

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 675 585**

21 Número de solicitud: 201700028

51 Int. Cl.:

C07C 233/06 (2006.01)

A01N 37/18 (2006.01)

A01N 45/02 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

11.01.2017

43 Fecha de publicación de la solicitud:

11.07.2018

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE CÁDIZ (66.0%)

C/ Ancha, 16

11001 Cádiz ES y

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

(44.0%)

72 Inventor/es:

GONZALEZ COLLADO, Isidro;

MACÍAS SÁNCHEZ, Antonio José;

RUANO GONZALEZ, Antonio;

CORREIRA GOMEZ, Dhionne y

TAKAHASHI, Jacqueline Aparecida

54 Título: **Preparación de compuestos 2-N-ACIL-9-Hidroxiclovánicos y sus derivados reagrupados para el tratamiento de infecciones producidas por hongos fitopatógenos, como agentes fungistáticos de bajo impacto ecológico**

57 Resumen:

Compuestos 2-N-acil-9-hidroxiclovánicos, y sus derivados reagrupados, procedimientos de elaboración y usos para el tratamiento de infecciones producidas por hongos fitopatógenos, como agentes fungistáticos de bajo impacto ecológico.

La presente invención comprende compuestos con la fórmula general 1 (Figura 1) y fórmula general 2 (Figura 2) y su preparación, donde R_1 , R_2 y R_3 son átomos de hidrógeno o bien cadenas o ciclos que pueden contener átomos de carbono, hidrógeno u otros heteroátomos. Estos compuestos pueden utilizarse como agentes de protección vegetal, para controlar enfermedades provocadas por hongos del género Botrytis.

ES 2 675 585 A1

DESCRIPCIÓN

COMPUESTOS 2-N-ACIL-9-HIDROXICLOVÁNICOS Y SUS DERIVADOS REAGRUPADOS, PROCEDIMIENTOS DE ELABORACIÓN Y USOS PARA EL TRATAMIENTO DE INFECCIONES PRODUCIDAS POR HONGOS FITOPATÓGENOS, COMO AGENTES FUNGISTÁTICOS DE BAJO IMPACTO ECOLÓGICO.

DOMINIO DE LA TÉCNICA

La invención pertenece al campo de los fungicidas agrícolas.

10 ESTADO ANTERIOR DE LA TÉCNICA

Numerosas especies de hongos son capaces de actuar como patógenos sobre plantas de importancia económica. Con el fin de prevenir y reducir enfermedades provocadas por hongos patógenos se ha desarrollado una amplia gama de compuestos con actividad fungistática o fungicida.

15 Patógenos de plantas de considerable importancia comercial son los hongos del género *Botrytis*. El género *Botrytis* incluye diversas especies tales como: *B. cinerea*, *B. alli*, *B. squamosa*. Entre ellas, *B. cinerea* presenta un especial interés debido a las cuantiosas pérdidas económicas que produce. Este patógeno ataca a frutos tales como la uva y la fresa, a hortalizas tales como judías, zanahorias y pepinos y a plantas ornamentales tales como begonias, crisantemos, geranios, rosas y tulipanes.

25 El desarrollo de tolerancia por parte de especies del género *Botrytis* a diversos fungicidas comerciales ha conducido a la pérdida de eficacia de estos o a la necesidad del empleo de mayores cantidades de los mismos. Este hecho unido al aumento de la preocupación de la opinión pública sobre el uso adecuado de agentes de control químico y su impacto en el medioambiente, redundan en la necesidad de desarrollar nuevos agentes químicos de control fúngicos con

reducida persistencia en la ecosfera y que, por tanto, no se incorporen a la cadena alimentaria.

Por tanto, es interesante obtener nuevos fungicidas y agentes fungistáticos de bajo impacto ecológico y métodos para tratar o prevenir infecciones fúngicas.

- 5 Ejemplos previos de compuestos para tratar infecciones fúngicas lo constituyen los derivados clovánicos 2-O,9 sustituidos (ES2154185 A1), los derivados clovánicos 2-N,9-sustituidos (ES 2241482 A1), los derivados con esqueleto de feniletanol (ES 2221805 A1) y los derivados de (fenilhidroxietilamino)benzoico (ES 2325513 A1).

10

EXPLICACIÓN DE LA INVENCIÓN

La invención comprende compuestos con la fórmula general **1** (Figura 1) donde R_1 , R_2 y R_3 son átomos de hidrógeno o bien cadenas o ciclos que pueden contener átomos de carbono, hidrógeno u otros heteroátomos.

- 15 La invención comprende compuestos con la fórmula general **2** (Figura 2) donde R_1 , R_2 y R_3 son átomos de hidrógeno o bien cadenas o ciclos que pueden contener átomos de carbono, hidrógeno u otros heteroátomos.

Para preparar compuestos de fórmula general **1**, con R_1 , R_2 y R_3 tal y como se han definido previamente, puede emplearse el siguiente procedimiento:

- 20 Partiendo del sesquiterpeno óxido de cariofileno (**3**) (Figura 3) es posible obtener derivados de clovano de fórmula general **1**, mediante reagrupamiento catalizado por ácido, empleando un nitrilo de fórmula general $(R_1)(R_2)(R_3)CCN$, donde R_1 , R_2 y R_3 son átomos de hidrógeno o bien cadenas o ciclos que pueden contener átomos de carbono, hidrógeno u otros heteroátomos.

- 25 Para preparar compuestos de fórmula general **2**, con R_1 , R_2 y R_3 tal y como se han definido previamente, puede emplearse el siguiente procedimiento:

Partiendo de compuestos de fórmula general **1**, es posible obtener, mediante reagrupamiento catalizado por ácido y empleo de un reactor de microondas, derivados de clovano de fórmula general **2**, donde R_1 , R_2 y R_3 son átomos de hidrógeno o bien cadenas o ciclos que pueden contener átomos de carbono, hidrógeno u otros heteroátomos.

Por otra parte, partiendo del sesquiterpeno óxido de cariofileno (**3**) (Figura 3) es posible obtener derivados de clovano reagrupado de fórmula general **2**, mediante reagrupamiento catalizado por ácido, empleando un nitrilo de fórmula general $(R_1)(R_2)(R_3)CCN$ como disolvente y un reactor de microondas, donde R_1 , R_2 y R_3 son átomos de hidrógeno o bien cadenas o ciclos que pueden contener átomos de carbono, hidrógeno u otros heteroátomos.

Estos compuestos, de fórmula general **1** y de fórmula general **2**, son capaces de reducir el crecimiento de un hongo por aplicación de una cantidad suficiente de los mismos.

Estos compuestos pueden emplearse para reducir el crecimiento del hongo de manera profiláctica, o para reducir el crecimiento de un hongo ya presente en el área a ser tratada. Con preferencia, los compuestos descritos se emplean para reducir o prevenir el crecimiento de hongos patógenos de plantas; sin embargo, estos compuestos pueden emplearse para inhibir el crecimiento fúngico en diversas aplicaciones no agrícolas (por ejemplo, para reducir daños por humedad sobre madera, pinturas, etc.).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Para la mejor comprensión de lo descrito en esta memoria, se acompañan una serie de figuras que describen los compuestos a los que se hace referencia a lo largo del texto.

Figura 1.- Compuestos de fórmula general **1**, donde R_1 , R_2 y R_3 son cadenas o ciclos que pueden contener átomos de carbono, hidrógeno u otros heteroátomos.

Figura 2.- Compuestos de fórmula general **2**, donde R_1 , R_2 y R_3 son átomos de hidrógeno o bien cadenas o ciclos que pueden contener átomos de carbono,
5 hidrógeno u otros heteroátomos.

Figura 3.- óxido de cariofileno (**3**).

Figura 4.- Compuestos **4**, **5** y **6** de fórmula general **1**.

Figura 5.- Compuestos **7**, **8** y **9** de fórmula general **2**.

Figura 6.- Tabla que describe los datos de ^{13}C -RMN para los compuestos **4**, **5** y **6**.

10 **Figura 7.-** Tabla que describe los datos de ^{13}C -RMN para los compuestos **7**, **8** y **9**.

Figura 8.- Porcentajes de inhibición del crecimiento del micelio del hongo *B. cinerea* mediante el compuesto **4**, en función de la concentración. Control: irgasan (5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi)fenol).

15 **Figura 9.-** Porcentajes de inhibición del crecimiento del micelio del hongo *B. cinerea* mediante el compuesto **5**, en función de la concentración. Control: irgasan (5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi)fenol).

Figura 10.- Porcentajes de inhibición del crecimiento del micelio del hongo *B. cinerea* mediante el compuesto **6**, en función de la concentración. Control: irgasan (5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi)fenol).

20 **Figura 11.-** Porcentajes de inhibición del crecimiento del micelio del hongo *B. cinerea* mediante el compuesto **7**, en función de la concentración. Control: irgasan (5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi)fenol).

Figura 12.- Porcentajes de inhibición del crecimiento del micelio del hongo *B. cinerea* mediante el compuesto **8**, en función de la concentración. Control: irgasan
25 (5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi)fenol).

Figura 13.- Porcentajes de inhibición del crecimiento del micelio del hongo *B. cinerea* mediante el compuesto **9**, en función de la concentración. Control: irgasan (5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi)fenol).

Figura 14.- Tabla que describe la concentración mínima inhibitoria de los compuestos **4** a **9** e irgasan, para reducir un 50% (MIC₅₀), el crecimiento de la colonia tratada del hongo *B. cinerea*.

MODO DE REALIZACIÓN DE LA INVENCIÓN. EJEMPLOS DE PREPARACIÓN Y ACTIVIDAD.

10 **Ejemplo 1.** Preparación de *N*-(9-hidroxiclovan-2-il)acetamida (**4**) (Figura 4).

0,150 g (0,68 mmol) de oxido de cariofileno (**3**) se añaden a un matraz Schlenck con barra agitadora magnética, dejando el medio en atmósfera inerte. A continuación se añade 1 mL de acetonitrilo (CH₃CN) seco y 0,067 g de Sn(OTf)₂ (0,17 mmol). Tras 24 horas de agitación magnética a temperatura ambiente, se purifica la mezcla de reacción mediante cromatografía en columna con gradientes crecientes de acetato de etilo (AcOEt) en hexano, obteniéndose 121mg del compuesto **4**.

Datos físicos y espectroscópicos para el compuesto **4**.

Solido amorfo. $[\alpha]_D^{25} = -32$ (c= 0.454, metanol).

20 **IR** ν_{\max} (film) 3407, 2946, 1642, 1565, 1464, 1383, 1218, 757 cm⁻¹

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 0,90 (s, 3H, H₃-15), 0,91 (s, 3H, s, H₃-14 β), 0,99 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H, H-12-b), 0,99 (m, 1H, H-11b), 1,04 (s, 3H, H₃-13 α), 1,10 (m, 1H, H-7b), 1,38 (m, 1H, H-7a), 1,40 (m, 1H, H-3b), 1,43 (m, 1H, H-5 β), 1,46 (m, 2H, H₂-6), 1,50 (m, 1H, H-11a), 1,53 (m, 1H, H-3a), 1,55 (m, 1H, H-12a), 1,56 (m, 1H, H-10b), 1,95 (s, 3H, H₃-18), 25 1,98 (m, 1H, H-10a), 4,09 (dd, $J = 12.8, 6.0$ Hz, 1H, H-2 α).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) (ver Figura 6)

Ejemplo 2. Preparación de *N*-(9-hidroxiclovan-2-il)pivalamida (**5**) (Figura 4).

0,150 g (0,68 mmol) de oxido de cariofileno (**3**) se añaden a un matraz
 5 Schlenck con barra agitadora magnética, dejando el medio en atmósfera inerte. A
 continuación se añaden 3 mL de 2,2-dimetilpropionitrilo ($(\text{CH}_3)_3\text{CCN}$) seco y
 0,067 g de $\text{Sn}(\text{OTf})_2$ (0,17 mmol). Tras 24 horas de agitación magnética a
 temperatura ambiente, se purifica la mezcla de reacción mediante cromatografía
 10 en columna con gradientes crecientes de acetato de etilo (AcOEt) en hexano,
 obteniéndose 144mg del compuesto **5**.

Datos físicos y espectroscópicos para el compuesto **5**

Sólido amorfo. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -27$ ($c=0.37$, metanol)

IR ν_{max} (film) 3428, 2951, 2866, 1643, 1536, 1464, 755 cm^{-1}

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 0,88 (s, 3H, $\text{H}_3\text{-13}\alpha$), 0,92 (s, 3H,
 15 $\text{H}_3\text{-15}$), 0,94 (m, 1H, H-11b) 1,00 (s, 3H, $\text{H}_3\text{-14}\beta$), 1,02 (m, 1H, H-12-b),
 1,05 (m, 1H, H-7b), 1,17 (s, 9H, $\text{H}_3\text{-19}$, $\text{H}_3\text{-20}$, $\text{H}_3\text{-21}$), 1,33 (m, 1H, H-
 3b), 1,34 (m, 1H, H-5 β), 1,37 (m, 2H, $\text{H}_2\text{-6}$), 1,37 (m, 1H, H-7a), 1,41 (m,
 1H, H-11a), 1,53 (d, $J = 13,2$ Hz, 1H, H-12a), 1,60 (m, 1H, H-3a), 1,60
 (m, 1H, H-10b), 1,93 (m, 1H, H-10a), 3,24 (m, 1H, H-9 β), 4,10 (ddd, $J =$
 20 12,7; 8,9; 6,0 Hz, 1H, H-2 α), 5,51 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H, H-16).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) (ver Figura 6)

Ejemplo 3. Preparación de 2-fenil-*N*-(9-hidroxiclovan-2-il)acetamida (**6**) (Figura 4).

0,150 g (0,68 mmol) de óxido de cariofileno (**3**) se añaden a un matraz Schlenck con barra agitadora magnética, dejando el medio en atmósfera inerte. A
 5 continuación se añaden 3 mL de fenilacetnitrilo (PhCH₂CN) seco y 0,067 g de Sn(OTf)₂ (0,17 mmol). Tras 24 horas de agitación magnética a temperatura ambiente, se purifica la mezcla de reacción mediante cromatografía en columna con gradientes crecientes de acetato de etilo (AcOEt) en hexano, obteniéndose 198mg del compuesto **6**.

10 Datos físicos y espectroscópicos para el compuesto **6**

Sólido amorfo. $[\alpha]_D^{25} = -7$ (c=0.22, metanol).

IR ν_{\max} (film) 3675, 3419, 3311, 2928, 2946, 2864, 1649, 1551, 1364, 1384, 757 cm⁻¹

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 0,69 (ddt, $J = 10,0; 4,8; 2,4$ Hz, 1H, H-11b) 0,87 (s, 3H, H₃-13 α), 0,93 (s, 3H, H₃-15), 0,95 (s, 3H, H₃-14 β),
 15 1,03 (m, 1H, H-7b), 1,04 (m, 1H, H-12-b), 1,19 (m, 2H, H-3b, H-11a), 1,27 (m, 1H, H-5 β), 1,26-1,40 (m, 2H, H₂-6), 1,36 (m, 1H, H-7a), 1,51 (m, 1H, H-12a), 1,53 (m, 1H, H-10b), 1,54 (m, 1H, H-3a), 1,88 (m, 1H, H-10a), 3,24 (m, 1H, H-9 β), 3,58 (m, 2H, H₂-18), 4,11 (ddd, $J = 12,4; 9,3;$
 20 5,9 Hz, 1H, H-2 α), 5,22 (d, $J = 9,3$ Hz, 1H, H-16), 7,25-7,31 (3H, H-20, H-22, H-24), 7,33-7,37 (2H, H-21, H-23).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) (ver Figura 6).

Ejemplo 4. Preparación de *N*-((1*S*,2*S*,5*S*,8*S*)-4,4,9-trimetiltricyclo[6.2.2.0^{1,5}]dodec-9-en-2-il)acetamida (**7**) (Figura 5).

Procedimiento A.

0,037 g (0,17 mmol) de óxido de cariofileno (**3**) se añaden a un matraz de alta presión, dejando el medio en atmósfera inerte. A continuación se añaden 14 mL de acetonitrilo (CH₃CN) seco y 0,020 g de Sn(OTf)₂ (0,05 mmol) y tras el sellado del reactor, se somete este a una radiación de microondas de 1000 W, hasta alcanzar una temperatura de 240°C. Tras alcanzar dicha temperatura, se deja enfriar el reactor hasta temperatura ambiente, se abre y se purifica la mezcla de reacción mediante cromatografía en columna con gradientes crecientes de acetato de etilo (AcOEt) en hexano, obteniéndose 22mg del compuesto **7**.

Procedimiento B.

0,037 g (0,13 mmol) de *N*-(9-hidroxiclovan-2-il)acetamida (**4**) se añaden a un matraz de alta presión, dejando el medio en atmósfera inerte. A continuación se añaden 14 mL de acetonitrilo (CH₃CN) seco y 0,017 g de Sn(OTf)₂ (0,04 mmol) y tras el sellado del reactor, se somete éste a una radiación de microondas de 1000 W, hasta alcanzar una temperatura de 240°C. Tras alcanzar dicha temperatura, se deja enfriar el reactor hasta temperatura ambiente, se abre y se purifica la mezcla de reacción mediante cromatografía en columna con gradientes crecientes de acetato de etilo (AcOEt) en hexano, obteniéndose 20mg del compuesto **7**.

Datos físicos y espectroscópicos para el compuesto **7**.

Sólido amorfo. $[\alpha]_D^{25} = -40$ (c=0.15, metanol)

IR ν_{\max} (film) 3000, 2800, 1650, 1550, 1400, 1250 cm⁻¹

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 0,75 (s, 3H, H₃-14 β), 0,90 (m, 1H, H-12a), 0,92 (s, 3H, H₃-13 α), 1,06 (m, 1H, H-7a), 1,11 (dd, $J = 12.7, 3.1$ Hz, 1H, H-5), 1,19 (m, 1H, H-11a), 1,25 (m, 2H, H-3a, H-12b), 1,34 (m, 1H, H-11b), 1,44 (m, H-6a), 1,69 (d, $J = 1.5$ Hz, 3H, H-15), 1,76 (m, H-3b, H-6b,

H-7b), 1.96 (s, 3H, H₃-18), 2.29 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H, H-8), 4.36 (ddd, $J = 12.4, 9.2, 6.7$ Hz, 1H, H-2), 5.36 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, H-16), 5.63 (s, 1H, H-10).

¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) (ver Figura 7)

5

Ejemplo 5. Preparación de *N*-((1*S*,2*S*,5*S*,8*S*)-4,4,9-trimetiltriciclo[6.2.2.0^{1,5}]dodec-9-en-2-il)pivalamida (**8**) (Figura 5)

Procedimiento A.

0,037 g (0,17 mmol) de óxido de cariofileno (**3**) se añaden a un matraz de
 10 alta presión, dejando el medio en atmósfera inerte. A continuación se añaden 14
 mL de 2,2-dimetilpropionitrilo ((CH₃)₃CCN) seco y 0,020 g de Sn(OTf)₂ (0,05
 mmol) y tras el sellado del reactor, se somete este a una radiación de microondas
 de 1000 W, hasta alcanzar una temperatura de 240°C. Tras alcanzar dicha
 temperatura, se deja enfriar el reactor hasta temperatura ambiente, se abre y se
 15 purifica la mezcla de reacción mediante cromatografía en columna con gradientes
 crecientes de acetato de etilo (AcOEt) en hexano, obteniéndose 24mg de el
 compuesto **8**.

Procedimiento B.

0,037 g (0,13 mmol) de *N*-(9-hidroxiclovan-2-il)pivalamida (**5**) se añaden
 20 a un matraz de alta presión, dejando el medio en atmósfera inerte. A continuación
 se añaden 14 mL de 2,2-dimetilpropionitrilo ((CH₃)₃CCN) seco y 0,017 g de
 Sn(OTf)₂ (0,04 mmol) y tras el sellado del reactor, se somete éste a una radiación
 de microondas de 1000 W, hasta alcanzar una temperatura de 240°C. Tras
 alcanzar dicha temperatura, se deja enfriar el reactor hasta temperatura ambiente,
 25 se abre y se purifica la mezcla de reacción mediante cromatografía en columna
 con gradientes crecientes de acetato de etilo (AcOEt) en hexano, obteniéndose
 23mg del compuesto **8**.

Datos físicos y espectroscópicos para el compuesto **8**.

Sólido amorfo. $[\alpha]_D^{25} = -59$ (c=0.56, metanol).

IR ν_{\max} (film) 3000, 2800, 1650, 1550, 1400, 1250 cm^{-1}

5 **$^1\text{H NMR}$** (400 MHz, CD_3OD) δ 0,76 (s, 3H, $\text{H}_3\text{-14}\beta$), 0,88 (m, 1H, H-12a), 0,93 (s, 3H, $\text{H}_3\text{-13}\alpha$), 1,04 (m, 1H, H-7a), 1,13 (m, 2H, H-5, H-11a), 1,18 (s, 9H, $\text{H}_3\text{-19}$, $\text{H}_3\text{-20}$, $\text{H}_3\text{-21}$), 1,27 (m, 2H, H-3a, H-12b), 1,34 (m, 1H, H-11b), 1,43 (m, 1H, H-6a), 1,69 (d, $J = 1.5$ Hz, 3H, $\text{H}_3\text{-15}$), 1,73 (m, 1H, H-7b), 1,79 (m, 2H, H-3b, H-6b), 2,28 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H, H-8), 4,32
10 (ddd, $J = 12.3, 8,7, 6.7$ Hz, 1H, H-2), 5,48 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H-16), 5,64 (s, 1H, H-10).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, CD_3OD) (ver Figura 7).

15 **Ejemplo 6. Preparación de 2-fenil-*N*-((1*S*,2*S*,5*S*,8*S*)-4,4,9-trimetiltriciclo[6.2.2.0^{1,5}]dodec-9-en-2-il)acetamida (**9**) (Figura 5)**

0,022 g (0,06 mmol) de 2-fenil-*N*-(9-hidroxiclovan-2-il)acetamida (**6**) se añaden a un matraz de alta presión, dejando el medio en atmósfera inerte. A continuación se añaden 14 mL de acetonitrilo (CH_3CN) seco y 0,008 g de
20 $\text{Sn}(\text{OTf})_2$ (0,02 mmol) y tras el sellado del reactor, se somete este a una radiación de microondas de 1000 W, hasta alcanzar una temperatura de 240°C. Tras alcanzar dicha temperatura, se deja enfriar el reactor hasta temperatura ambiente, se abre y se purifica la mezcla de reacción mediante cromatografía en columna con gradientes crecientes de acetato de etilo (AcOEt) en hexano, obteniéndose
25 13mg del compuesto **9**.

Datos espectroscópicos para el compuesto **9**.

Sólido amorfo. $[\alpha]_D^{25} = -51$ (c=0.25, metanol).

IR ν_{\max} (film) 3650, 3600, 3000, 2800, 1650, 1550, 1100, 1050, 1020 cm^{-1}

¹H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0,75 (s, 3H, H₃-14 β), 0.88 (m, 1H, H-12a),
 5 0.94 (s, 3H, H₃-13 α), 1.07 (m, 2H, H-7a, H-11a), 1.17 (m, 1H, H-5), 1.27
 (m, 2H, H-3a, H-12b), 1.41 (m, 2H, H-6a, H-11b), 1.50 (m, 1H, H-3a) 1.63
 (m, 1H, H-3b), 1.66 (d, $J = 1.5$ Hz, 3H, H-15), 1.69 (m, 1H, H-6b), 1.76
 (m, 1H, H-7b), 2.26 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H, H-8), 3.48 (s, 2H, H-18), 4.27 (dd,
 10 $J = 12.5, 6.7$ Hz, 1H, H-2), 5.59 (s, 1H, H-10), 7.21 (m, 1H, H-22), 7.27
 (s, 4H, H-20, H-21, H-22, H-23).

¹³C-NMR (100MHz, CD_3OD) (ver Figura 7).

Ejemplo 7. Ensayo de inhibición del crecimiento del micelio de *B. cinerea* por parte de los compuestos **4-9**. Método de microdilución.

15

La concentración más baja que inhibe el crecimiento micelial un 50%, respecto al control positivo (MIC_{50}) fue evaluada por triplicado, mediante el método de microdilución, empleando microplacas de 96 pocillos. Se prepararon disoluciones de los compuestos **4-9** en DMSO (12'5 mg/mL). A partir de esas
 20 disoluciones stock, se prepararon disoluciones de los compuestos en el rango 125–
 0'06 $\mu\text{g/mL}$ (compuestos **4-6**) ó 62'5–0'06 $\mu\text{g/mL}$ (compuestos **7-9**) empleando medio Sabourad-glucosa, de manera que la concentración final de DMSO no exceda el 2%. Se prepararon tanto disoluciones inoculadas con el hongo (Medio + Compuesto + Hongo, MCH) como disoluciones sin inocular (Medio +
 25 Compuesto, MC). Por otra parte, se prepararon disoluciones de control que contenían el microorganismo inoculado en el medio de cultivo (control positivo, Medio + Hongo, MH) y el medio de cultivo estéril sin inocular (Medio, M). La

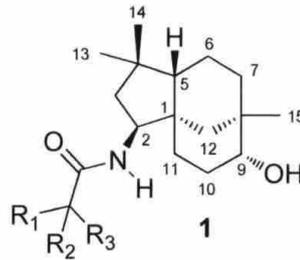
concentración final de esporas en las disoluciones inoculadas es de 5×10^3 esporas/mL.

Las placas se incubaron durante 72 horas a una temperatura de 28°C a 30°C junto con una placa de control de hongo (MH) y otra de control de medio
5 (M). Se empleó irgasan (5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi)fenol) como control negativo (inhibición del hongo en un amplio rango de concentraciones). Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado. Tras el tiempo mencionado se realizó la lectura de absorbancia a 492nm en un equipo lector de absorbancias en placas de 96 pocillos de tipo ELISA y se calcularon los porcentajes de inhibición (I%),
10 empleando las medias +/- desviación estándar para construir las curvas que representan el porcentaje de inhibición (%) frente a la concentración (Porcentaje de inhibición (I%) = $100 - 100 * (\text{Abs}_{492}\text{MCH} - \text{Abs}_{492}\text{MC}) / (\text{Abs}_{492}\text{MH} - \text{Abs}_{492}\text{M})$). Las estimaciones de los valores de MIC₅₀ para cada compuesto se obtuvieron a partir de estas curvas, mediante el ajuste a una curva de tipo dosis-respuesta.

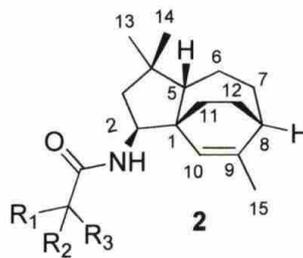
15

REIVINDICACIONES

- 1.- Compuestos 2-*N*-acil-9-hidroxiclovánicos, con la fórmula general **1** (Figura 1), donde R₁, R₂ y R₃ son átomos de hidrógeno o bien cadenas o ciclos que pueden
5 contener átomos de carbono, hidrógeno u otros heteroátomos.



- 2.- Compuestos clovánicos reagrupados 2-*N*-acil sustituidos, con la fórmula general **2** (Figura 2), donde R₁, R₂ y R₃ son átomos de hidrógeno o bien cadenas o ciclos que pueden contener átomos de carbono, hidrógeno u otros heteroátomos.



10

- 2.- Uso de los compuestos a los que se refieren las reivindicaciones 1 y 2 para el tratamiento de infecciones producidas por hongos fitopatógenos, como agentes fungistáticos de bajo impacto ecológico.
- 3.- Uso de los compuestos a los que se refieren las reivindicaciones 1 y 2 para
15 controlar infecciones provocadas por hongos fitopatógenos del género *Botrytis*.
- 4.- Uso de los compuestos a los que se refieren las reivindicaciones 1 y 2 para inhibir el crecimiento fúngico en diversas aplicaciones no agrícolas.

5.- Uso de los compuestos a los que se refieren las reivindicaciones 1 y 2 para reducir los daños que el crecimiento fúngico produce sobre maderas y pinturas.

6.- Un procedimiento para preparar compuestos de fórmula **1** (Figura 1), según reivindicación 1, caracterizado por la reacción de óxido de cariofileno (compuesto de fórmula **3**) con nitrilos de fórmula $(R_1)(R_2)(R_3)CCN$ y catalizada por ácido, donde R_1 , R_2 y R_3 son átomos de hidrógeno o bien cadenas o ciclos que pueden contener átomos de carbono, hidrógeno u otros heteroátomos.

7.- Un procedimiento para preparar compuestos de fórmula **2** (Figura 2), según reivindicación 2, caracterizado por la reacción de compuestos de fórmula **1** (Figura 1), según reivindicación 1, en acetonitrilo, catalizada por ácido y llevada a cabo en un reactor de microondas, donde R_1 , R_2 y R_3 son átomos de hidrógeno o bien cadenas o ciclos que pueden contener átomos de carbono, hidrógeno u otros heteroátomos.

8.- Un procedimiento para preparar compuestos de fórmula **2** (Figura 2), según reivindicación 2, caracterizado por la reacción de óxido de cariofileno (compuesto de fórmula **3**) en nitrilos de fórmula general $(R_1)(R_2)(R_3)CCN$, catalizada por ácido y llevada a cabo en un reactor de microondas, donde R_1 , R_2 y R_3 son átomos de hidrógeno o bien cadenas o ciclos que pueden contener átomos de carbono, hidrógeno u otros heteroátomos.

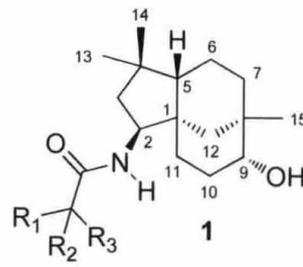


Figura 1

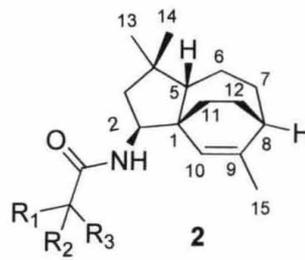


Figura 2

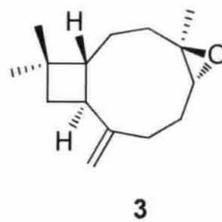


Figura 3

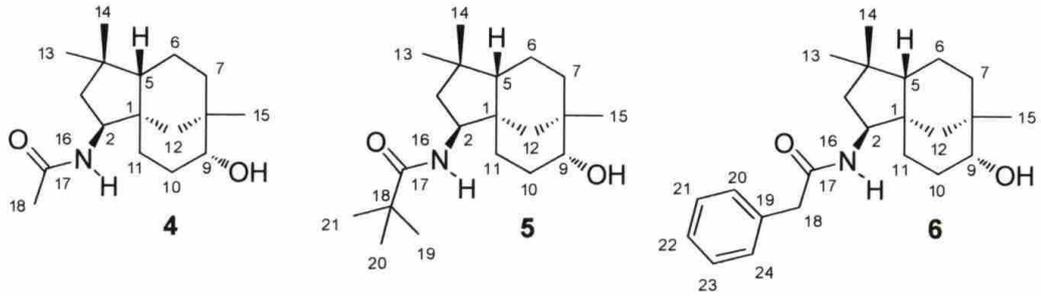


Figura 4

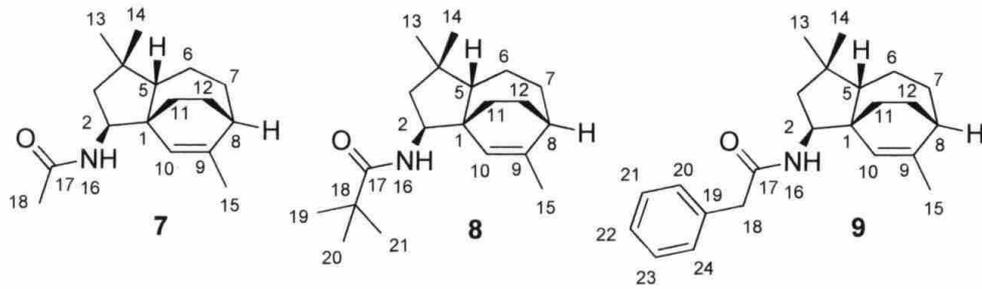


Figura 5

Datos de ^{13}C -RMN para los compuestos **4**, **5** y **6**

	4^a	5^b	6^b
Posición	δ_{C} (100 MHz)	δ_{C} (125 MHz)	δ_{C} (125 MHz)
1	45,37	43,69	43.80
2	58,99	57,37	57.64
3	46,18	45,87	45.65
4	38,53	37,60	37.65
5	51,94	50,61	50.50
6	21,68	20,52	20.52
7	34,35	33,04	32.99
8	35,90	34,74	34.75
9	75,64	74,82	74.87
10	26,62	25,53	25.49
11	28,83	27,36	27.13
12	36,94	35,62	35.57
13 α	31,18	30.82	30.77
14 β	24,97	24,52	24.55
15	29,07	28,13	28.14
16	-	-	-
17	172,88	178,17	170.60
18	22,73	38,72	44.04
19	-	27,61	135.14
20	-	27,61	129.41
21	-	27,61	128.96
22	-	-	127.28
23	-	-	128.96
24	-	-	129.41

^a CD₃OD. ^b CDCl₃.

Figura 6.

Datos de ^{13}C -RMN para los compuestos **7**, **8** y **9**

	7^a	8^a	9^a
Posición	δ_{C} (100 MHz)	δ_{C} (100 MHz)	δ_{C} (100 MHz)
1	47.8	47.94	49.55
2	57.76	57.61	59.42
3	47.76	48.02	48.00
4	38.06	38.04	39.13
5	56.10	56.25	57.51
6	26.61	26.73	27.90
7	29.96	29.98	31.16
8	37.98	36.98	38.53
9	135.31	134.94	136.16
10	131.70	131.92	133.44
11	32.64	32.32	33.73
12	21.25	21.29	22.53
13 α	28.12	28.13	28.52
14 β	22.47	22.52	22.95
15	21.94	22.03	22.18
16	-	-	-
17	169.54	177.92	173.76
18	23.44	38.66	43.94
19		27.70	137.31
20		27.70	130.20
21		27.70	129.58
22			127.90
23			129.58
24			130.20
^a CD ₃ OD.			

Figura 7.

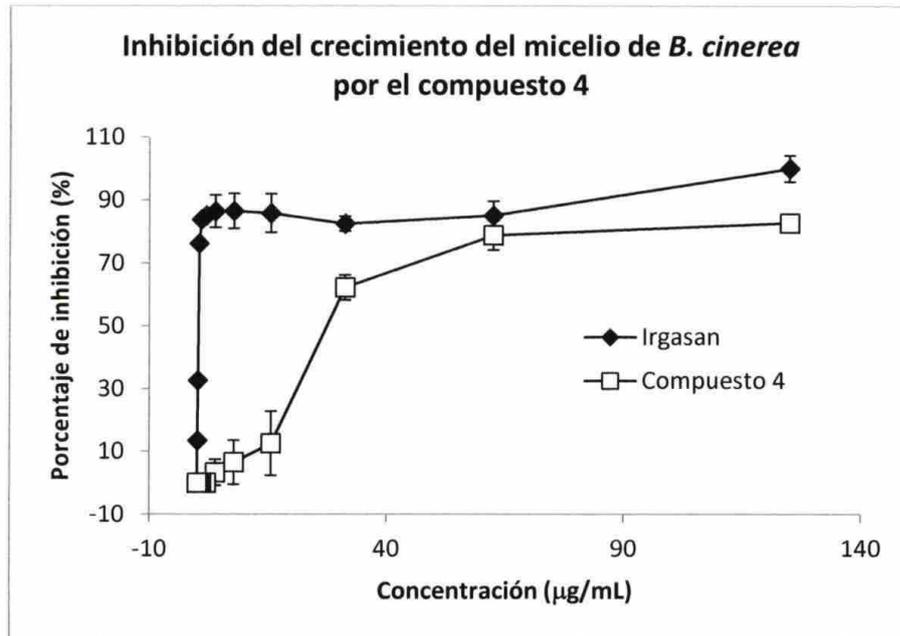


Figura 8.

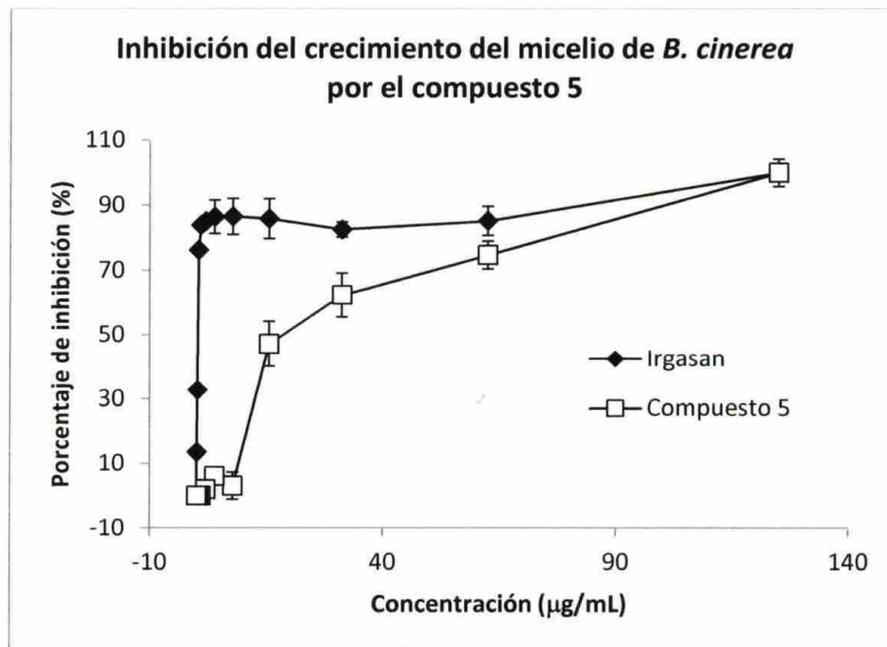


Figura 9.

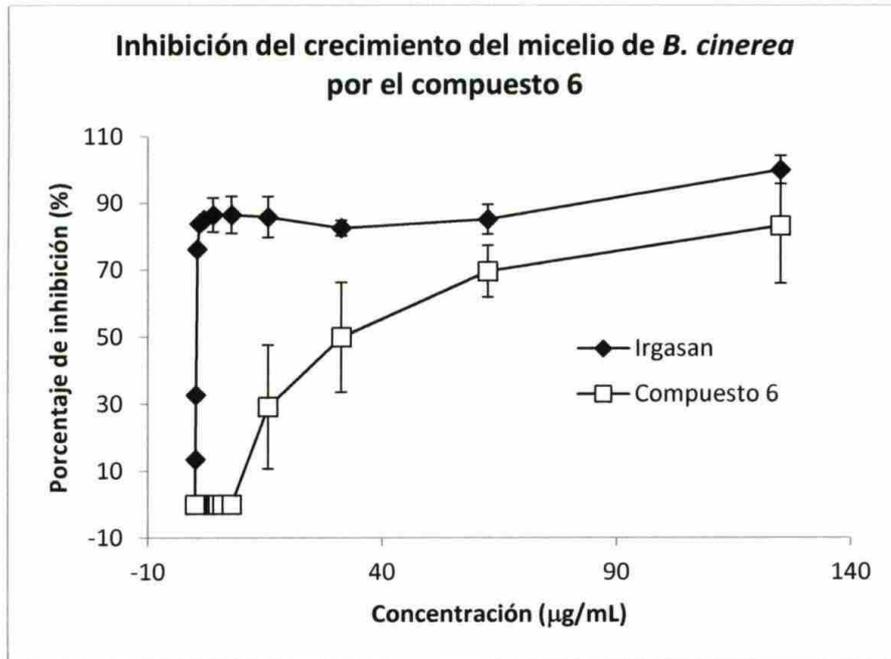


Figura 10.

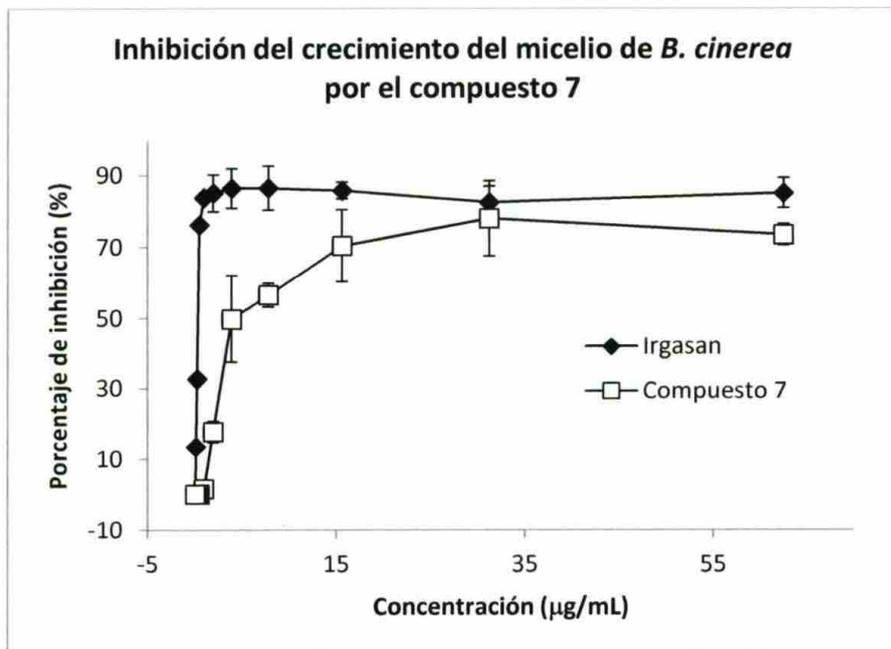


Figura 11.

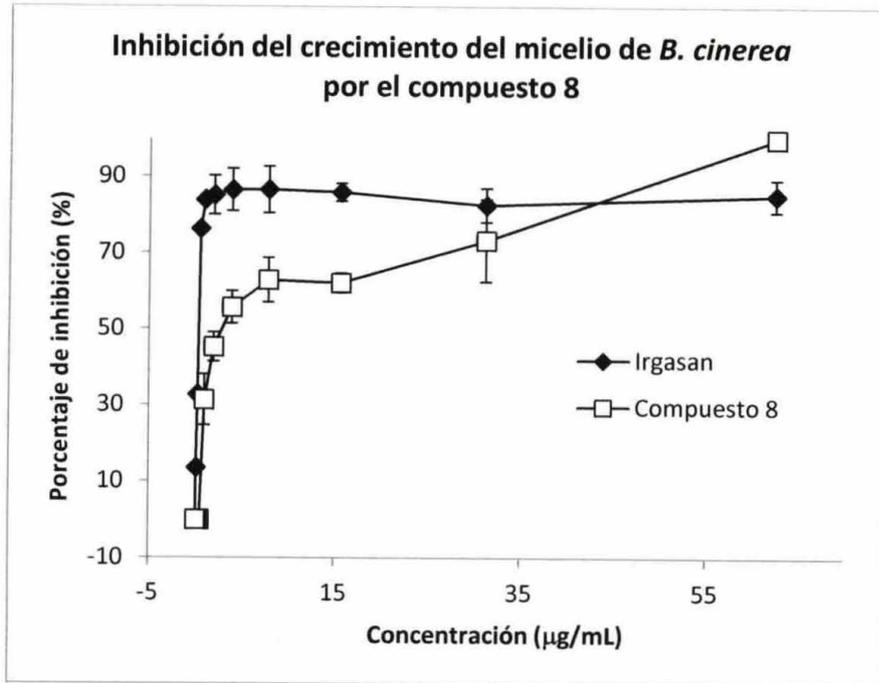


Figura 12.

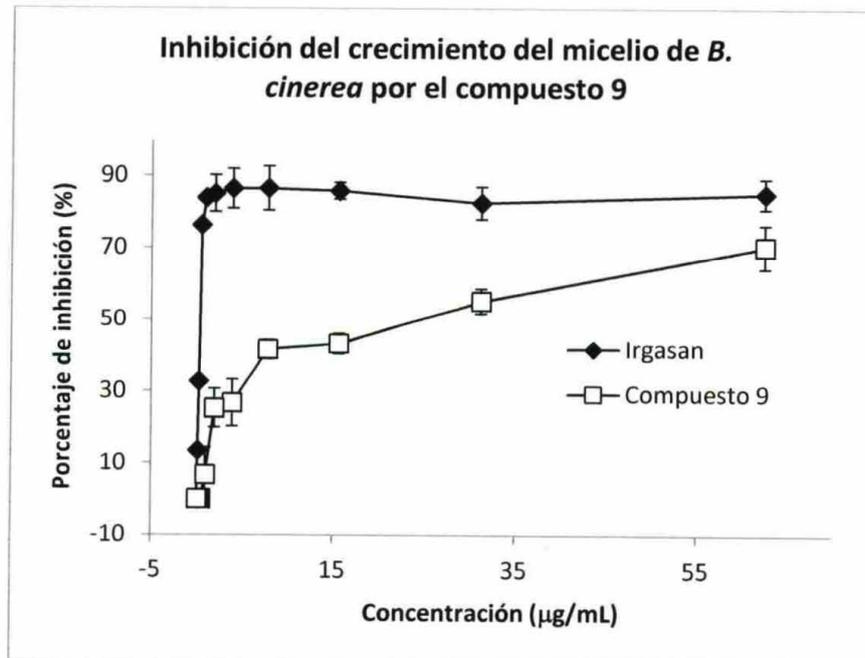


Figura 13.

Concentración mínima inhibitoria de los compuestos **4** a **9** e irgasan, para reducir un 50% (MIC₅₀), el crecimiento de la colonia tratada del hongo *B. cinerea* (MIC₅₀, µg/mL (µ M)).

Compuesto **4**: 23'8 µg/mL (85'3 µM)

Compuesto **5**: 13'6 µg/mL (42'4 µM)

Compuesto **6**: 25'0 µg/mL (70'4 µM).

Compuesto **7**: 3'2 µg/mL (12'2 µM).

Compuesto **8**: 3'2 µg/mL (10'6 µM).

Compuesto **9**: 11'6 µg/mL (34'4 µM).

Irgasan (5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi)fenol): 0'2 µg/mL (0'8 µM).

Figura 14



- ②① N.º solicitud: 201700028
②② Fecha de presentación de la solicitud: 11.01.2017
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	ES 2241482 A1 (UNIVERSIDAD DE CADIZ) 16-10-2005, página 8 fórmulas	1-8
A	A Macías-Sánchez et al, Synlett 2003, nº 13, pp 1989-1992. "Tin triflate catalysed selective synthesis of N,N'-unsymmetrically substituted N-(hydroxyclovanil)-N'aryl acetamidines", tabla 1 A Macías-Sánchez et al, Synlett 2003, nº 13, pp 1989-1992. "Tin triflate catalysed selective synthesis of N,N'-unsymmetrically substituted N-(hydroxyclovanil)-N'aryl acetamidines", tabla 1	1-8
A	L Sáiz-Urra et al, Journal of Agricultural and food Chemistry 2009, vol 57, pp 2420-2428. "Synthesis and quantitative structure-antifungal activity relationships of clovane derivatives against Botrytis cinérea", resumen L Sáiz-Urra et al, Journal of Agricultural and food Chemistry 2009, vol 57, pp 2420-2428. "Synthesis and quantitative structure-antifungal activity relationships of clovane derivatives against Botrytis cinérea", resumen	1-8

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
25.04.2017

Examinador
M. Fernández Fernández

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07C233/06 (2006.01)

A01N37/18 (2006.01)

A01N45/02 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07C, A01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, ESPACENET, CAS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 25.04.2017

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-8	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-8	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	ES 2241482 A1 (UNIVERSIDAD DE CADIZ)	16.10.2005
D02	Synlett 2003, nº 13, pp 1989-1992	2003

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La solicitud se refiere a los compuestos 2-N-acil-9-hidroxiclovánicos de fórmula general 1 y a sus homólogos reagrupados de fórmula 2 de la reivindicación 1, a los procedimientos de obtención de los compuestos citados (reivindicaciones 6-8) y a su uso, reivindicaciones 2-5, para el tratamiento de infecciones producidas por hongos fitopatógenos del género *Botrytis*.

Los documentos D1 y D2 divulgan, ver figura 4 de D1 y tabla 1 de D2, derivados de 9-hidroxiclovano análogos a los de la solicitud y sustituidos en la posición 2 por N, en D1 el grupo sustituyente es una amina y en D2 arilamina o acetamidina. No se han encontrado divulgados en el estado de la técnica los derivados sustituidos el posición 2 por un grupo amida por lo que los compuestos de la solicitud se consideran nuevos así como el procedimiento para su obtención. También se consideran inventivos pues un técnico en la materia no podría deducir a priori el efecto de un sustituyente 2-amido en la molécula para evaluar su actividad como inhibidores del crecimiento de hongos fitopatógenos.

En consecuencia se considera que las reivindicaciones 1-8 de la solicitud cumplen los requisitos de novedad y actividad inventiva previstos en los Art. 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes 11/1986.