hz, 2H), 8,16 (d, <i>J</i> = 8,5 Hz, 2H), 7,43 (m, 4H), 6,05 (m, 1H), 5,28 (s, 1H), 4,07 (AB, 2H), 2,14, (s, 3H), 2,07 (s, 3H), 1,96 (s, 3H).
III.6.	Hydroxylamine N-sulfonylée de p-nitro phényle sérinol acétylé	54% P.F. = 118-120 °C	1039,3, 1166,3 (SO ₂), 1225,8, 1690,2 (CO).	8,90 (s, 1H), 7,31 (d, <i>J</i> = 8,3 Hz, 2H), 7,25 (m, 6H), 5,98 (m, 1H), 5,88 (d, 6,7 Hz, 1H), 3,88 (AB, 2H), 2,39 (s, 3H), 2,12 (s, 3H), 2, 09 (s, 3H), 2,07 (s, 3H).
III.7.	Hydroxylamine N-sulfonylée de 2,2-dichloro- <i>N</i> -[2,2-diméthyl-4-(4-nitrosophényl)-[1,3]-dioxan-5-yl]-acétamide	60% P.F. = 200-202 °C	691,8, 812,8, 1089,5, 1162,1 (SO ₂), 1338,8, 1682,5 (CO).	8,3 (s, 1H), 7,54 (d, <i>J</i> = 7,5Hz, 2H), 7,38 (d, <i>J</i> = 8,1 Hz, 2H), 7,31 (d, <i>J</i> = 12,2Hz, 2H), 7,22 (d, <i>J</i> = 7,9Hz, 2H), 5,71 (s, 1H), 5,19 (d, 1H), 4,29 (m, 1H), 3,52 (AB, 2H), 2,35 (s, 3H), 1,41 (s, 3H), 1,24 (s, 3H).
III.8.	Hydroxylamine N-sulfonylée de l'alcool nitrobenzylique acétylé	59 % P.F. = 150-152° C	656,2, 1039,3, 1161,5 (SO ₂), 1698,4 (CO).	7,39 (d, <i>J</i> = 8,2Hz, 2H), 7,21 (m, 6H), 5,04 (s, 2H), 3,44 (s, 1H), 2,73 (s, 3H), 2,07 (s, 3H).

Les nitrosodérivés ont été obtenus après la réaction de réduction électrochimique (réaction 1) dans une cellule redox, en utilisant deux électrodes de feutre de graphite poreuses percolés, de polarité opposée [3].

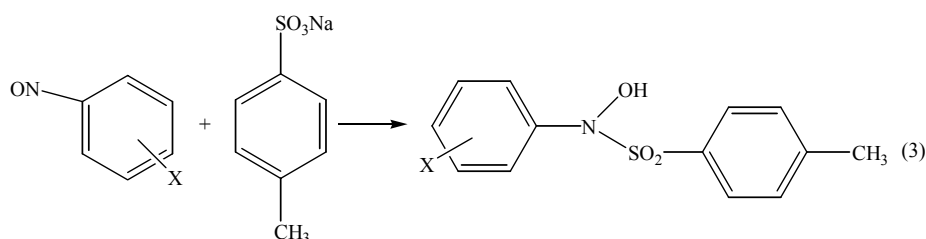


Les benzoxazine dione a été obtenu après l'électrogeneration de l'hydroxylamine correspondante dans une cellule a nappe de mercure, dans une réaction ultérieure au transfert de charge. Les phénylhydroxylamines réagissent avec le dichlorure de phthaloyle pour conduire à des 1H-2,3-benzoxazine-1,4-(3H)-diones (réaction 2) connues pour leurs propriétés phytosanitaires [4, 5].



L'addition d'un équivalent de dichlorure de phthaloyle à la solution obtenue après électrolyse du *p*-nitrophénylsérinol acétylé en tampon acétique dans l'acétonitrile, consomme la totalité de l'hydroxylamine après 12 h de réaction. Une analyse polarographique permet de suivre la disparition de la vague d'oxydation de l'hydroxylamine et l'apparition vers $-0,7\text{ V vs. ECS}$ d'une vague de réduction relative au produit formé. Après traitement et purification, la benzoxazinedione correspondante est isolée avec un rendement de 47% et caractérisée (RMN ^1H , analyse élémentaire).

L'addition du *p*-toluènesulfinate de sodium à une solution de dérivés nitroso, en sortie de cellule "redox", conduit à la formation de phénylhydroxylamines *N*-sulfonylées (réaction 3). Le produit de réaction est stable en milieu acide. La réaction peut être mise à profit pour la protection de groupements C-nitroso vis à vis de la réduction ou de la condensation; la déprotection peut être réalisée en milieu alcalin.



La réaction avec le *p*-toluènesulfinate de sodium peut être considérée comme une réaction de protection du groupement nitroso [6]. En outre, les hydroxylamines *N*-sulfonylées ainsi obtenues peuvent être utilisées ultérieurement en synthèse organique pour la préparation des benzisoxazolone *N*-sulfonylée.

La potentielle activité biologique des dérivés ayant la structure de base de (1*S*, 2*S*)-2-amino-1-(4-nitrophenyl)- propane-1,3-diol, qui est une intermédiaire dans la synthèse du chloramphénicol (antibiotique avec spectre large d'action) a été testé sur deux types de bactéries (trois gram –positives et deux gram –négatives).

Nous avons constaté que tous les composés étudiés présentent la CMI inférieur à 5 µg/mL sur les bactéries gramme positif. Le dérivé de type hydroxylamine *N*-sulfonylée (composé III.8.) présent une CMI 2,5 µg/mL pour *E. coli* et de 1,25 µg/mL pour *Pseudomonas aeruginosa*. Des activités intéressantes présent aussi les composés III.3, III.4, III.5, de 5 µg/mL, les autres (III.1, III.2., III.6 et III.7) ont eu le CMI > 5 µg/mL pour *E. coli*.

Tableau 2. Les concentrations d'inhibition minimale (CMI - µg/mL) pour les composés investigués

Racine de référence	CMI III.1	CMI III.2.	CMI III.3.	CMI III.4.	CMI III.8	CMI III.6.	CMI III.7.	CMI III.5.
<i>St. aureus</i> ATCC 29213	> 5	> 5	> 5	> 5	> 5	> 5	> 5	> 5
<i>St. aureus</i> ATCC 25923	> 5	> 5	> 5	> 5	> 5	> 5	> 5	> 5
<i>Ent. faecalis</i> ATCC 29241	> 5	> 5	5	> 5	> 5	> 5	> 5	> 5
<i>E. coli</i> ATCC 25922	> 5	> 5	5	5	2,5	> 5	> 5	5
<i>Ps. aeruginosa</i> ATCC 27853	2,5	2,5	2,5	2,5	1,25	5	2	> 5

Les hydroxylamines *N*-sulphonylés prouvent une activité antibactérienne élevée pour les bactéries gram-positives, leur activité augment sur les bactéries gram-négatives. Des autres bactéries et champignons seront utilisés dans l'avenir.

CONCLUSIONS

Dans cette étude une méthode originale, plus simple et propre de synthèse a été montrée pour des intermédiaires et/ou produits ayant des propriétés pharmacologiques. Les dérivés nitrosés sont utilisés souvent dans la synthèse des hétérocycles azotes.

L'étude du comportement électrochimique des dérivés issus du *p*-nitrophénylsérinol a été envisagée pour essayer de trouver les meilleures conditions d'électrosynthèse d'intermédiaires intéressants en synthèse organique ou ayant des possibles propriétés antimicrobiennes.

D'une manière générale les dérivés nitro étudiés présentent le comportement habituel des nitrobenzènes en milieu protique. Un comportement plus particulier a été observé en milieu hydroalcoolique alcalin, en milieu aprotique ainsi qu'en présence d'inhibiteurs.

Après l'électrogénération des hydroxylamines et des dérivés nitrosés nous les avons captés dans des réactions ultérieure au transfert de charge, directement dans la sortie de la cellule (avec les sulphinates comme agents nucléophiles) ou dans la cellule électrochimique à nappe de Hg (avec la dichlorure de phthaloyle). Ce travail illustre une application de l'électrochimie en synthèse de molécules difficiles d'accès, à haute valeur ajoutée, utilisables comme intermédiaires en synthèse organique ou avec des possibles propriétés pharmacologiques.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient pour le support financier le Ministère Roumain de la Recherche (projets E_T 3264/2005, A_T 180/2006, CERES 4-6/2004 et CNCSIS 64/2004).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Cristea, Cecilia: *Thèse doctorale*, Université Babes-Bolyai Cluj et Université Rennes I, Rennes, **2003**
2. Cristea, C.V., Moinet, C., Jitaru, M., Darabantu, M.: *J. of Applied Electrochem.*, **2005**, **35**(9), 845.
3. Cristea, C.V., Moinet, C., Jitaru, M., Popescu, I.C.: *J. of Applied Electrochem.*, **2005**, **35**(9), 851.
4. Procter, G., Nally, J., Ordsmith, N.H.R.: *Tetrahedron*, **1995**, **51**, 12837.
5. Krenzer, J. (pour Velsicol Chem Corporation) : Patent américain 3,541,092 (Cl C07d 87/04), 17 Nov., **1970**.
6. Guilbaud-Criqui, A., Moinet, C.: *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **1992**, **129**, 295.