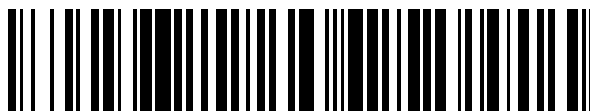


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 731 624**

51 Int. Cl.:

A01N 25/12 (2006.01)

C08L 101/00 (2006.01)

A01N 25/24 (2006.01)

A01N 25/30 (2006.01)

A01N 25/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.10.2010** **PCT/US2010/054164**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.05.2011** **WO11053605**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.10.2010** **E 10827405 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2019** **EP 2493291**

54 Título: **Dendrímeros PEHAM para su uso en agricultura**

30 Prioridad:

26.10.2009 US 254985 P

31.10.2009 US 256951 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

18.11.2019

73 Titular/es:

DENDRITIC NANOTECHNOLOGIES, INC. (50.0%)

1515 Commerce Drive, Suite C

Midland, MI 48642, US y

PRIOSTAR PTY LTD (50.0%)

72 Inventor/es:

HAYES, RAYAN, TERRELL;

OWEN, JAMES, DAVID;

CHAUHAN, ABHAY, SINGH y

PULGAM, VEERA, REDDY

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 731 624 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Dendrimeros PEHAM para su uso en agricultura

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere de forma amplia al uso de dendrimeros PEHAM en aplicaciones de agricultura, aunque más específicamente para la protección y el tratamiento de plantas y semillas con dendrimeros PEHAM específicos.

Descripción de la técnica anterior

15 Los dendrimeros son moléculas muy ramificadas, con frecuencia esféricas, en las que las ramas pueden estar terminadas en grupos amino cargados que se extienden desde una molécula núcleo central. Los dendrimeros terminados en amino tienen una densidad elevada de grupos amino cargados positivamente en la superficie, al igual que los dendrimeros PAMAM. Debido a una síntesis química controlada, los dendrimeros tienen un tamaño muy concreto y una forma definida.

20 Los dendrimeros PEHAM están relacionados con los dendrimeros PAMAM aunque se diferencian en al menos una o más de las siguientes características: Los dendrimeros PEHAM muestran una mayor estabilidad térmica, una construcción más rápida de la funcionalidad superficial con un mayor peso molecular a generaciones más bajas, reduciendo de este modo los costes de producción, una polidispersidad estrecha, un mayor volumen vacío interior, tienen una funcionalidad interior y/o grupos extensores en los brazos ramificados. Estos polímeros PEHAM se describen en la solicitud en Estados Unidos con n.º de serie 10/594776, presentada el 20 de abril de 2005 y la solicitud en Estados Unidos 11/630044, presentada el 21 de diciembre de 2005.

30 Se sabe que varias porciones activas deseadas que se usan en agricultura pierden eficacia o requieren una aplicación repetida debido a diversas condiciones ambientales. Las referencias siguientes tratan algunos de estos problemas. Cuando se trata una planta con una porción activa en un vehículo, tal como mediante pulverización sobre las hojas de las plantas, los problemas observados son la captación y la translocación de la porción activa deseada o la fotodegradación del ingrediente activo. Se han hecho varios intentos para minimizar tales resultados como la adición de un tensioactivo tal como Ethylan® TU [Baker, Edward A., *et al.*, *Pestic. Sci.* 34, 167-182 (1992)], o un tensioactivo de organosilicona [Stevens, Peter J. G., *et al.*, *Pestic. Sci.* 38, 237-245 (1993)], o Tinopal® [Reddy, N. P., *et al.*, *Pest Manag. Sci.* 64, 909-915 (2008)]. Otros planteamientos se refieren a la mejora de la retención sobre las hojas añadiendo óxido cuproso y oxiclورو de cobre con un agente dispersante [Large, E. C. *et al.*, *Annals of Applied Biol.*, 33 (1), 54-63 (1945), la mejora de la distribución local sobre las hojas debida al agua [Hislop, E. C. *et al.*, *Ann. Appl. Biol.* 66, 89-101 (1970)], la penetración de cutículas de hojas intactas por diversos herbicidas se midió y se encontró que era baja para diversos ingredientes activos [Baker, Edward A., *Pestic. Sci.* 29, 187-196 (1990)], y la retención de una pulverización de imazaquin, las pérdidas por escorrentía y lavado de las hojas en condiciones de lluvia se determinó que eran bastante elevadas [Reddy, Krishna N., *et al.*, *Pestic. Sci.* 48, 179-187 (1996)].

45 Adicionalmente, Se ha estudiado la fotodegradación por luz UV del ingrediente activo para tratar de minimizar este efecto sobre la pérdida de eficacia activa por diversos grupos, tal como para proteger a la anfotericina B [Tufteland, Megan L. *et al.*, *Pest Manag. Sci.* 65, 624-628 (2009), rimsulfurón [Scrano, Laura *et al.*, *Pestic. Sci.* 55, 995-961 (1999), fenarimol [Sur, Nivedita *et al.*, *Pest Manag. Sci.* 56, 289-292 (2000), flucitrinato [Chattopadhyaya S. *et al.*, *Pestic. Sci.* 31, 163-173 (1991), fosadona [Walia, S. *et al.*, *Pestic. Sci.* 25, 1-9 (1989), flucloralin [Saha, Tapas *et al.*, *Pest Manag. Sci.* 58, 179-182 (2001), flumioxazin [Kwon, Jeong-Wook, *et al.*, *Pest Manag. Sci.* 60, 939-943 (2004), bensulfurón-metilo [Si, You-Bin, *et al.*, *Pest Manag. Sci.* 60, 286-290 (2003), benzoilfenilurea [Marsella, Adam, *et al.*, *Pest Manag. Sci.* 56, 789-794 (2000)], y vinclozolin [Schick, Bernhard *et al.*, *Pestic. Sci.* 55, 1116-1122 (1999)]. Un método consiste en proteger el ingrediente activo de la radiación UV, tal como mediante vehículos nanoparticulados de nanopartículas de sílice huecas [Li, Zhu-Zhu *et al.*, *Pest Manag. Sci.* 63, 241-246 (2007), usar compuestos absorbentes [Hussain, Manzoor *et al.*, *Pestic. Sci.* 28, 345-355 (1990), glufosinato [Kocher, Helmut *et al.*, *Pestic. Sci.* 37, 155-158 (1993)], y 2-propanol y metil 12-hidroxiestearato [Schwack, Wolfgang *et al.*, *Pestic. Sci.* 40, 279-284 (1994)].

60 La patente US 6939831 describe el uso de dendrimeros que tienen 2-20 000 enlaces fósforo-nitrógeno con porciones activas en agricultura. Esta composición es siempre una composición de gel lo que limita su método de aplicación.

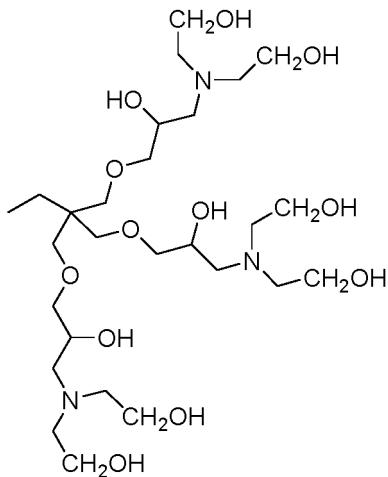
Estas reducciones conocidas de la utilidad de una porción agrícolamente activa hacen necesaria la aplicación repetida de la porción activa a la planta, lo que supone un coste adicional para estas aplicaciones repetidas y problemas medioambientales de la escorrentía o la retención en el suelo de la porción agrícolamente activa.

65

Claramente, se desea un modo de administrar porciones activas a las plantas, a la vez que se reduce la degradación por el efecto UV, se aumenta la solubilidad y la penetración de la porción activa, se reduce la cantidad de ingrediente activo que se ha de aplicar o se evitan aplicaciones repetidas para reducir el impacto ambiental.

5 Breve resumen de la invención

La presente invención proporciona una selección de polímeros dendríticos PEHAM previamente conocidos. Estos polímeros dendríticos PEHAM de la presente invención comprenden un dendrímero con la siguiente estructura:



y

asociado con al menos una entidad agrícolamente activa seleccionada entre atrazina y glifosato; y está presente al menos un diluyente o vehículo agrícolamente aceptable; y en el que la eficacia o la duración de la actividad de la entidad agrícolamente activa aumentan.

Estos dendrímeros PEHAM específicos se usan en una formulación con al menos una entidad agrícolamente activa para fines agrícolas, particularmente para aumentar la eficacia de la entidad agrícolamente activa de diversas maneras. Estas formulaciones son útiles especialmente para mejorar la solubilidad de la entidad agrícolamente activa en la formulación, mejorando la adhesión y la penetración de la entidad agrícolamente activa en las superficies de la planta, mejorando la resistencia al agua de la entidad agrícolamente activa en la planta o semilla, proporcionando protección a la entidad agrícolamente activa del daño por radiación UV, aumentando la penetración en el suelo de la entidad agrícolamente activa para alcanzar las raíces de las plantas o a las partes de las plantas por debajo del suelo, o reduciendo la degradación enzimática de la entidad agrícolamente activa por la planta o las semillas o los microorganismos del suelo. Estas mejoras de la formulación permiten reducir las cantidades de la entidad agrícolamente activa que se ha de aplicar o reducir el número de aplicaciones repetidas de la formulación, lo que reduce el impacto ambiental de la formulación y la entidad agrícolamente activa.

30 Descripción detallada de la invención

Glosario

Los términos siguientes tal como se usan en esta solicitud deben ser definidos tal como se indica a continuación y para estos términos, el singular incluye el plural.

- uma significa unidades de masa atómica
- BR o (BR) significa una célula ramificada
- C o (C) significa un núcleo de un dendrímero o dendrón
- m*-CPBA significa ácido *meta*-cloroperoxibenzoico
- DCM significa diclorometano
- DEA significa dietanolamina
- DEIDA significa dietiliminodiacetato
- DETA significa dietilentriamina
- DBA significa dibencilamina
- DI significa agua desionizada
- DMI significa dimetiltaconato
- DMSO significa dimetilsulfóxido
- EA significa etanolamina

EDA significa etilendiamina
 EPC significa etil-N-piperazinacarboxilato
 EPI significa epiclorhidrina, normalmente destilados adicionalmente antes de su uso
 Et significa etilo
 5 EtOH significa etanol
 EX o (EX) significa un extensor
 FF o (FF) significa un componente de funcionalidad de punto focal de un núcleo
 G significa una generación de dendrímeros, que viene indicada por el número de capas concéntricas de células
 ramificadas que rodean al núcleo (contadas normalmente de forma secuencial desde el núcleo)
 10 g significa gramo(s)
 h significa hora(s)
 HPLC significa cromatografía líquida de alta presión
 IDADS significa sal disódica del ácido iminodiacético
 IDA significa ácido iminodiacético
 15 IF o (IF) significa funcionalidad interior
 IMAE significa 2-imidazolidil-1-aminoetano
 IR (o FTIR) significa espectrometría de infrarrojos
 l significa litro(s)
 MeOH significa metanol
 20 mg significa miligramo(s)
 min significa minuto(s)
 ml significa mililitro(s)
 MWA significa asistido por microondas
 N-SIS significa estequiometría nanoescalar inducida estéricamente
 25 PAMAM significa poli(amidoamina), que incluye polímeros lineales y ramificados o dendrímeros con grupos
 terminales de amina primaria
 PEHAM significa dendrímero de poli(éter-hidroxilamina)
 PEI significa poli(etilenimina)
 PETAE significa pentaeritritol tetraalil éter
 30 PETGE significa pentaeritritol tetraglicidil éter
 Porcentaje o % significa en peso a menos que se indique lo contrario tal como peso/volumen (p/v) etc.
 PIPZ significa piperazina
 POPAM significa un núcleo de PPI rodeado por dendrones PAMAM
 PPI significa poli(propilenimina)
 35 TA significa temperatura ambiente, aproximadamente 20-25 °C
 SEC significa cromatografía de exclusión molecular
 SIS significa estequiometría inducida estéricamente
 TF significa una funcionalidad terminal
 TLC significa cromatografía de capa fina
 40 TMPTGE significa trimetilolpropano triglicidil éter
 TREN significa *tris*(2-aminoetil)amina
 TRIS significa *tris*(hidroximetil)aminometano
 UF significa separación por ultrafiltración
 UV-vis significa espectroscopía ultravioleta-visible

45 La biodisponibilidad de los productos agroquímicos requiere frecuentemente una optimización específica a fin de
 asegurar la mejor eficacia biológica a la menor tasa de aplicación posible y con el menor impacto sobre el medio
 ambiente. La aplicación de la formulación debe tener también una distribución homogénea sobre el cultivo, una fácil
 dilución con agua (el disolvente preferente de los agricultores), un óptimo rendimiento biológico, una manipulación
 50 sencilla y segura para los trabajadores, y el menor impacto ambiental. Esto se ha demostrado que es difícil de
 conseguir ya que el clima, los cultivos, las plagas y el suelo varían ampliamente en las regiones de cultivo.

Las formulaciones usadas en agricultura comprenden: un ingrediente activo (cuyas propiedades influyen
 considerablemente en la forma en la que puede estar la formulación, tales como la solubilidad, la lipofilidad, la
 55 estabilidad hidrolítica, la fotodegradación, etc.), otros ingredientes tales como tensioactivos, vehículos, excipientes
 (la función del presente dendrímero como vehículo para el ingrediente activo si bien realiza otras funciones). El tipo
 de formulación depende del objetivo biológico previsto y del método de aplicación requerido. Tipos de formulación
 habituales son: WG - gránulos dispersables en agua; SC - concentrado en suspensión; EC - concentrado
 emulsionable; y OD - dispersión oleosa.

60 Esta invención describe formulaciones de dendrímeros PEHAM que son útiles en aplicaciones de agricultura tales
 como la regulación y el control del desarrollo de plantas, semillas, insectos, microbios o plagas de animales.

Algunos aspectos de la presente invención se refieren al aumento de la eficacia de la entidad agrícola activa
 65 de diversas maneras, tales como mejorando la solubilidad de la entidad agrícola activa en la formulación,
 mejorando la adhesión de la entidad agrícola activa a las superficies de la planta, mejorando la resistencia al

agua (que incluye la resistencia a la lluvia de la entidad activa que se elimina por el lavado de la planta debido a la lluvia) de la entidad agrícolamente activa en la planta o semilla, mejorando la penetración (absorción) de la entidad agrícolamente activa en los tejidos de la planta, proporcionando protección a la entidad agrícolamente activa del daño por radiación UV, aumentando la penetración en el suelo de la entidad agrícolamente activa para alcanzar las raíces de las plantas o partes por debajo del suelo, o reduciendo la degradación enzimática de la entidad agrícolamente activa por la planta o las semillas o microorganismos del suelo.

Estructuras químicas de los polímeros dendríticos PEHAM

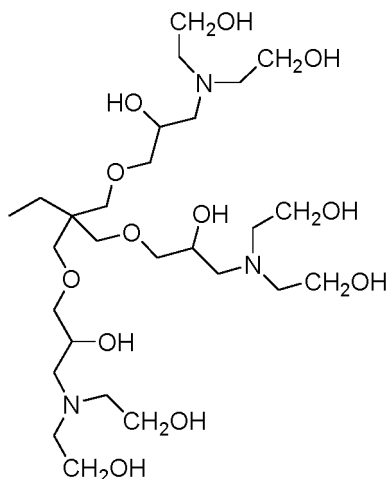
Las estructuras de los polímeros dendríticos PEHAM pueden ser dendrímeros, dendrones, polímeros arborescentes, polímeros tecto(dendrímeros) u otras arquitecturas dendríticas. Existen numerosos ejemplos de tales polímeros dendríticos en la bibliografía, tales como los descritos en el documento *Dendrimers and other Dendritic Polymers*, eds. J.M.J. Fréchet, D. A. Tomalia, pub. John Wiley and Sons, (2001) y otras de tales fuentes.

Estos polímeros dendríticos PEHAM pueden estar en cualquier forma física, tal como, por ejemplo, esferas, barras, tubos, o cualquier otra forma posible. La estructura interior puede tener un enlace interno escindible (tal como un disulfuro), un volumen vacío para encapsulación, o una funcionalidad interna (IF) tal como un hidróxido u otro grupo al que asociar el ingrediente activo. Adicionalmente, el polímero dendrítico PEHAM puede ser un dendrón. Este dendrón puede tener cualquier constituyente deseado de los polímeros dendríticos.

Los polímeros dendríticos de la presente invención son dendrímeros PEHAM que incluyen dendrones PEHAM. Estos dendrones PEHAM tienen las estructuras comentadas anteriormente y otras que se describen más adelante.

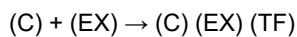
Síntesis general usada para preparar polímeros dendríticos PEHAM

1. Los polímeros dendríticos PEHAM s de la presente invención pueden tener la siguiente estructura:



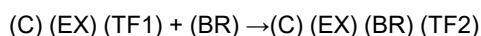
Los dendrímeros PEHAM se pueden preparar mediante un sistema de reacción acrilato-amina que comprende:

A. Hacer reaccionar un núcleo con funcionalidad acrilato con un extensor con funcionalidad amina, tal como se muestra a continuación:



en la que (C) = un núcleo con funcionalidad acrilato tal como TMPTA; (EX) = un extensor con funcionalidad amina tal como PIPZ; y (TF) = amina; y

B. Hacer reaccionar un reactivo de núcleo extendido con funcionalidad amina (C) (EX) (TF1) con un reactivo de célula ramificada (BR) con funcionalidad acrilato tal como se muestra a continuación:



en la que (C) = TMPTA; (EX) = PIPZ; (TF1) = amina; (BR) = TMPTA; y (TF2) = acrilato; y

en la que para ambas etapas A y B

la adición de un grupo extensor (EX) a un núcleo, la relación molar (EX)/(C) se define como los moles de moléculas de extensor (EX) con respecto a los moles de grupos funcionales reactivos en el núcleo simple, núcleo de

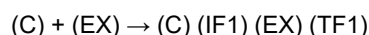
andamiaje, supernúcleo, o estructura generacional actual (es decir, N_c) en la que se usa un exceso de (EX) cuando se desea una cobertura completa;

la adición de una célula ramificada (BR) a un núcleo simple, núcleo de andamiaje, la relación molar (BR)/(C) se define como los moles de moléculas de célula ramificada (BR) con respecto a los moles de grupos funcionales reactivos en el núcleo simple, núcleo de andamiaje, supernúcleo, o estructura generacional actual (es decir, N_c) en la que se usa un exceso de (BR) cuando se desea una cobertura completa; y

el nivel de adición de células ramificadas (BR) o extensores (EX) a un núcleo, núcleo de andamiaje, supernúcleo, o producto generacional actual se pueden controlar mediante la relación molar añadida o mediante N-SIS.

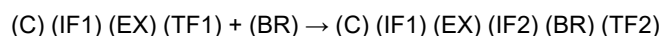
Un procedimiento para preparar los polímeros dendríticos de la invención puede ser un sistema de reacción de apertura de anillo que comprende:

A. Hacer reaccionar un núcleo con funcionalidad epoxi con un extensor con funcionalidad amina, tal como se muestra a continuación:



en la que (C) = un núcleo con funcionalidad epoxi tal como PETGE; (IF1) = hidroxilo (OH) interno; (EX) = piperazina (PIPZ); (TF1) = amina; y

B. Hacer reaccionar un reactivo de núcleo extendido con funcionalidad amina (C) (IF1) (EX) (TF1) con un reactivo de célula ramificada con funcionalidad epoxi tal como se muestra a continuación:



en la que (C) = PETGE; (IF1) = porción con funcionalidad interna tal como se define en la reivindicación 1, tal como OH; (EX) = porción extensora tal como se define en la reivindicación 1, tal como PIPZ; (TF1) = amina; (BR) = un reactivo de célula ramificada con funcionalidad epoxi tal como PETGE; y (IF2) = porción con funcionalidad interna tal como se define en la reivindicación 1, tal como OH; (TF2) = amina; y

en la que para ambas etapas A y B

la adición de un grupo extensor (EX) a un núcleo, la relación molar (EX)/(C) se define como los moles de moléculas de extensor (EX) con respecto a los moles de grupos funcionales reactivos en el núcleo simple, núcleo de andamiaje, supernúcleo, o estructura generacional actual (es decir, N_c) en la que se usa un exceso de (EX) cuando se desea una cobertura completa;

la adición de una célula ramificada (BR) a un núcleo simple, núcleo de andamiaje, la relación molar (BR)/(C) se define como los moles de moléculas de célula ramificada (BR) con respecto a los moles de grupos funcionales reactivos en el núcleo simple, núcleo de andamiaje, supernúcleo, o estructura generacional actual (es decir, N_c) en la que se usa un exceso de (BR) cuando se desea una cobertura completa; y

el nivel de adición de células ramificadas (BR) o extensores (EX) a un núcleo, núcleo de andamiaje, supernúcleo, o producto generacional actual se pueden controlar mediante la relación molar añadida o mediante N-SIS.

Un planteamiento químico ortogonal es la cicloadición 1,3-dipolar de (C) y (BR) que contienen azida a (C) y (BR) que contienen alquinos. Los (C) que contienen alquino pueden tener de 1 a N_c restos alquino presentes y las (BR) que contienen alquino pueden tener de 1 a N_b-1 restos alquino. Los otros grupos reactivos presentes en (C) o (BR) pueden ser cualquiera de los grupos (BR) enumerados anteriormente en el presente documento. Los (C) y (BR) que contienen azida son producidos mediante una apertura de anillo nucleófila de anillos epoxi con iones azida. La reacción posterior de estos grupos reactivos puede proporcionar enlaces triazol a nuevas porciones (BR) o (TF) usando la química de clic tal como lo describen Michael Malkoch *et al.*, en *J.Am.Chem.Soc.* 127, 14942-14949 (2005).

El documento WO 2007/149501 enseña una síntesis MWA que exhibe ventajas inesperadas y muy notorias en comparación con el procesamiento térmico. Se observó que la síntesis MWA producía productos poliméricos dendríticos (es decir, dendrímeros / dendrones) de mayor pureza en condiciones más suaves, con menores tiempos de reacción (minutos frente a días), a la vez que requería solamente cantidades estequiométricas o un ligero exceso de reactivos de reacción. El polímero dendrítico como material de partida o como (C) deseado se hace reaccionar con una BR o un EX para obtener el producto polimérico dendrítico deseado. Se pueden usar disolventes adecuados en caso de que el reactante no funcione también como disolvente. Las condiciones suaves para la reacción en comparación con las de la reacción térmica anterior llevan a menos subproductos, menos etapas de purificación del producto polimérico dendrítico deseado. Los tiempos de reacción son significativamente menores en comparación con las del proceso térmico anterior. Así, esta síntesis MWA es menos costosa de realizar para preparar el producto deseado.

Cualquiera de los procesos anteriores se puede usar para preparar los dendrímeros PEHAM empleados en la presente invención.

Estos dendrímeros, una invención de selección de los dendrímeros PEHAM de la solicitud en Estados Unidos con n.º de serie 10/594776, presentada el 20 de abril de 2005 y la solicitud en Estados Unidos 11/630044, presentada el 21 de diciembre de 2005, son sorprendentemente eficaces para su uso en estas formulaciones para agricultura. Su tamaño, mayor (TF) para su baja G mantiene los costes más bajos, es más fácil de preparar y confiere propiedades deseables para tales formulaciones.

La entidad agrícolamente activa que se asocia o se encapsula con estos dendrímeros se selecciona entre atrazina y glifosato.

Los polímeros dendríticos PEHAM de fórmula (I) pueden ser útiles como: vehículos conjugados a la superficie o asociados a la superficie (como sea posible según sus variantes de forma de elipsoides, esferas, barras, polímeros arborescentes, hiper-ramificados aleatorios, tecto(dendrimeros) núcleo-capa) que se pueden modificar adicionalmente mediante la variedad de grupos de superficie (TF) presentes; vehículos encapsulados (ya esté asociada la entidad agrícolamente activa al interior (IF) o simplemente atrapada) para su uso en una formulación agrícolamente activa de liberación prolongada, con enlaces escindibles en la estructura del polímero dendrítico para liberación prolongada y pH u otros cambios deseados una vez aplicada, diferencias de solubilidad entre el interior y la superficie del polímero dendrítico, una cantidad de entidad agrícolamente activa posible por polímero dendrítico PEHAM debido a la generación o la forma; y la precisión de su forma permiten su uso como patrones de tamaño molecular, agentes de calibración, y plantillas porógenas para la penetración en la planta, como hojas o semillas, tal como su recubrimiento.

La entidad agrícolamente activa está asociada al interior, a la superficie o tanto al interior como a la superficie de estos dendrímeros PEHAM y los grupos pueden ser iguales o diferentes. Tal como se usa en el presente documento "asociada a" significa que la entidad o entidades agrícolamente activas pueden estar físicamente encapsuladas o atrapadas en el interior del dendrímero, dispersadas parcialmente o totalmente en todo el dendrímero, o unidas al dendrímero o cualquier otra combinación de los mismos, en el que la unión o la conexión es mediante enlaces covalentes, enlaces de hidrógeno, adsorción, absorción, enlaces metálicos, fuerzas de Van der Waals o enlaces iónicos, o cualquier combinación de los mismos. La asociación de la entidad o entidades agrícolamente activas y el dendrímero o dendrímeros opcionalmente puede emplear conectores y/o espaciadores o agentes quelantes para facilitar la preparación o el uso de estas formulaciones. Grupos conectores adecuados son grupos que unen un director de direccionamiento (es decir, T) al dendrímero (es decir, D) sin alterar significativamente la eficacia del director o la eficacia de la entidad o entidades agrícolamente activas presentes en la combinación de dendrímero y entidad agrícolamente activa. Estos grupos conectores pueden ser escindibles o no escindibles y se usan normalmente para evitar un impedimento estérico entre el director de direccionamiento y el dendrímero; preferentemente los grupos conectores son estables (es decir, no escindibles) a menos que el sitio de liberación tenga la capacidad de escindir el conector presente (por ejemplo, un conector escindible con ácido para la liberación en la superficie de la célula o en el compartimento endosómico). Puesto que el tamaño, la forma y la densidad del grupo funcional de estos dendrímeros se pueden controlar rigurosamente, existen muchas formas en las que el material transportado puede asociarse al dendrímero. Por ejemplo, (a) puede haber una asociación de tipo covalente, culombica, hidrófoba o quelante entre la entidad o entidades agrícolamente activas presentes y las entidades, normalmente grupos funcionales, localizadas en la superficie del dendrímero o próximas a la misma; (b) puede haber una asociación de tipo covalente, culombica, hidrófoba o quelante entre la entidad o entidades agrícolamente activas presentes y las porciones localizadas en el interior del dendrímero; (c) el dendrímero se puede preparar de forma que tenga un interior que es mayoritariamente hueco (es decir, un espacio vacío lleno de disolvente) lo que permite atrapar físicamente la entidad agrícolamente activa en el interior (volumen vacío), en el que la liberación de la entidad agrícolamente activa se puede controlar opcionalmente mediante acumulación en la superficie del dendrímero de restos de control de la difusión, (d) en el que el dendrímero tiene grupos de funcionalidad interna (IF) presentes que también pueden estar asociados a la entidad agrícolamente activa, posee una (IF) escindible que puede permitir la salida controlada (es decir, dependiente del pH) del interior del dendrímero o (e) se pueden emplear diversas combinaciones de los fenómenos anteriormente mencionados.

La formulación de la presente invención comprende al menos un dendrímero PEHAM asociado a al menos una entidad agrícolamente activa. Ambos componentes pueden tener más de un tipo presente; por tanto, más de un dendrímero PEHAM y más de una entidad agrícolamente activa pueden estar presentes en una formulación.

La formulación también tiene presente al menos un diluyente o vehículo agrícolamente aceptable. El tipo de diluyente o vehículo agrícolamente aceptable empleado depende del uso final o de las condiciones climáticas o edáficas. Algunos de estos diluyentes o vehículos son cualquier aditivo sólido o líquido correspondiente a las técnicas de formulación habituales que es aceptable para usos en agricultura y se pueden formular como líquidos, pulverizaciones, aceites, emulsiones, suspensiones, gránulos, polvos, espolvoreos, y otras formulaciones habituales.

También pueden estar presentes otros aditivos habituales tales como adyuvantes, agentes antiaglomerantes; colorantes, espesantes, tensioactivos, compuestos antiespumantes, detergentes tales como sales de metales alcalino-térreos, dispersantes, agentes alcalinizantes tales como bases, aglutinantes, emulsionantes, agentes oxidantes tales como aceptores de radicales libres o destructores catalíticos de hidroperóxidos, agentes anticorrosión, atrayentes y/o sustancias alimentarias para la preparación de cebos insecticidas en particular. Estos

aditivos pueden estar presentes en las formulaciones de acuerdo con la invención en cantidades de entre un 0 y un 75 % en peso de dichas formulaciones.

Asimismo, de acuerdo con las necesidades, la naturaleza de las enfermedades que se vayan a tratar, de los insectos y/o plagas de animales y/o de las malas hierbas que se vayan a controlar, destruir o erradicar, los niveles de infestación de estas plagas, las condiciones climáticas y/o edáficas, las formulaciones de acuerdo con la presente invención puede contener una o más entidades agrícolamente activas del tipo que incluye fungicidas y/o insecticidas y/o acaricidas y/o rodenticidas y/o nematocidas y/o repelentes de insectos y/o plagas de animales y/o agentes reguladores del desarrollo de las plantas y/o insectos y/o una o más sustancias activas herbicidas.

Esta formulación se usa en un método para tratar plantas o semillas con tal formulación tal como se ha descrito anteriormente, preferentemente con un adyuvante y/o vehículo para facilitar su aplicación, para mejorar la adhesión de la entidad agrícolamente activa a las superficies de la planta, para mejorar la resistencia al agua de la entidad agrícolamente activa en la planta o semilla, para protección de la entidad agrícolamente activa del daño por radiación UV mediante el uso de la formulación, protección de la planta o semilla del daño por radiación UV mediante el uso de la formulación, aumento de la penetración en el suelo de la entidad agrícolamente activa o reducción de la adhesión al suelo de la entidad agrícolamente activa de modo que esta llegue a las raíces de las plantas o partes de las plantas por debajo del suelo, o reducción de la degradación enzimática de la entidad agrícolamente activa por la planta o las semillas o los microorganismos del suelo. Estos métodos permiten la reducción de las pérdidas de la entidad agrícolamente activa en el entorno tal como por escorrentía de agua, la reducción de la cantidad de aplicación requerida de la entidad agrícolamente activa mientras se mantiene la eficacia de la entidad agrícolamente activa, y permiten una mejor dispersión y una menor viscosidad de la formulación de modo que la entidad agrícolamente activa se usa de forma más eficiente y eficaz.

Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se cree que los dendrímeros PEHAM proporcionan una mayor solubilización de la entidad agrícolamente activa y/o una menor viscosidad y/o una mejor dispersión mediante una serie de métodos, tales como la absorción de fotones UV por la macromolécula dendrítica a fin de reducir la fotodegradación de la entidad agrícolamente activa, el aumento de la solubilidad mediante encapsulación de la entidad agrícolamente activa menos soluble siendo la superficie del dendrímero mucho más soluble en el medio deseado, usando una química de superficie del dendrímero PEHAM este puede penetrar en el suelo, las raíces, las hojas y las semillas tal como su recubrimiento para alcanzar las células o tratar las plagas de modo que se reduzca la eliminación de la entidad agrícolamente activa por la lluvia. Cuando son modificados los grupos de superficie sobre el dendrímero como la (TF) o por la entidad agrícolamente activa, se proporciona la adhesión a la superficie de las hojas, semillas y otras superficies.

Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se cree que los dendrímeros PEHAM de fórmula (I) o bien se asocian a la entidad agrícolamente activa o bien actúan como excipiente que potencia las propiedades de la formulación mencionadas.

Equipo y métodos

Cromatografía de exclusión molecular (SEC)

Se evaporó una solución metanólica de dendrímero purificado en Sephadex® (Farmacia) y se reconstituyó con la fase móvil usada en el experimento de SEC (concentración de 1 mg/ml). Todas las muestras se prepararon en el momento y se usaron inmediatamente para la SEC.

Los dendrímeros se analizaron cualitativamente mediante el sistema SEC (Waters 1515) que se realizó en modo isocrático con un detector de índice de refracción (Waters 2400 y Waters 717 Plus Auto Sampler). El análisis se llevó a cabo a TA en dos columnas de gel TSK GEL (Supelco), alineadas en serie, G3000PW y G2500PW, tamaño de partícula 10 µm, 30 cm x 7,5 mm. Se bombeó la fase móvil de tampón de acetato (0,5 M) a una velocidad de flujo de 1 ml/min. El volumen de elución del dendrímero se observó que era de 11-16 ml de acuerdo con la generación del dendrímero.

Cromatografía líquida de alto rendimiento/alta presión (HPLC)

La cromatografía líquida de alta presión (HPLC) se llevó a cabo usando un aparato Perkin Elmer® Serie 200 equipado con detectores de índice de refracción y de luz ultravioleta y una columna Waters Symmetry® C₁₈ (5 µm) (4,6 mm de diámetro, 150 mm de longitud). Un protocolo de separación normal estaba constituido por un 0,1 % de ácido acético acuoso y acetonitrilo (75:25 % v/v) como eluyente y luz UV a λ = 480 nm como detector.

Cromatografía de capa fina (TLC)

Se usó cromatografía de capa fina para controlar el progreso de las reacciones químicas. Una gota de material, generalmente una solución de 0,05 M a 0,4 M en disolvente orgánico, se añade a una placa de gel de sílice y se coloca en una cámara de disolvente, y se deja desarrollar durante generalmente 10-15 min. Una vez que se ha

eluido el disolvente, la placa de TLC se seca generalmente y después se tiñe (tal como se describe más adelante). Debido a que el gel de sílice es un soporte polimérico polar, las moléculas menos polares se desplazarán más hacia arriba a lo largo de la placa. El valor " R_f " se usa para identificar la distancia que ha recorrido el material sobre una placa de TLC. La modificación de las condiciones del disolvente modificará posteriormente el valor de R_f . Este R_f se mide por la relación entre la longitud que ha recorrido el producto con respecto a la longitud que ha recorrido el disolvente.

Materiales: Las placas de TLC usadas eran (1) "Thin Layer Chromatography Plates - Whatman®" PK6F, gel de sílice sobre vidrio, tamaño 20 x 20 cm, espesor de la capa: 250 μm o (2) "Thin Layer Chromatography Plate Plastic sheets - EM Science", sobre aluminio, tamaño 20 x 20 cm, espesor de la capa: 200 μm .

Las condiciones de tinción fueron las siguientes: (1) Ninhidrina: Se prepara una solución con 1,5 g de ninhidrina, 5 ml de ácido acético y 500 ml de etanol al 95 %. La placa se sumerge en la solución de ninhidrina, se seca y se calienta con una pistola de calor hasta que se produce un cambio de color (manchas rosas o púrpuras indican la presencia de amina). (2) Cámara de yodo: se disponen 2-3 g de I_2 en un recipiente cerrado. La placa de TLC se coloca en la cámara durante 15 min y las manchas de producto se tiñen de marrón. (3) Tinción con KMnO_4 : Se prepara una solución con 1,5 g de KMnO_4 , 10 g de K_2CO_3 , 2,5 ml de NaOH al 5 % y 150 ml de agua. La placa de TLC se sumerge en la solución de KMnO_4 y las manchas se vuelven amarillas. (4) Examen UV: Se usa una lámpara de ultravioleta (UV) para iluminar las manchas de producto. Se usan longitud de onda corta (254 nm) y longitud de onda larga (365 nm) para la identificación del producto.

Espectrometría de masas MALDI-TOF

Se obtuvieron espectros de masa en un espectrómetro de masas Bruker Autoflex® LRF MALDI-TOF con extracción iónica pulsada. Se adquirieron intervalos de masa inferiores a 20 kDa en modo reflector usando una tensión de la muestra de 19 kV y una tensión del reflector de 20 kV. Se usó poli(óxido de etileno) para la calibración. Se adquirieron intervalos de masas más elevados en modo lineal usando una tensión de la muestra de 20 kV. Los intervalos de masas más elevados se calibraron con albúmina de suero bovino.

De forma habitual, se prepararon muestras combinando una alícuota de 1 μl de una solución de 5 mg/ml del analito con 10 μl de la solución matriz. A menos que se indique lo contrario, la solución matriz era 10 mg/ml de ácido 2,5-dihidroxibenzoico en acetonitrilo:agua 3:7. Se repartieron alícuotas (2 μl) de la muestra/solución matriz sobre la placa deseada y se dejó secar al aire a TA.

Separación por ultrafiltración (UF)

Un protocolo normal de separación por ultrafiltración es tal como sigue: Se disolvió una mezcla de producto y de compuestos no deseados en el volumen apropiado de un disolvente para esta mezcla (por ejemplo, 125 ml de MeOH) y se ultrafiltró en un dispositivo de flujo UF tangencial, que contenía membranas de celulosa regeneradas con un límite de peso molecular de 3K a una presión de 20 psi (137,9 kPa) a 25 °C. El volumen de retenido marcado en el matraz se mantuvo a 100-125 ml durante la recogida UF de 1500 ml de permeado (~ 5 horas). Se eliminaron los volátiles del primer litro de permeado en un rotavapor, seguido de una evacuación a alto vacío para dar el producto purificado. Dependiendo del método de separación específico, el tamaño límite de la membrana (por ejemplo, 3K, 2K o 1K) y el volumen de permeado y retenido variaban.

Separación en Sephadex®

El producto se disuelve en la mínima cantidad de un disolvente (agua, PBS o MeOH) y se purifica a través de una columna Sephadex® LH-20 (Farmacia) en el disolvente. Tras eluir el volumen vacío de la columna, se recogen las fracciones en alícuotas de aproximadamente 2-20 ml, dependiendo de la separación respectiva de la que se trate. La TLC, usando un disolvente apropiado tal como se ha descrito anteriormente, se emplea para identificar fracciones que contienen mezclas de productos similares. Se combinan las fracciones similares y el disolvente se evapora para dar un producto sólido.

Resonancia magnética nuclear (RMN) - ^1H y ^{13}C

Preparación de las muestras:

A 50-100 mg de una muestra seca se añadieron 800-900 μl de un disolvente deuterado para disolverla. Se usan los patrones de referencia habituales, es decir, trimetilsilano. Disolventes normales son CDCl_3 , CD_3OD , D_2O , $\text{DMSO}-d_6$, y acetona- d_6 . La muestra disuelta se transfirió a un tubo de RMN hasta una altura del tubo de ~ 5,5 cm.

Equipo: (1) Los datos de RMN de 300 MHz se obtuvieron en un sistema de espectrómetro RMN de 300 MHz y 2 canales Varian® Mercury Plus usando una sonda de automatización de banda ancha para triple resonancia (ATB), H/X (en la que X se puede ajustar de ^{15}N a ^{31}P). La adquisición de datos se obtuvo en un ordenador Sun Blade® 150 con un sistema operativo Solaris® 9. El software usado era VNMR v6.1C. (2) Los datos de RMN de 500 MHz se

obtuvieron en un sistema de espectrómetro RMN de 500 MHz y 3 canales Varian® Innova de 500 MHz usando una sonda conmutable, H/X (X se puede ajustar de ^{15}N a ^{31}P). La adquisición de datos se obtuvo en un ordenador Sun Blade® 150 con un sistema operativo Solaris® 9. El software usado era VNMR v6.1C.

5 Espectrometría de infrarrojos (IR o FTIR)

Los datos de los espectros de infrarrojos se obtuvieron en un espectrómetro de infrarrojos con transformada de Fourier Nicolet®, Modelo G Serie Omnic, Sistema 20 DXB. Las muestras se usaron puras empleando placas de la sal bromuro potásico (Aldrich).

10

Espectrometría ultravioleta/visible (UV/Vis)

Los datos de los espectros de UV-Vis se obtuvieron en un espectrofotómetro UV/VIS Perkin Elmer® Lambda 2 usando una longitud de onda de luz con alta absorción por la muestra respectiva, por ejemplo, 480 o 320 nm.

15

La invención se ilustrará adicionalmente considerando los siguientes ejemplos, que pretenden ser puramente ilustrativos de la presente invención.

20 Ejemplo 1 (fuera del alcance de la invención): Reacción del pentaeritritol tetraglicidil éter 1 con la tris(2-aminoetil)amina (TREN) 2 para producir una superficie de amina primaria

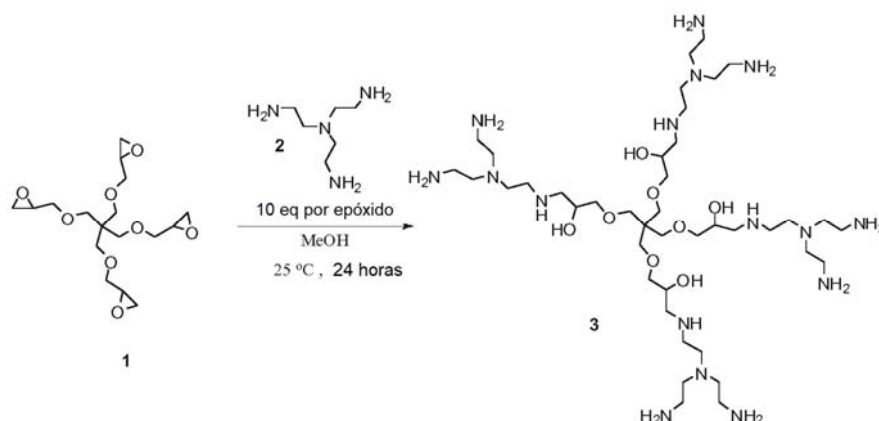
[(C) = PETGE; (IF1) = OH; (BR1) = TREN; (TF) = NH_2 primaria; G= 1]

25 A un matraz de fondo redondo de 50 ml que contenía una barra de agitación se añadieron la TREN 2 (16,0 g, 109 mmol, 10 eq por epóxido) y 4 ml de MeOH y se enfriaron a $\sim 25^\circ\text{C}$. A esta mezcla agitada se añadió gota a gota una solución del PETGE 1 (1,0 g, 2,78 mmol, 11,1 mmol de epóxido) en 2 ml de MeOH. La mezcla se agitó durante 24 h a 25°C en una atmósfera de N_2 . El material volátil se destiló mediante evaporación rotatoria para dar un residuo bruto que se destiló matraz a matraz usando un aparato Kugelrohr a $200\text{--}230^\circ\text{C}$ a alto vacío para dar 2,4 g de residuo. El espectro de masas MALDI-TOF de este material mostraba un espectro bien definido para el aducto 4:1 deseado a una masa de 967 uma $[\text{M}+\text{Na}]^+$ y una señal menor para el aducto 3:1 a una masa de 799 uma $[\text{M}+\text{Na}]^+$. La TLC (50 % de NH_4OH en MeOH) mostraba la ausencia de TREN. El espectro de RMN ^{13}C mostraba los picos esperados para un producto puro 3 (2,4 g, 92 % de rendimiento). Sus espectros son los siguientes:

30

35 RMN ^{13}C : (125 MHz, CDCl_3) δ 39,63; 35,36; 47,30; 52,64; 54,01; 57,24; 68,10; 70,33; 74,64; y
MS MALDI-TOF: $\text{C}_{42}\text{H}_{101}\text{N}_{16}\text{O}_8$; Calc. 944,3, encontrado 967 uma $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

El siguiente Esquema 1 ilustra esta reacción.



40

Esquema 1

Ejemplo 2: Apertura del anillo usando un reactivo de célula ramificada con funcionalidad dihidroxil amino: Dendrímico PEHAM terminado en hidroxilo (G = 1) a partir de trimetilolpropano triglicidil éter y dietanolamina

45 [(C) = TMPTGE; (FF) = Et; (IF1) = OH; (BR1) = DEA; (TF) = OH; G= 1]

Se dispusieron la DEA 5 (7,82 g, 74,47 mmol) (Aldrich) y 120 ml de MeOH seco (Aldrich), ambos sin purificación adicional, en un matraz de fondo redondo y una boca de 250 ml secado al horno. El matraz estaba equipado con una barra de agitación y un septo. Se disolvió el TMPTGE 4 (5 g, 16,55 mmol) en 40 ml de MeOH seco y se añadió gota a gota a la solución anterior en agitación a través de un embudo compensador de presión durante un periodo de 1 h a TA. El embudo se sustituyó por un condensador de reflujo y se calentó a 60°C durante 60 h en atmósfera de N_2 .

50

El disolvente se eliminó en un rotavapor a presión reducida para dar un líquido incoloro transparente. La mezcla de reacción total se transfirió a un matraz de fondo redondo y una boca de 100 ml. La DEA 5 en exceso se separó mediante destilación Kugelrohr a presión reducida a 180-190 °C. Se recuperó el producto, el compuesto 6 (9,76 g; 95,53 % de rendimiento) en forma de un líquido viscoso transparente. Sus espectros son los siguientes:

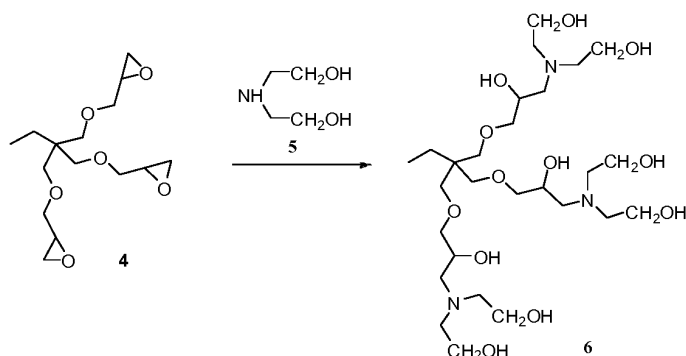
RMN ¹H: (300 MHz, CD₃OD): δ 0,87 (t, J = 7,50 Hz, 3H, CH₃), 1,43 (c, CH₂, J = 7,20 Hz, 2H), 2,52-2,79 (m, 18H), 3,32 (s, 3H, 3 x OH), 3,50 (s, 6H), 3,40 (d, J = 5,10 Hz, 6H), 3,54-3,67 (m, 12H), 3,93 (sextuplete, J = 5,10 Hz, 3H), 4,85 (s, 6H, 6 x OH); y

RMN ¹³C: (75 MHz, CD₃OD): δ 6,93, 22,76, 43,43, 57,42 - 58,51, 59,47, 68,32, 71,56, 73,72; y

IR (puro): λ_{max} 3354, 2939, 2817, 1454, 1408, 1367, 1321, 1280, 1111, 1081, 1070, 871, 778 cm⁻¹; y

MS MALDI-TOF: C₂₇H₅₉N₃O₁₂ Calc. 617; encontrado 641 uma (M+Na).

El siguiente Esquema 2 ilustra esta reacción:



Esquema 2

Ejemplo 3 (fuera del alcance de la invención): Reacción de pentaeritritol tetraglicidil éter con dietiliminodiacetato (DEIDA)

[(C) = PETGE; (IF1) = OH; (BR1) = DEIDA; (TF) = éster etílico; G= 1,5]

A una solución de DEIDA, compuesto 7 (5,67 g, 30 mmol) (Aldrich) en 35 ml de EtOH (Aldrich) se añadió una solución de PETGE, compuesto 1 (1,8 g, 5 mmol, 20 mmol de epoxi) en 20 ml de EtOH (Aldrich) gota a gota durante un periodo de 30 min a través de un embudo de adición. El matraz se adaptó con un condensador de reflujo, una entrada de gas N₂, y se colocó en un baño de aceite precalentado a 60 °C. Después de calentar durante 1 día, el análisis MS MALDI-TOF mostró la masa calculada para la estructura perfecta y los tres productos sustituidos. Se continuó el calentamiento durante 36 h, después el disolvente se eliminó en un rotavapor, dando un líquido de color marrón claro. El exceso de DEIDA se separó por destilación en un aparato de destilación Kugelrohr a 175 °C para dar un líquido viscoso, que se identificó como el producto deseado, compuesto 8, (4,99 g, 89,4 %). Sus espectros son los siguientes:

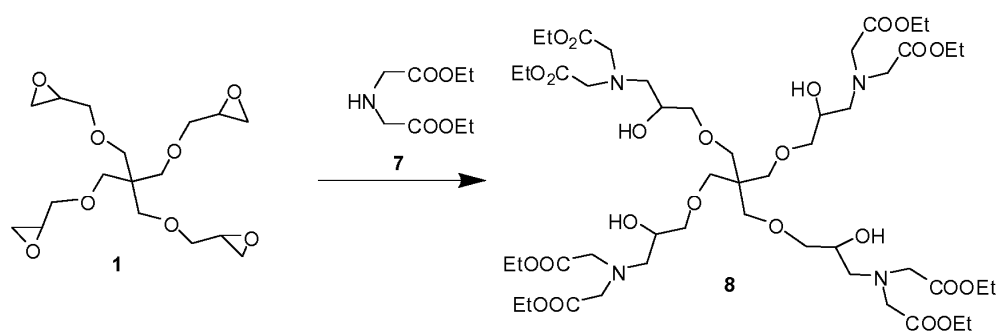
RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD): δ 1,24-1,29 (24 H, t, J = 7,20 Hz), 3,03-3,09 (4 H, dd, J = 3,60 Hz), 2,78-2,85 (4 H, t, J = 9,0 Hz), 3,41 (12 H, s), 3,45 (8 H, s), 3,61 (8 H, d, J = 5,40 Hz), 4,14-4,21 (16 H, c, J = 6,60 Hz), 4,61-4,67 (4 H, sextuplete, J = 4,20 Hz); y

RMN ¹³C (75 MHz, CD₃OD): δ 13,41, 13,45, 45,89, 49,79, 53,65, 55,77, 56,21, 57,97, 60,57, 60,69, 68,71, 69,79, 69,93, 71,31, 73,55, 78,43, 78,46, 168,62, 170,26, 172,30; y

IR (puro): ν_{max} 3457, 2980, 2934, 2904, 2868, 1741, 1675, 1460, 1378, 1250, 1198, 1163, 1106, 1065, 1029, 927, 860, 819, 732 cm⁻¹; y

MS MALDI-TOF: C₄₉H₈₈N₄O₂₄ Calc. 1117,2; encontrado 1117,7 [M]⁺, 1139,7 uma [M+Na]⁺.

El siguiente Esquema 3 ilustra esta reacción.



Esquema 3

Ejemplo 4 (fuera del alcance de la invención): Derivados éster de aminas primarias

5

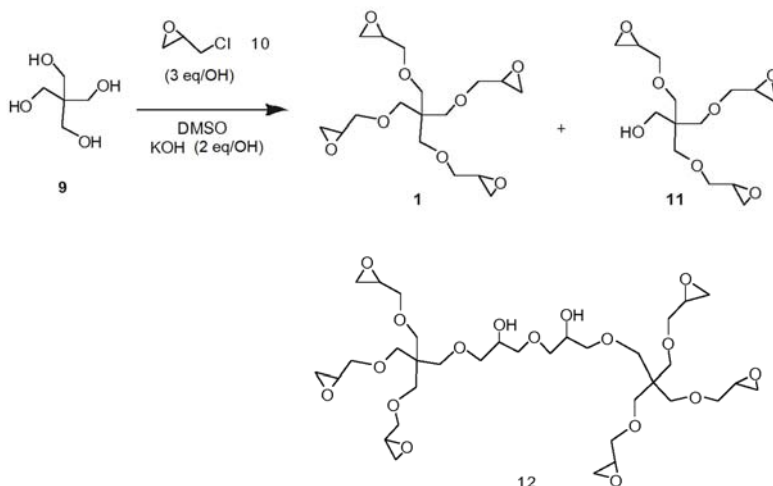
A. Síntesis de pentaeritritol tetraglicidil éter a partir de pentaeritritol y epiclorhidrina (EPI)

[(C) = PETGE; (TF)=Epoxi]

10 Este proceso se llevó a cabo de acuerdo con Mitsuo *et al.*, *Synthesis* 487 (1993). Se dispusieron el pentaeritritol 9 (13,6 g, 400 mmol) y 100 ml de DMSO en un matraz de fondo redondo y 3 bocas de 1 l y después se añadió KOH (52,7 g, 800 mmol, 2 eq por OH) todo de una vez. La mezcla de reacción se agitó enérgicamente con un agitador mecánico y después se enfrió a 15-20 °C en un baño de hielo. Se añadió gota a gota la EPI 10 (110,4 g o 93,55 ml, 1,2 mol, 3 eq por OH) en un embudo compensador de presión durante un periodo de 150 min. La temperatura se mantuvo a 15-20 °C durante la adición de la EPI 10. El color de la mezcla de reacción cambió de incoloro a amarillo claro. Después de completar la adición, la mezcla de reacción se dejó calentar hasta TA y la agitación continuó durante una noche. El progreso de la reacción se controló mediante TLC. Al cabo de 3 h, la TLC indicaba manchas para el PETGE 1 y el pentaeritritol triglicidil éter 11. Continuando la reacción, se esperaba que el triglicidil éter 11 se convirtiera en el producto 1; sin embargo, se observó cierta dimerización del producto 1, que proporcionó el producto 12.

La mezcla de reacción se filtró a través de un embudo Büchner y los sólidos se lavaron con 100 ml de DCM. Las fracciones volátiles de DCM se retiraron en un rotavapor. La mezcla de reacción bruta se trató con salmuera saturada (2x 100 ml) y se extrajo con éter dietílico (2x 100 ml). Las capas de éter combinadas se secaron sobre Na₂SO₄ y se concentraron en un rotavapor para dar un líquido amarillo oscuro / marrón claro. El líquido bruto se dividió en dos porciones iguales y se sometió a cromatografía en columna sobre gel de sílice. El gel de sílice (300 g) se cargó en la columna (25 cm de altura x 5,5 cm de anchura). Tras eluir 500 ml de disolventes, las fracciones se recogieron en 40 ml. Las primeras fracciones era la EPI 10 seguida del PETGE 1 ($R_f = 0,62$), y después el dímero 12 ($R_f = 0,44$) y, por último, el triglicidil éter 11 ($R_f = 0,33$). Los rendimientos del PETGE 1 puro aislado eran del 45-60 % (cierta cantidad estaría contaminada con otros productos secundarios). Los análisis de los espectros coincidían con los datos comunicados para 1 y los análisis de los productos 11 y 12 también eran satisfactorios.

El siguiente Esquema 4 ilustra esta reacción.



Esquema 4

35

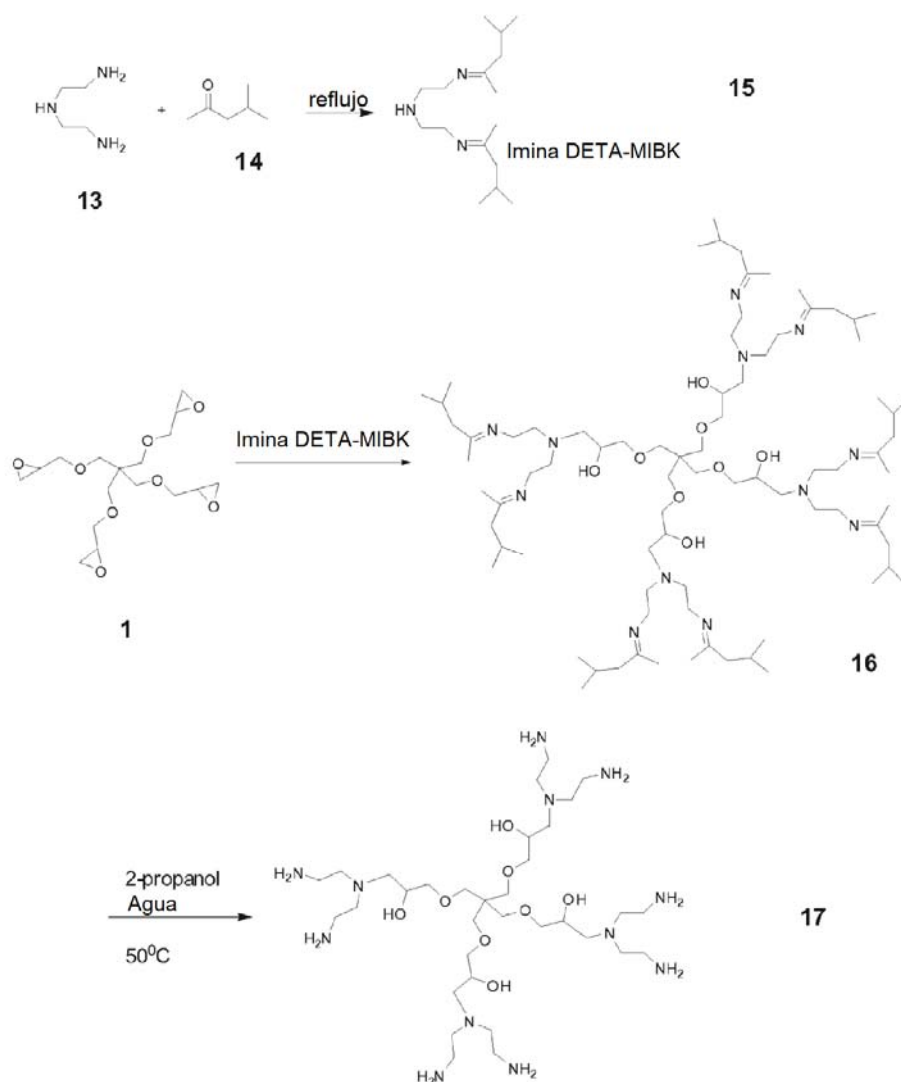
B. Protección de las aminas primarias de la dietilentriamina y uso de aminas secundarias para terminar el epóxido tetrafuncional: Dos aminas primarias

[(C) = PETGE; (IF1) = OH; (BR1) = DIA; (TF) = NH₂ primaria; G= 1]

Se dispusieron la DETA 13 (6,56 g, 63,6 mmol) (Acros) y 125 ml de la 4-metil-2-pentanona 14 (Aldrich) en un matraz de fondo redondo de 250 ml, equipado con una trampa de Dean-Stark y se calentó a 140 °C en atmósfera de argón. Después de destilar azeotrópicamente la cantidad teórica de agua (2.2 ml), la reacción se enfrió hasta TA. El peso de la mezcla era de 77,37 g, que contenía 63,6 mmol de la amina secundaria 15. La mezcla (12,16 g) se transfirió a un matraz de fondo redondo de 50 ml. El disolvente se eliminó mediante evaporación rotatoria para dar un aceite. A este aceite se añadió gota a gota una solución del PETGE 1 (360 mg, 1,0 mmol) (preparado en el Ejemplo 4A) en 5,5 ml de MeOH seco. La reacción se calentó a 75 °C durante 23 h. El disolvente se eliminó para proporcionar el compuesto 16 y al residuo se añadieron 25 ml de 2-propanol y 3,0 ml de agua. La mezcla se calentó hasta 50 °C durante 2 h. El disolvente se eliminó usando un rotavapor. El exceso de la DETA 13 se separó por destilación Kugelrohr (150 °C) para dar el producto 17, un aceite pegajoso ligeramente amarillo que tiene los siguientes espectros:

MALDI-TOF: Calc. 773; encontrado 795,784 uma (M+Na).

El siguiente Esquema 5 ilustra la reacción anterior:



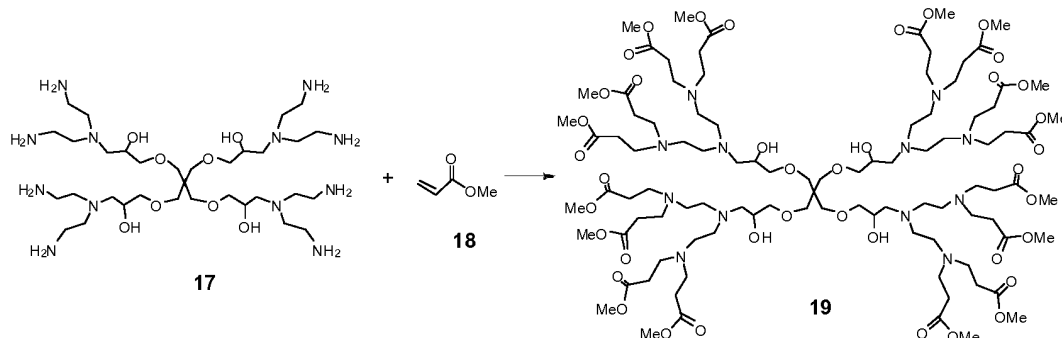
Esquema 5

C. [(C) = PETGE; (IF1) = OH; (BR1) = DETA; (BR2) *in situ* = acrilato de metilo; (TF) = éster metílico; G= 2,5]

Una solución de la octamina 17 (preparada en el Ejemplo 4B) en MeOH se añadió gota a gota a la solución del acrilato de metilo 18 (Acros) en MeOH a 0 °C (1,5 eq por NH). Tras la adición, la reacción se dejó calentar hasta TA. La mezcla se calentó después hasta 40 °C durante 24 h. El disolvente se eliminó para dar el producto 19 en forma de un aceite amarillo, que tiene los siguientes espectros:

5 MALDI-TOF: Calc. 2146; encontrado 2169,662 uma (M+Na).

El Esquema 6 ilustra esta reacción:



Esquema 6

Ejemplo 5 (fuera del alcance de la invención): Apertura del anillo usando un reactivo de célula ramificada con funcionalidad *tris*(hidroximetil)aminometano (TRIS) preformado: Dendrímtero de superficie nona-hidroxilada, G = 1], a partir de TMPTGE y TRIS

15 [(C) = TMPTGE; (FF) = Et; (IF1) = OH; (BR1) = TRIS; (TF) = OH; G = 1]

Se dispuso el TMPTGE 4 (2,66 g, 8,8 mmol) y 50 ml de MeOH en un matraz de fondo redondo de 100 ml secado al horno. El matraz estaba equipado con una barra de agitación y un tapón. Se añadió el TRIS 20 (4,79 g, 39,6 mmol) (Fisher Scientific) a la mezcla de reacción anterior con agitación en una porción a TA. El matraz se adaptó con un condensador de reflujo y se calentó a 60 °C durante 60 h en atmósfera de N₂. El TRIS 20 se disuelve completamente tras calentar durante aproximadamente 15 min. La mezcla de reacción se enfrió hasta TA y se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 500 ml. A continuación, se añadieron en primer lugar 120 ml de cloroformo, seguido de la adición lenta de 300 ml de hexanos con agitación constante usando una espátula. Se observó la formación de un precipitado blanco durante la adición de hexanos. La mezcla se combinó exhaustivamente una vez más y se dejó reposar a TA durante la noche. Se observó el precipitado en forma de escamas sólidas sobre las paredes y el fondo del matraz. La solución se mezcló con cuidado a fin de separar el sólido del vidrio, seguido de la filtración de la mezcla a través de un embudo Büchner, dando el producto deseado 21 (1,7 g). Sobre el fondo del matraz quedaba una pasta incolora, incluso después de separar el sólido. Esta pasta pesaba 5,2 g (la RMN ¹H y ¹³C mostraba señales para el dendrímtero 21 junto con cantidades traza del TRIS 20). La pasta se disolvió en 5 ml de MeOH, seguido del lavado del matraz con MeOH (2x 2 ml). La solución de metanol se cargó en una columna Sephadex® LH-20. Tras eluir 600 ml de MeOH, las fracciones se recogieron en alícuotas de 15 ml. El dendrímtero deseado 21 se encontró en las fracciones 18-47; mientras que el TRIS 20 se encontró en las fracciones 48-58. Las fracciones 18-47 se combinaron y el disolvente se eliminó en un rotavapor a presión reducida para dar un sólido higroscópico (4,2 g; 71,82 %), (G=1) dendrímtero PEHAM 21. La evaporación de los disolventes de las fracciones 48-58 dio el TRIS 20 (0,592 g) en forma de un sólido incoloro. Sus espectros son los siguientes:

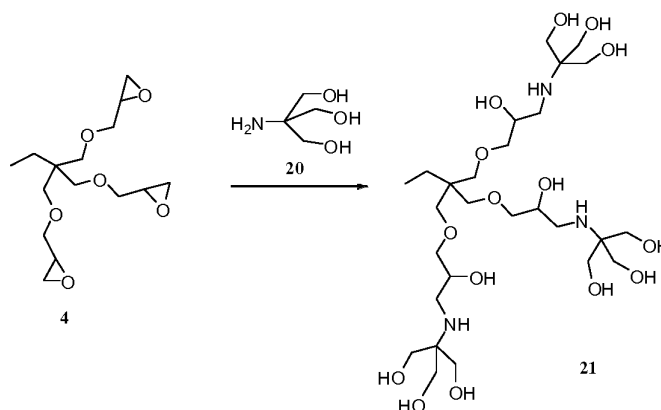
40 RMN ¹H: (300 MHz, CD₃OD): δ 0,86 (t, J = 7,20 Hz, 3H), 1,42 (c, J = 6,90 Hz, 2H), 2,64 (dd, J = 7,80, 8,10 Hz, 3H), 2,78 (dd, J = 3,60, 3,60 Hz, 3H), 3,34 (s, 6H), 3,35 (s, 6H), 3,41 (d, 5,10 Hz, 6H), 3,48 (s, 1H, OH), 3,50 (s, 1H, OH), 3,53 (d, J = 3,00 Hz, 12H), 3,58 (s, 1H, OH), 3,67 (t a, J = 3,00 Hz, 3H, 3 x NH), 3,79 (sextuplete, J = 3,60 Hz, 3H), 4,81 (s, 9H, 9 x OH); y

RMN ¹³C: (75 MHz, CD₃OD): δ 6,91, 22,72, 43,41, 44,34 - 59,83, 61,49, 70,07, 71,57, 74,27; y

IR (puro): ν_{max} 3354, 2919, 2873, 1460, 1424, 1408, 1367, 1296, 1234, 1106, 1029, 866, 773 cm⁻¹; y

MS MALDI-TOF: C₂₇H₅₉N₃O₁₅ Calc. 665; encontrado 689 uma (M⁺Na).

El siguiente Esquema 7 ilustra la reacción:



Esquema 7

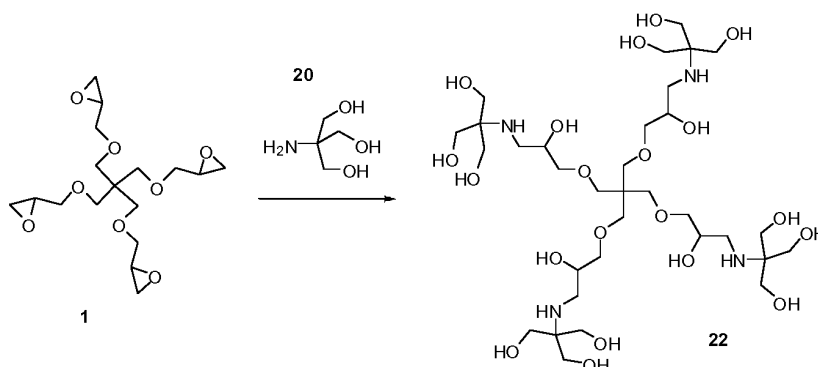
Ejemplo 6 (fuera del alcance de la invención): Reacción del pentaeritritol tetraglicidil éter (PETGE) con *tris*(hidroximetil)aminometano (TRIS)

[(C) = PETGE; (IF1) = OH; (BR1) = TRIS; (TF) = OH; G= 1]

En un matraz de fondo redondo de 250 ml, se disolvió el PETGE 1 (3,16 g, 8,78 mmol) en 70 ml de MeOH con agitación mecánica. La solución se colocó en un baño de aceite a 60 °C y se añadió el TRIS 20 (6,41 g, 52,8 mmol, 1,50 eq./epóxido) (Fisher Scientific) mediante un embudo de polvo. El matraz se adaptó con un condensador de reflujo y se dejó que reaccionara durante 48 h. La reacción se controló mediante TLC (CH₂Cl₂:MeOH 3:1) y no se observó PETGE 1 (R_f = 0.80), después de ese tiempo. La mezcla se diluyó con 120 ml de cloroformo, se añadieron después lentamente 300 ml de hexanos con agitación. Se formó un precipitado blanco y la mezcla se dejó reposar durante 16 h. La solución se filtró a través de un embudo Büchner para dar una pasta blanca transparente en el fondo del matraz. La pasta se secó al vacío para dar 6,98 g del producto 22 bruto. El producto se volvió a disolver en 40 ml de MeOH y 60 ml de cloroformo y el TRIS 20 remanente se separó mediante cristalización en 300 ml de hexanos. La mezcla se filtró y el semisólido remanente se secó a alto vacío durante 24 h para dar 5,35 g del producto 22 (72,0 % de rendimiento, 7,43 g de masa teórica). Para una purificación adicional, el material se cargó en una columna Sephadex® LH-20 de 36" x 4" (91 cm x 10 cm). Una vez recogido el volumen vacío de 575 ml, se recogieron 48 fracciones, cada una de 12 ml de MeOH y se analizaron mediante TLC (MeOH:NH₄OH 7:3). Se recuperaron 2,29 g (31 % de rendimiento) del producto 22 purificado. Sus espectros son los siguientes:

RMN ¹H (500 MHz, D₂O): δ 2,644 (1H, c, J = 4,88 Hz), 2,76 (1H, c, J = 3,625), 3,34 (2H, s), 3,44 (2H, d, J = 9,0 Hz), 3,54 (2H, c, J = 6,75 Hz), 3,79 (1H, s), 4,80 (4H, s); y
 RMN ¹³C (75 MHz, D₂O): δ 45,43, 46,91, 49,85, 61,01, 62,69, 71,14, 75,43, 79,42; y
 MALDI-TOF: C₃₃H₇₂ N₄O₂₀ Calc. 845; encontrado 867 uma [M+Na]⁺.

El siguiente Esquema 8 ilustra la reacción.



Esquema 8

Ejemplo 7 (fuera del alcance de la invención):

A. Reacción de pentaeritritol trialil éter (PETriAE) con ácido m-cloroperbenzoico (m-CPBA)

[(C) = PETriGE; (FF) = OH; (TF) = epóxido]

Se cargó un matraz de fondo redondo de 100 ml con PETriAE 23 (2,56 g, 10,0 mmol, 30 mmol de olefina) (Aldrich) y 50 ml de cloroformo (Fisher Scientific). A esta solución se añadió con agitación mecánica el m-CPBA 24 (8,84 g, 36,0 mmol) (Acros Organics) en porciones a TA. La mezcla se agitó durante 3 días, y después se lavó con una solución acuosa de metabisulfito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) al 3 % (3x 100 ml) (Aldrich), seguido de una solución acuosa de hidrógeno carbonato de sodio (NaHCO_3) al 3 % (3x 100 ml). La capa orgánica se secó sobre sulfato sódico, se concentró mediante evaporación rotatoria para dar el aceite de color amarillo pálido 25 (2,58 g, 84,8 % de rendimiento). Sus espectros son los siguientes:

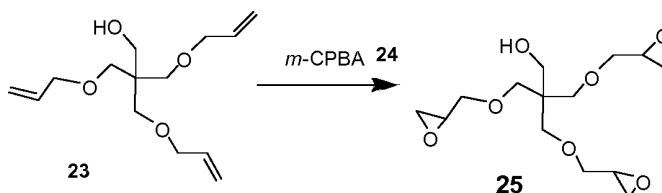
RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 2,57 (c, $J = 2,70$ Hz, 3 H), 2,76 (t, $J = 4,50$ Hz, 4 H), 3,07-3,12 (m, 3 H), 3,33 (dd, $J = 1,50, 1,20$ Hz, 2 H), 3,37 (dd, $J = 1,50, 1,20$ Hz, 2 H), 3,51 (c, $J = 9,00$ Hz, 6 H), 3,66 (s, H), 3,69 (d, $J = 2,70$ Hz, 2 H), 3,73 (d, $J = 2,40$ Hz, 2 H); y

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): δ 44,34, 45,51, 50,97, 65,33, 71,61, 71,67, 71,73, 72,18, 72,20, 72,23; y

IR (puro): 3507, 3056, 2999, 2922, 2870, 1476, 1450, 1424, 1336, 1248, 1160, 1098, 1051, 953, 901, 855, 834, 751 cm^{-1} ; y

MS MALDI-TOF: $\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{O}_7$; Calc. 304,3; encontrado 327,05 uma $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

El siguiente Esquema 9 ilustra la reacción.



Esquema 9

B. Reacción de pentaeritritol triglicidil éter (PETriGE) con bromuro de propargilo

[(C) = pentaeritritol triglicidil éter (PETriGE); (FF) = alquino; (TF) = epóxido]

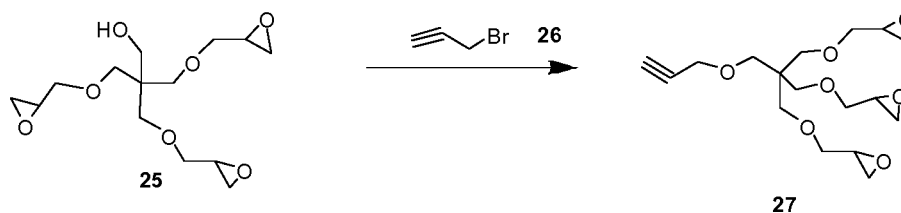
A un matraz de fondo redondo de 250 ml secado al horno se añadieron PETriGE, producto 25 (preparado en el Ejemplo 7A) y 120 ml de DMF seca (Aldrich). El matraz de reacción se purgó con gas N_2 , se cerró con un septo y se enfrió a 0 °C en un baño de hielo. A esta solución se le añadió, con agitación mecánica, hidruro sódico (1,35 g, 33,8 mmol, dispersión al 60 % en aceite mineral) (Aldrich) en porciones a lo largo de un periodo de 20 min. Después de agitar adicionalmente a 0 °C durante 40 min, se añadió el bromuro de propargilo 26 (3,73 ml, 90 % en peso en tolueno). El enfriamiento continuó durante 90 min y después la mezcla se dejó calentar gradualmente hasta TA. La mezcla se agitó durante la noche a esta temperatura. A continuación, la mezcla de reacción se enfrió a 10 °C en un baño de hielo, se diluyó con 70 ml de agua, se extrajo con acetato de etilo (3x 70 ml) y se lavó con solución saturada de salmuera (2x 50 ml). Los extractos combinados se secaron sobre sulfato sódico y se concentraron mediante evaporación rotatoria para dar un líquido de color marrón oscuro, que se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice, usando inicialmente acetato de etilo en hexanos (20:80 % v/v), que cambió gradualmente a acetato de etilo en hexanos (40:60 % v/v). Las fracciones que dieron una mancha de TLC (acetato de etilo: hexanos 1:1) a $R_f = 0,31$ se combinaron y se encontró que era el pentaeritritol triglicidil éter propargilado 27 puro (3,79 g, 82 % de rendimiento). Sus espectros son los siguientes:

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 2,43 (t, $J = 2,10$ Hz, 1 H), 2,61 (c, $J = 2,70$ Hz, 3 H), 2,79 (t, $J = 4,20$ Hz, 3 H), 3,13 (sextuplete, $J = 3,00$ Hz, 3 H), 3,37 (d, $J = 6,00$ Hz, 1 H), 3,41 (d, $J = 5,70$ Hz, 1 H), 3,51 (d, $J = 3,90$ Hz, 6 H), 3,54 (s, 2 H), 3,70 (d, $J = 3,00$ Hz, 2 H), 3,74 (d, $J = 2,70$ Hz, 2 H), 4,13 (dd, $J = 2,10, 0,30$ Hz, 2 H); y

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): δ 44,44, 45,69, 51,06, 58,84, 69,05, 70,15, 72,24, 74,34, 80,25; y

IR (puro): 3267, 3057, 2991, 2924, 2878, 2755, 1480, 1434, 1367, 1337, 1260, 1168, 1096, 1014, 963, 906, 840, 758, 666 cm^{-1} .

El siguiente Esquema 10 ilustra esta reacción.



Esquema 10

C: Síntesis de pentaeritritol tetraglicidil éter a partir de pentaeritritol usando bromuro de alilo y ácido metacloroperoxibenzoico (m-CPBA)

5 [(C) = PETGE; (TF)=Epoxi]

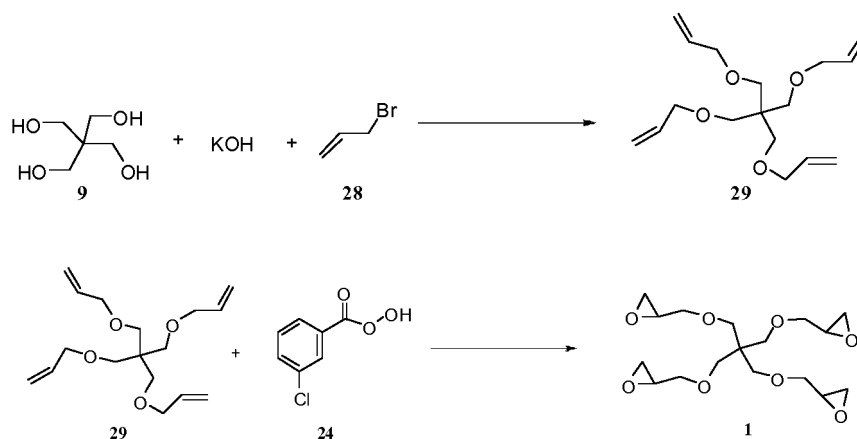
Se mezclaron el pentaeritritol 9 (15,03 g, 110 mmol) (Acros Organics) y 250 ml de THF en un matraz de fondo redondo de 1 l. Se añadieron KOH (85,93 g, 1,35 mol, 3,0 eq por OH) y bromuro de tetrabutilamonio (TBAB) (0,460 g, 1,23 % mol) (Acros Organics) mediante un embudo de polvo, seguido de la adición del bromuro de alilo 28 (106,6 g, 1,35 mol, 3,0 eq por OH) mediante un embudo de adición de 125 ml durante 10 min. La reacción se colocó inmediatamente en un baño de aceite a 70 °C durante 24 horas. La reacción se controló mediante TLC (hexanos:acetato de etilo 10:1), que mostraba la mancha de producto a $R_f = 0,4$ y ninguna mancha para pentaeritritol mono-, di- o trialil sustituido. La mezcla de reacción se filtró al vacío a través de un embudo Büchner con frita de vidrio grueso de 150 ml. La capa orgánica se diluyó con éter dietílico (2x 250 ml). La capa orgánica se lavó con K_2CO_3 al 5 % (5x 300 ml) y se secó sobre $MgSO_4$. Los volátiles se eliminaron en un rotavapor (temperatura del baño de 40 °C) para dar el pentaeritritol tetraalil éter 29 (PETAE) (30,07 g; 92 % de rendimiento); y tenía los siguientes espectros:

IR (puro): ν_{max} 3080, 2867, 1646, 1478, 1422, 1350, 1264, 1137, 992, 922 cm^{-1} ; y
 20 RMN ^{13}C : (75 MHz, $CDCl_3$): δ 45,33, 69,25, 72,15, 115,95, 135,16; y
 RMN 1H : (300 MHz, $CDCl_3$): δ 3,39 (4H, s), 3,84 (4H, c, $J = 2,3$ Hz), 5,04 (2H, c, $J = 13,8$ Hz), 5,80 (1H, septuplete, $J = 7,78$ Hz).

Se añadieron el PETAE 29 (3,29 g, 11,0 mmol) y 50 ml de cloroformo a un matraz de fondo redondo de 500 ml equipado con una barra de agitación. Después se añadió el m-CPBA 24 (70 %) (12,51 g, 51,0 mmol, 1,14 eq por alqueno) (Acros Organics) durante 10 min a través de un embudo de adición. El matraz de reacción se calentó en los 30 min de adición del perácido. Se agitó la reacción durante 72 horas a 22 °C, después se diluyó con 100 ml de DCM y se transfirió a un embudo de separación de 500 ml. La capa orgánica se lavó con $Na_2S_2O_5$ al 3 % (3x150 ml) y $NaHCO_3$ al 3 % (3x150 ml). La capa orgánica se secó con Na_2SO_4 , se filtró y los materiales volátiles se eliminaron en un rotavapor (temperatura del baño de 40 °C). La TLC (tolueno:acetona 7:3) sobre sílice mostraba una mancha a $R_f = 0,48$. Tras el secado del producto durante la noche a alto vacío se obtuvo el PETGE 1 en forma de un líquido viscoso, incoloro y transparente (3,86 g; 92 % de rendimiento); y tenía los siguientes espectros:

IR (puro): ν_{max} 3055, 2997, 2876, 1724, 1480, 1340, 1258, 1163, 1018, 908, 845, 799, 760 cm^{-1} ; y
 35 RMN ^{13}C : (75 MHz, $CDCl_3$): δ 43,96, 45,54, 50,62, 69,80, 71,90; y
 RMN 1H : (300 MHz, $CDCl_3$): δ 2,55 (1H, c, $J = 2,05$ Hz), 2,72 (1H, t, $J = 2,33$ Hz), 3,09 (1H, c, $J = 3,06$ Hz) 3,32 (1H, c, $J = 4,43$ Hz), 3,45 (2H, d, $J = 1,65$ Hz), 3,64 (1H, c, $J = 3,675$ Hz); y
 MALDI-TOF: 383 uma $[M+Na]^+$.

40 Estas reacciones se presentan en el Esquema 11.



Esquema 11

45 D. Reacción del PETGE con azida de sodio; Núcleo modificado

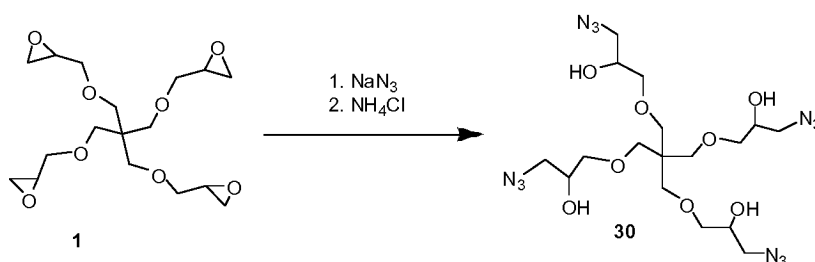
[(C) = Tetraazida de pentaeritritol (PETAZ); (IF) = OH; (TF) = azida]

Se cargó un matraz de fondo redondo de 50 ml con el PETGE 1 (3,6 g, 10 mmol) (preparado en el Ejemplo 7C), 27 ml de DMF y 3 ml de agua. A esta solución se añadió azida de sodio (7,8 g, 120 mmol, 3 eq por epóxido), seguida de cloruro de amonio (6,36 g, 3 eq). El matraz de reacción estaba equipado con una barra de agitación y un condensador de reflujo y se calentó a 50 °C durante la noche. El progreso de la reacción se controló mediante TLC. Después de este tiempo, la mezcla de reacción se dejó enfriar hasta TA, después se filtraron los materiales sólidos a través de un embudo Büchner, y los sólidos se lavaron con acetato de etilo (1x 50 ml). El filtrado se diluyó con 70 ml de agua y se extrajo con acetato de etilo (3x 50 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera saturada, se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron a través de un lecho de gel de sílice. El filtrado se concentró mediante evaporación rotatoria para dar un líquido incoloro 30 (5,1 g, 95 % de rendimiento). Sus espectros son los siguientes.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 3,04 (s a, 4H, OH), 3,33 (t, J = 5,70 Hz, 8H), 3,47 (s, 8H), 3,49 (t, J = 2,40 Hz, 8H), 3,93 (quintuplete, J = 5,10 Hz, 4H); y

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 45,75, 53,52, 69,68, 71,09, 73,12; y MS MALDI-TOF: C₁₇H₃₂N₁₂O₈; Calc. 532,5, encontrado 555,3 uma [M+Na]⁺.

El siguiente Esquema 12 ilustra esta reacción.



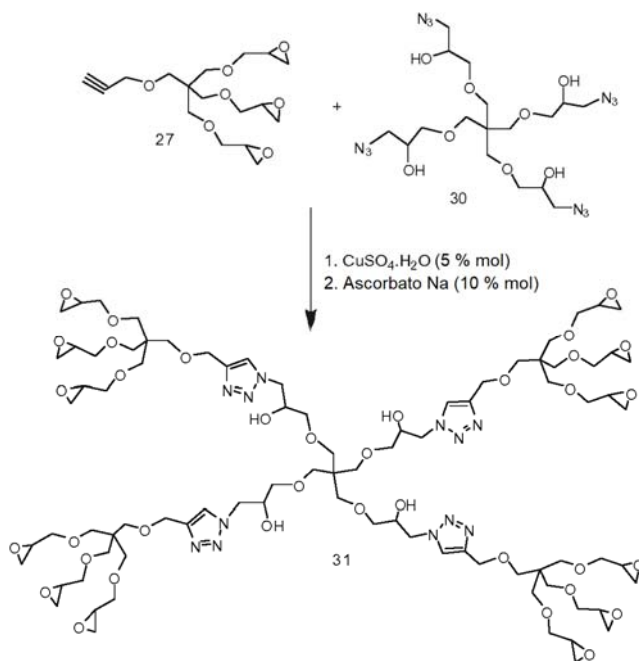
Esquema 12

E. Reacción de propargil pentaeritritol triglicidil éter con tetraazida de pentaeritritol (PETAZ) para producir el dendrímero PEHAM G = 1 con un núcleo de cuatro brazos y una superficie de epóxido

[(C) = PETGE; (IF1) = OH; (EX1) = Triazol; (BR1) = PETriGE; (TF) = epóxido; G= 1]

A un matraz de fondo redondo de 50 ml secado al horno se añadieron el propargil pentaeritritol triglicidil éter 27 (0,39 g, 1,14 mmol, 1,05 eq por N₃; preparado a partir del Ejemplo 7B), la tetraazida de pentaeritritol 30 (0,144 g, 0,271 mmol; preparado a partir del Ejemplo 7D), 1,2 g de *t*-butanol y 1,2 g de agua. El matraz estaba equipado con una barra de agitación y sellado con un tapón. A esta mezcla se añadió ascorbato de sodio (0,026 g, 0,114 mmol, 0,10 eq), seguido de sulfato de cobre (I) pentahidrato (CuSO₄·5H₂O) (0,014 g, 0,057 mmol, 0,05 eq). El progreso de la reacción se controló mediante TLC. Después de agitar durante 3 días a TA, se encontró que la reacción había finalizado. El producto 31 se usó para la reacción siguiente en el Ejemplo 7F sin aislamiento debido a la alta reactividad de los grupos epóxido.

El siguiente Esquema 13 ilustra esta reacción.



Esquema 13

E. Reacción del producto del Ejemplo 7E con dietanolamina (DEA) para producir el dendrímero PEHAM G = 2 con un núcleo de cuatro brazos y una superficie de hidroxilo

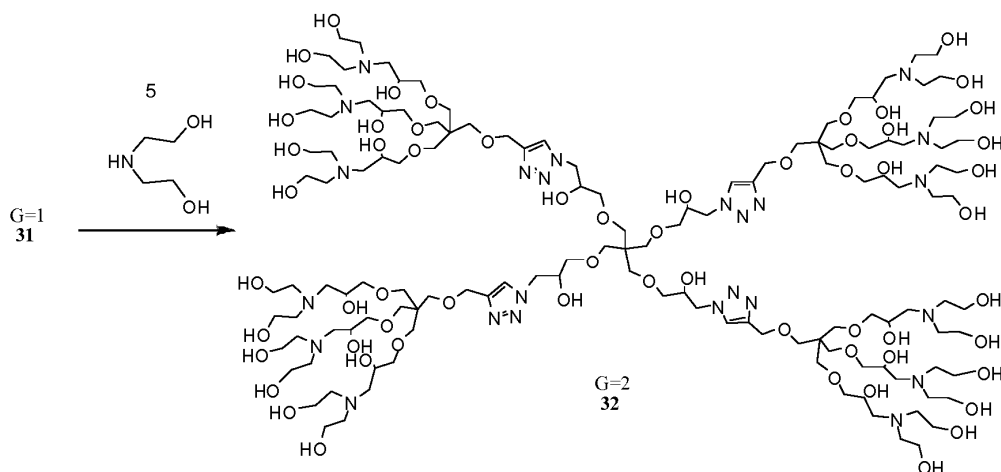
[(C) = PETGE; (IF1) = OH; (EX1) = Triazol; (BR1) = PETriGE; (IF2) = OH; (BR2) = DEA; (TF) = OH; G = 2]

El producto 31 bruto se inactivó con la DEA 5 (1,07 g, 10.26 mmol, 3 eq por epóxido) (Aldrich) en 3 ml de *t*-butanol. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 1 día, después se calentó a 45 °C durante 3 días. Después de enfriar hasta TA, la mezcla de reacción se diluyó con 300 ml de MeOH y unos pocos sólidos inorgánicos sin disolver se retiraron mediante filtración. El filtrado se purificó adicionalmente mediante UF a través de una membrana de exclusión molecular de 1K. Después de recoger 900 ml de permeado, el retenido se retiró del filtro de UF y el filtro de UF se lavó con MeOH (3x 50 ml). El disolvente se eliminó mediante evaporación rotatoria para dar un aceite de color tostado, que se secó a alto vacío para dar el dendrímero 32 G = 2 deseado en forma de un sólido esponjoso (850 mg, 99 % de rendimiento). Sus espectros son los siguientes:

RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD): δ 2,49-2,80 (m, H), 3,40-3,50 (m, H), 3,52-3,70 (m, H), 3,81 (s a, H), 4,10-4,20 (m, H), 4,38-4,50 (m, H), 4,588 (s a, H), 7,99 (s, 4H); y

RMN ^{13}C (75 MHz, CD_3OD): δ 29,99, 45,51, 45,68, 53,39; 57,47, 58,46, 59,63, 64,32, 68,44, 69,03, 69,35, 70,12, 72,85, 73,84, 125,04, 144,82.

El siguiente Esquema 14 ilustra esta reacción.



Esquema 14

Ejemplo 8 (fuera del alcance de la invención):

A. Apertura del anillo usando un precursor reactivo de célula ramificada con funcionalidad diéster amino: Dendrímico PEHAM terminado en éster, $G = 1$], a partir de trimetilolpropano triglicidil éter (TMPTGE) y dietiliminodiacetato (DEIDA)

[(C) = TMPTGE; (FF) = Et; (IF1) = OH; (BR1) = DEIDA; (TF) = éster etílico; $G = 1,5$]

Se dispusieron el DEIDA 7 (14,07 g, 74,47 mmol) (Aldrich) y 120 ml de MeOH seco en un matraz de fondo redondo y una boca de 250 ml secado al horno. El matraz estaba equipado con una barra de agitación y un septo. Se disolvió el TMPTGE 4 (5,0 g, 16,55 mmol) (Aldrich) en 40 ml de MeOH seco y se añadió gota a gota a la solución anterior en agitación a través de un embudo compensador de presión durante un periodo de 1 h a TA. El embudo se substituyó por un condensador de reflujo y el matraz se calentó a 60 °C durante 60 h en atmósfera de N_2 . El disolvente se eliminó en un rotavapor a presión reducida, lo que proporcionó un líquido incoloro transparente. La mezcla de reacción total se transfirió a un matraz de fondo redondo y una boca de 100 ml. El exceso de la DEIDA 7 se separó por destilación Kugelrohr a presión reducida a 150-160 °C. El producto no destilado 33 (12,59 g; 87,5 % de rendimiento) se recuperó en forma de un líquido viscoso de color amarillo pálido. El compuesto 33 se almacenó en alcohol etílico a 0 °C. Sus espectros son los siguientes:

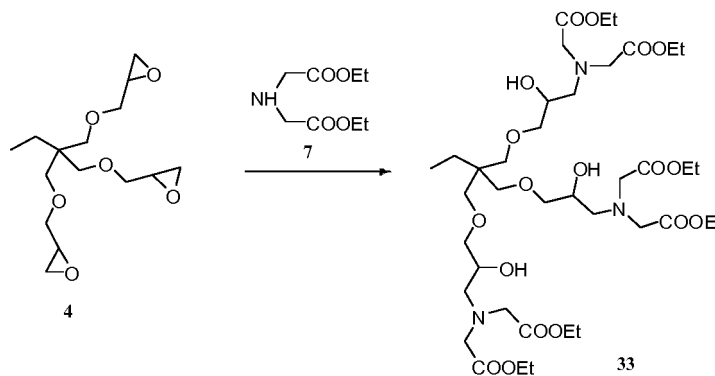
RMN 1H : (300 MHz, CD_3OD): δ 4,65 (sextuplete, $J = 4,20$ Hz, 3H), 4,16 (m, 12H), 3,59 (s, 12H), 3,36 (s, 6H), 3,30 (s, 6H), 3,05 (dd, $J = 3,60$ Hz, 3H), 2,95 (dd, $J = 3,90$ Hz, 2H), 2,81 (dt, $J = 1,80$ Hz, 9,90 Hz, 3H), 2,67 (dd, $J = 8,40, 8,10$ Hz, 2H), 1,37 (c, $J = 7,50$ Hz, 2H), 1,26 (t, $J = 7,20$ Hz, 6H, $2 \times CH_3$), 1,25 ($J = 7,20$ Hz, 12H, $6 \times CH_3$), 0,85 (t, $J = 7,50$ Hz, 3H, CH_3); y

RMN ^{13}C : (75 MHz, CD_3OD): δ 6,81, 13,36, 13,40, 22,66, 43,48, 49,85, 53,62, 55,76, 56,21, 58,00, 60,55, 60,68, 68,72, 71,17, 71,33, 71,50, 73,40, 78,43, 78,48, 168,67, 170,25, 172,31; y

IR (puro): λ_{max} 2980, 2934, 2904, 2868, 1741, 1460, 1408, 1378, 1342, 1250, 1198, 1111, 1065, 1024, 983, 927, 860, 784 cm^{-1} ; y

MS MALDI-TOF: $C_{39}H_{71}N_3O_{18}$ Calc. 869; encontrado 893 (M^+Na) y 847, 801, 779, 775 uma. (El espectro de masas muestra un modelo típico de fragmentación para la eliminación del grupo OC_2H_5)

El siguiente Esquema 15 ilustra la reacción:



Esquema 15

B. Reacción del producto de reacción del trimetilolpropano triglicidil éter y el dietiliminodiacetato (DEIDA) con tris(2-aminoetil)amina (TREN) para producir el dendrímico PEHAM $G = 2$ con un núcleo de tres brazos y una superficie de amina primaria

[(C) = TMPTGE; (FF) = Et; (IF1) = OH; (BR1) = DEIDA; (BR2) = TREN; (TF) = NH_2 primaria; $G = 2$]

Se cargó un matraz de fondo redondo de 100 ml con la TREN 2 (17,05 g, 116,82 mmol, 60 eq NH_2 por éster) y 40 ml de MeOH (Fisher Scientific) y una barra magnética. Una vez finalizada la reacción exotérmica de mezclado, (20 min), se añadió gota a gota una solución del éster 33 $G = 1$ (0,846 g, 0,97 mmol, 5,84 mmol éster; preparada en el Ejemplo 8A) en 10 ml de MeOH durante un periodo de 1 h a TA. La mezcla se colocó después en un baño de aceite y se calentó a 50 °C durante 3 días. El progreso de la reacción se controló mediante espectroscopía IR, es decir, la desaparición de la vibración del éster a 1740 cm^{-1} y la aparición de la vibración de la amida a 1567 cm^{-1} . El análisis MS MALDI-TOF indicaba la masa para el producto 34 $G = 2,0$ deseado acompañado de compuestos enlazados a 1348 [$M+Na$] $^+$ y 1201 [$M+Na$] $^+$ (uno y dos enlaces). La mezcla de reacción se diluyó con 700 ml de MeOH y se sometió a UF usando una membrana de exclusión molecular de 1K. Después de recoger 1,8 l de permeato, el retenido se retiró del filtro de UF y el disolvente se eliminó mediante evaporación rotatoria, dando un líquido viscoso

de color amarillo pálido, que se secó posteriormente a alto vacío para dar el dendrímero 34 G = 2 deseado (1,41 g, 98,94 % de rendimiento). Sus espectros son los siguientes:

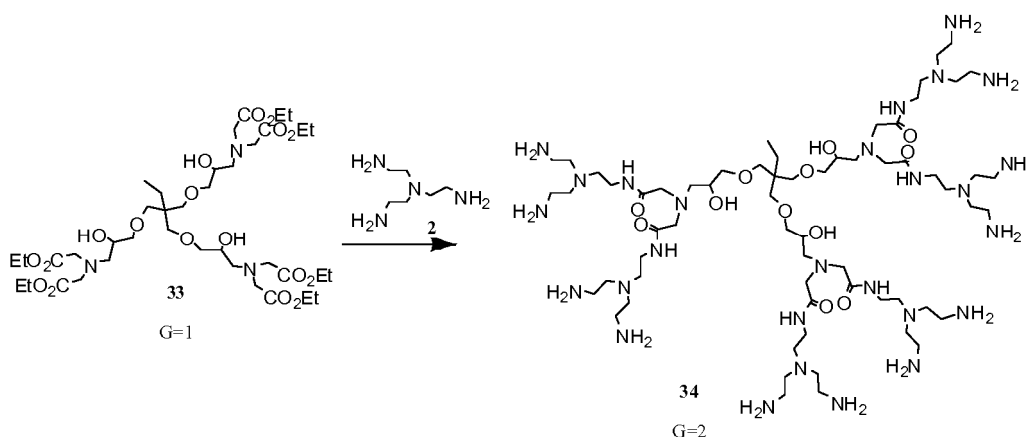
RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD): δ 0,86 (3 H, t a), 1,38 (2 H, s a), 2,32-2,60 (H, m), 2,67-2,76 (H, m), 3,29-3,34 (H, m), 3,82 (3H, s a); y

RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD): δ 8,14, 24,06, 38,57, 38,63, 39,98, 40,16, 44,59, 54,00, 55,09, 55,28, 57,21, 58,02, 60,19, 63,05, 63,28, 69,38, 69,94, 72,52, 72,96, 75,00, 173,76, 173,86, 174,03; y

IR (puro): ν_{max} 3298, 2934, 2842, 1659, 1572, 1536, 1470, 1388, 1357, 1311, 1116, 973, 819 cm^{-1} ; y

MS MALDI-TOF: $\text{C}_{63}\text{H}_{143}\text{N}_{27}\text{O}_{12}$ Calc. 1470,9843; encontrado 1494,2270 uma $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 1348,022 uma $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (uno enlazado), 1201,0970 uma $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (dos enlazados).

El siguiente Esquema 16 ilustra esta reacción.



Esquema 16

Ejemplo 9 (fuera del alcance de la invención): B. Reacción del producto de reacción del pentaeritritol tetraglicidil éter y el dietiliminodiacetato (DEIDA) con tris(2-aminoetil)amina (TREN) para producir el dendrímero PEHAM G = 2 con un núcleo de cuatro brazos y una superficie de amina primaria para compactación del ADN y actividad antibacteriana

[(C) = PETGE; (IF1) = OH; (BR1) = DEIDA; (BR2) = TREN; (TF) = NH_2 primaria; G= 2]

Se cargó un matraz de fondo redondo de 250 ml con el TREN 2 (52,26 g, 358,0 mmol, 120 NH_2 eq por éster), 50 ml de MeOH (Fisher Scientific) y una barra de agitación. Una vez finalizada la reacción exotérmica de mezclado (30 min), una solución del éster 8 G = 1 (1,25 g, 1,12 mmol, 8,95 mmol éster; preparada en el Ejemplo 3) en 10 ml de MeOH se añadió gota a gota durante un periodo de 1 h a TA, y la mezcla se agitó durante una noche. El análisis MS MALDI-TOF mostró el pico de la masa esperada para el producto deseado así como los picos de las masas para los subproductos con uno y dos enlaces. Se registró un espectro de IR y este mostraba la presencia de la vibración de la amida a 1575 cm^{-1} , y la ausencia de la vibración del éster a 1740 cm^{-1} . Se continuó la agitación durante 36 h más. Después, la mezcla de reacción se diluyó hasta un 5 % p/p de solución en MeOH y se sometió a UF usando una membrana de exclusión molecular de 1K. Después de recoger 3,5 l de permeato, el retenido se retiró del filtro de UF, el disolvente se retiró mediante evaporación rotatoria y el producto remanente se secó a alto vacío para dar el sólido esponjoso de color amarillo pálido 35 (2,02 g, 94 % de rendimiento). Sus espectros son los siguientes:

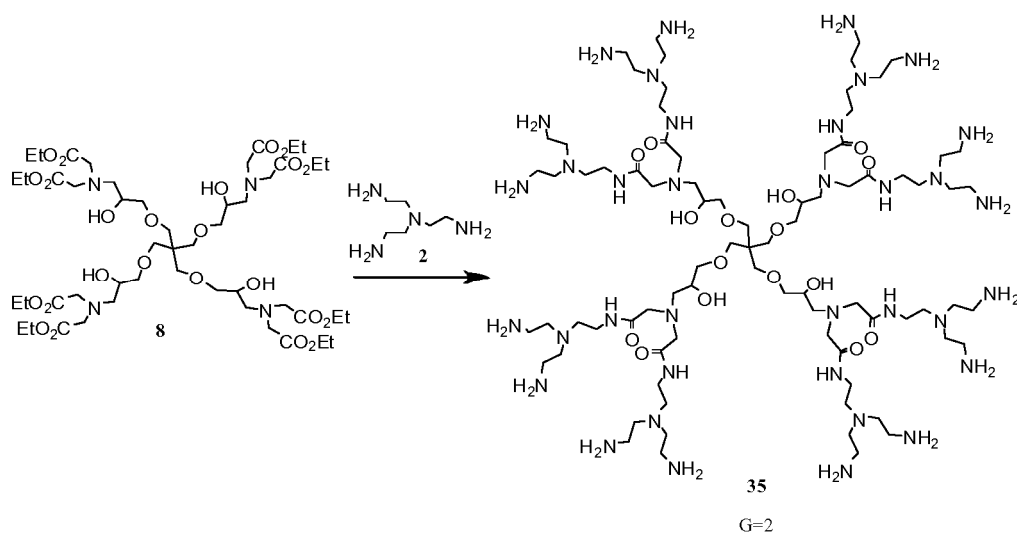
RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD): δ 2,49-2,59 (H, m), 2,62 (H, t a), 2,66 (H, s), 2,68 (H, s), 2,69 (H, s), 2,70 (H, s), 2,73-2,82 (H, m), 3,29-3,47 (H, m), 3,82 (H, s a); y

RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD): δ 38,64, 40,19, 48,48, 49,85, 53,94, 55,10, 55,29, 57,66, 58,10, 60,23, 63,06, 69,33, 71,41, 75,11, 173,70, 173,80, 173,97; y

IR (puro): ν_{max} 3313, 3078, 2934, 2868, 1649, 1557, 1541, 1475, 1449, 1362, 1306, 1163, 1101, 978, 818 cm^{-1} ; y

MS MALDI-TOF: $\text{C}_{81}\text{H}_{184}\text{N}_{36}\text{O}_{16}$; Calc. 1918,6, encontrado 1941,8 uma $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

El siguiente Esquema 17 ilustra esta reacción.



Esquema 17

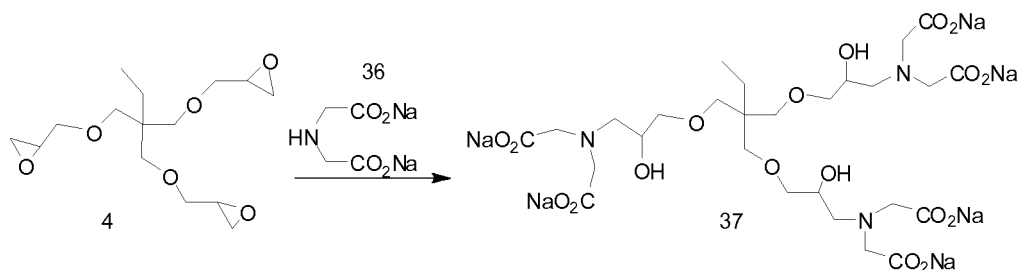
Ejemplo 10 (fuera del alcance de la invención): Reacción del producto del trimetilolpropano triglicidil éter (TMPTGE) con la sal sódica del ácido iminodiacético (IDADS)

[(C) = TMPTGE; (FF) = Et; (IF1) = OH; (BR1) = IDA; (TF) = CO₂Na; G= 1]

En un matraz de fondo redondo de vidrio de 1000 ml se disolvieron 39 g de NaOH (gránulos) en 100 ml de H₂O. A la solución en agitación se añadió la IDADS 36 (91,5 g, 0,69 mol) y se agitó enérgicamente hasta su disolución completa. Una solución del TMPTGE 4 (65,77, 0,22 mol) en 100 ml de MeOH se añadió a la mezcla lentamente durante un periodo de 20 min y se lavó con otros 100 ml de MeOH. La reacción se dejó en agitación durante 24 h a 80 °C. Después, la reacción se secó usando 40-100 mm de Hg a 60° C hasta que el producto llegó a ser un sólido y se secó adicionalmente hasta peso constante usando un aparato de alto vacío para dar el sólido blanco 37 (160 g, 88 % de rendimiento). Sus espectros son los siguientes:

RMN ¹H (300 MHz, D₂O): δ 0,8 (m, 3H), 1,31 (m, 2H), 3,25-4,1 (a, 30H), 4,2 (m, 3H).

El siguiente Esquema 18 ilustra esta reacción.



Esquema 18

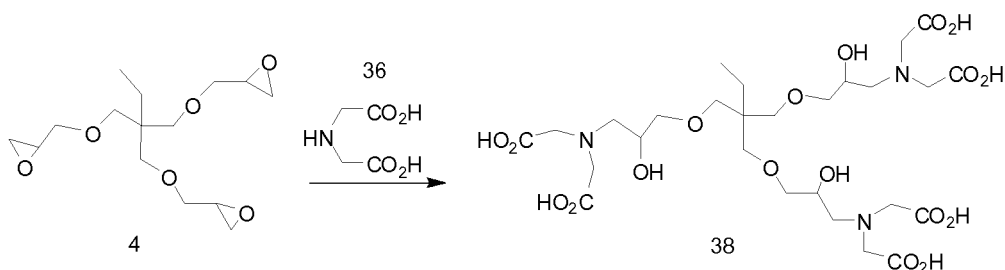
Ejemplo 11 (fuera del alcance de la invención): Reacción del producto del trimetilolpropano triglicidil éter (TMPTGE) con ácido iminodiacético (IDA)

[(C) = TMPTGE; (FF) = Et; (IF1) = OH; (BR1) = IDA; (TF) = CO₂H; G= 1]

A una solución de 100 ml de MeOH se añadió el IDA 36 (91,5 g, 0,69 mol) y se agitó enérgicamente hasta su disolución completa. Una solución del TMPTGE 4 (65,77, 0,22 mol) en 100 ml de MeOH se añadió a la mezcla lentamente durante un periodo de 20 min y se lavó con otros 100 ml de MeOH. La reacción se dejó en agitación durante 24 h a 80 °C. Después, la reacción se secó usando 40-100 mm de Hg a 60° C hasta que el producto llegó a ser un sólido y se secó adicionalmente hasta peso constante usando un aparato de alto vacío para dar el sólido blanco 38 (160 g, 88 % de rendimiento). Sus espectros son los siguientes:

RMN ¹H (300 MHz, D₂O): δ 0,8 (m, 3H), 1,31 (m, 2H), 3,25-4,1 (a, 30H), 4,2 (m, 3H),

El siguiente Esquema 19 ilustra esta reacción.



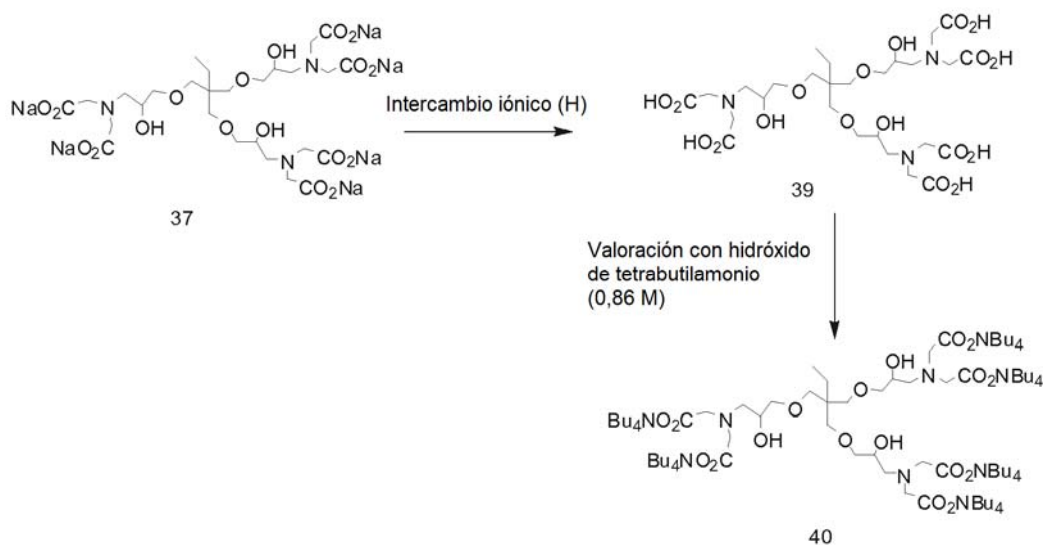
Esquema 19

Ejemplo 12 (fuera del alcance de la invención): Intercambio iónico de la sal sódica del producto 3 del Ejemplo 10 con la sal de tetrabutilamonio

[(C) = TMPTGE; (FF) = Et; (IF1) = OH; (BR1) = IDA; (TF) = CO₂NBu₄; G= 1]

El compuesto 37 (del Ejemplo 10) (2 g, 2,4 mmol) se disolvió en 5 ml de agua y se hizo pasar a través de una resina de intercambio iónico (IRC-50) en forma de H. El proceso resultante se repitió cuatro veces (2 g de material en un intercambio iónico; masa total de 8 g) dio el producto 39 con un pH de 3. Las fracciones combinadas se liofilizaron para dar un sólido blanco 39 (6,39 g, 84 % de rendimiento). Se disolvieron 2 g del compuesto 39 en agua (40 ml) y se valoraron hasta pH 8 usando aproximadamente 5 ml de hidróxido de tetrabutilamonio 0,86 M. El proceso de valoración se repitió de nuevo con 3,75 g del compuesto 40. Las soluciones se combinaron y se liofilizaron para dar un sólido blanco 40 (7,95 g). Sus espectros son los siguientes: RMN ¹H (300 MHz, D₂O): δ 0,7-0,95 (m, 27H), 1,31 (m, 18H), 1,6 (m, 16H), 3,1-3,85 (a, 46H), 4,13 (m, 3H)

El siguiente Esquema 20 ilustra esta reacción.



Esquema 20

Ejemplo 13 (fuera del alcance de la invención): Reacción del producto del trimetilolpropano triglicidil éter (TMPTGE) con dibencilamina (DBA)

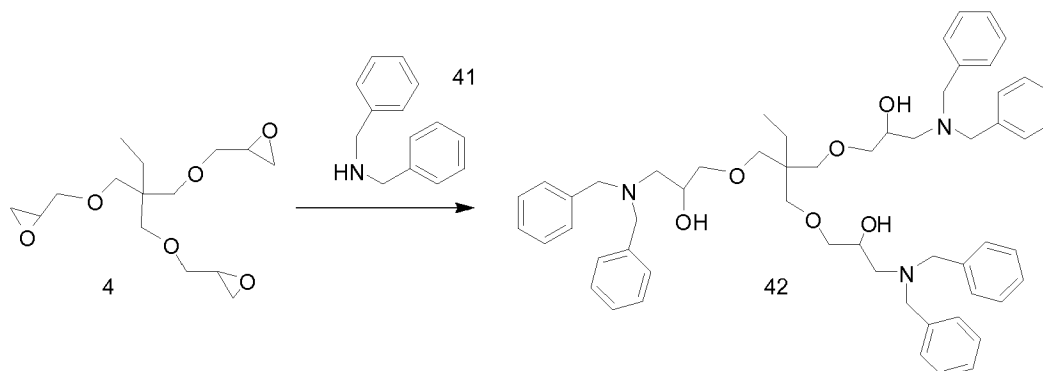
[(C) = TMPTGE; (FF) = Et; (IF1) = OH; (BR1) = DBA; (TF) = bencilo; G= 1]

A una solución de 10 ml de MeOH se añadió la dibencilamina 41 (1,18 g, 6,0 mmol) y se agitó. Se añadió una solución del TMPTGE 4 (500 mg, 1,66 mmol) en 10 ml de MeOH lentamente a la mezcla y se dejó en agitación durante 24 h a 45 °C. La reacción se controló mediante LCMS que indicó que la reacción había finalizado. Se purificó una muestra de la mezcla de reacción mediante HPLC en una columna C18 XTerra, 0,1 % de TFA con gradiente de un 5-60 % de ACN. El disolvente de reacción se eliminó a presión reducida y el material remanente 42 se dejó en forma bruta (1,53 g). Sus espectros son los siguientes:

RMN ^1H (300 MHz, MeOD): δ 0,65 (t, 3H), 1,05 (c, 2H), 2,98 (s a, 6H), 3,05-3,3 (a, 12H), 4,09 (m, 3H), 4,47 (m, 12H), 7,5 (ArH, 30H) y LCMS (hidrófila): R_f (min): 9,8, (ESI +ve) encontrado 894,31 $[\text{M}+\text{H}]^+$ calc. para $\text{C}_{57}\text{H}_{72}\text{N}_3\text{O}_6$.

El siguiente Esquema 21 ilustra esta reacción.

5



Esquema 21

Ejemplo 14 (fuera del alcance de la invención): B. Protección de las aminas primarias de la dietilentriamina y uso de aminas secundarias para terminar el epóxido trifuncional

10

[(C) = TMPTGE; (IF1) = OH; (BR1) = DETA; (TF) = NH_2 primaria; G= 1]

15

El DETA 13 (260,75 g, 2,5 mol) y el MIBK 43 (1110 g, 11,1 mol) se colocaron en un matraz de fondo redondo de 2 l, equipado con una trampa de Barrett y un condensador de reflujo refrigerado con agua, y se calentó hasta 110 °C en atmósfera de N_2 . A medida que se destilaba azeotrópicamente el agua, la temperatura de reacción aumentaba hasta 110 °C y la destilación se continuó hasta que ya no se recogió más agua en el fondo de la trampa de Barrett. La mezcla de reacción se enfrió hasta TA, en atmósfera de N_2 . Se retiraron las últimas trazas de la MIBK 43 mediante evaporación rotatoria para dar el compuesto 44 deseado en forma de un líquido naranja transparente que pasó a la siguiente etapa.

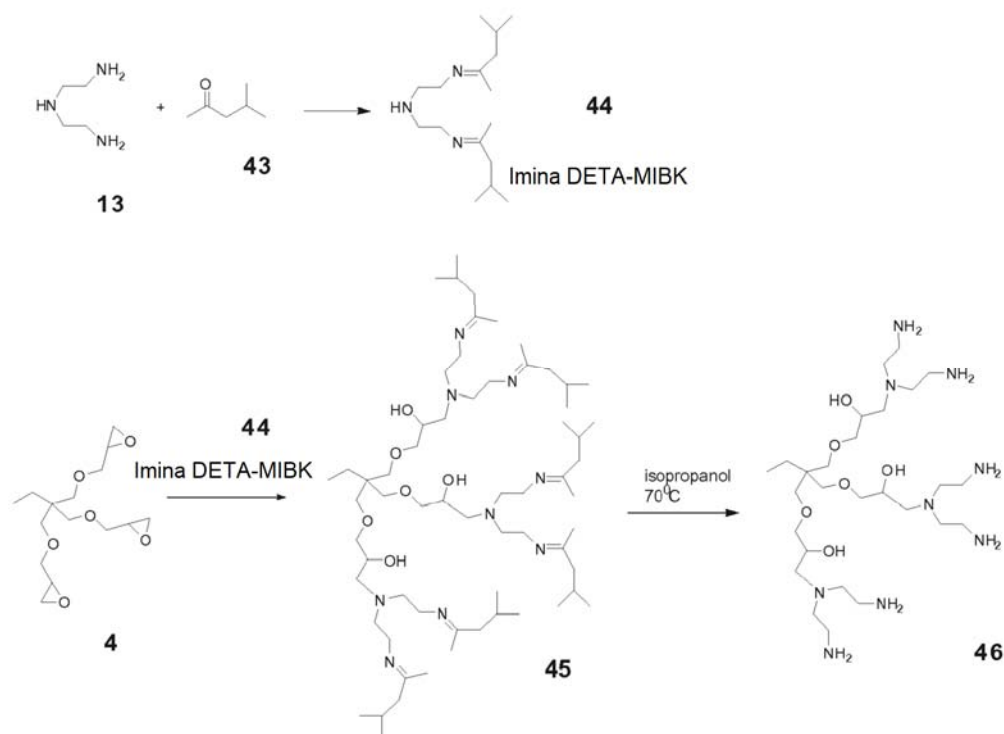
20

La DETA protegida con imina 44 (806 g, 3 mol) se mezcló con isopropanol (100 ml) y se dejó en agitación, finalmente se calentó hasta 60-70 °C en atmósfera de N_2 . Se disolvió el TMPTGE 4 (302, 1 mol) en isopropanol (200 ml) y se añadió lentamente (1,5-2 horas) a la solución caliente de DETA-MIBK 44 para proporcionar el compuesto 45. El matraz se lavó con tolueno (50 ml) y se añadió a la mezcla de reacción. La reacción se dejó en agitación a 80 °C durante 48 h. Se añadió agua DI (300 ml) y se dejó en agitación durante 16 h más a 80 °C. La temperatura de reacción se aumentó hasta 110 °C y se destiló azeotrópicamente el agua. Esta etapa se repitió dos veces con 600 ml de agua DI. La mezcla de reacción se enfrió hasta TA y se añadieron 700 ml de agua. La solución se extrajo con hexano (3 x 300 ml), que se desechó después. Se filtró la solución acuosa a través de un filtro grueso y se eliminó el disolvente a presión reducida. El material se sometió después a una destilación Kugelrohr (205 °C y 5 mm Hg) para dar el producto 46 en forma de un semisólido viscoso, naranja y transparente (498 g, 81,6 %). Sus espectros son los siguientes: RMN ^1H (300 MHz, MeOD): δ 0,86 (m, 3H), 1,14 (m, 2H), 2,4-2,9 (a, 20H), 3,2-3,75 (a, 16H), 3,85 (s a, 3H). ESI +ve encontrado 612,16 $[\text{M}+\text{H}]^+$ calc. para $\text{C}_{27}\text{H}_{66}\text{N}_9\text{O}_6$.

30

El siguiente Esquema 22 ilustra esta reacción.

35



Ejemplo 15 (fuera del alcance de la invención): Formulación de un dendrímero PEHAM de fórmula (I) con una entidad agrícolamente activa, en la que la solubilidad de la entidad activa aumenta

A una solución de un 10 % p/p de entidad agrícolamente activa disuelta en un disolvente orgánico volátil adecuado, (por ejemplo, MeOH, DCM, EtOH, acetona u otro disolvente apropiado) se añadió una solución de un 10 % p/p de dendrímero en agua o en el mismo disolvente orgánico anterior. La mezcla se dejó en agitación durante 2-4 h, y tras este tiempo el disolvente orgánico volátil se eliminó a presión reducida para proporcionar una mezcla 1:1 de la entidad activa y el dendrímero. Esta solución oleosa se disolvió después en agua y se filtró. El análisis del contenido de entidad activa en la solución acuosa mediante un ensayo de HPLC o GLC proporcionó una estimación del incremento de la solubilidad debido a la adición del dendrímero.

Usando el método general anterior para la trifluralina (un producto agroquímico conocido por tener una solubilidad en agua extremadamente baja), se demostró que dos dendrímeros diferentes mostraban un incremento significativo de la solubilidad en agua de la misma.

Entidad activa	Determinación de la solubilidad mediante ensayo de GLC	Incremento	Aspecto de la muestra
Trifluralina	0,22 mg/l a pH 7	Control - ninguna	-
Trifluralina + Ejemplo 2 TMPTGE G1, OH	0,35 g/l a pH 7	1000 veces	Amarillo claro, ligeramente turbio
Trifluralina + Ejemplo 14 TMPTGE G1, NH ₂	5,43 g/l a pH 7	25 000	Solución amarilla clara

Ejemplo 16: Formulación de un dendrímero PEHAM de fórmula (I) con una entidad agrícolamente activa, en la que la solubilidad de la entidad activa aumenta

A una solución de un 10 % p/p de entidad agrícolamente activa disuelta en un disolvente orgánico volátil miscible con agua adecuado, por ejemplo, MeOH, EtOH, acetonitrilo o acetona, se añade una solución de un 10 % p/p de un dendrímero PEHAM en agua. La mezcla se deja en agitación durante 2-4 h. Después se ajusta el nivel de solución acuosa a fin de asegurar que el componente orgánico volátil sea menos de un 10 % del volumen total. La mezcla se congela en un baño de hielo seco y acetona y el disolvente se elimina mediante liofilización para dar un sólido amorfo. El sólido amorfo se disuelve en agua y se filtra para dar la solución madre. El análisis del contenido de entidad activa en la solución acuosa mediante un ensayo de HPLC o GLC proporciona una estimación del

incremento de la solubilidad debido a la adición del dendrímero. Los dendrímeros PEHAM de los Ejemplos 2 y 14 se ensayaron y los resultados obtenidos son similares a los del Ejemplo 15.

Ejemplo 17: Mejora de la penetración en las hojas y de la eficacia de glifosato agrícolamente activo en presencia dendrímeros PEHAM

Preparación de las muestras:

Se preparó una serie de soluciones patrón de 5 ml usando uno de los dos productos comerciales GrowChoice® (basado en la sal IPA de glifosato) y Touchdown® (basado en la sal de potasio), cada uno a una tasa normal de uso en el campo de 10 ml/l o 5 ml/l (1 % o 0,5 %), así como un total de cinco dendrímeros PEHAM, cada uno preparado para dar una concentración final del 0,05 % o el 0,1 % (estas son concentraciones normales para adyuvantes que se podrían incluir en la mezcladora de tanque). Se prepararon también dos soluciones control con la misma concentración que el GrowChoice® y el Touchdown®, sin ninguna solución de dendrímero.

Tabla 1

Entidad activa (porcentaje, volumen)	Número de muestra (porcentaje de dendrímero en la solución final)				
	#1 G1-OH Ejemplo 2	#2 G1-NH ₂ Ejemplo 14	#3 G1-CO ₂ Na Ejemplo 10	#4 G1-CO ₂ NBu ₄ Ejemplo 12	#5 G2-OH Ejemplo 7
GrowChoice A (1 %, 0,05 ml).	1A (0,05 %)	2A (0,05 %)	3A (0,05 %)	4A (0,05 %)	5A (0,05 %)
GrowChoice B (1 %, 0,05 ml).	1B (0,1 %).	2B (0,1 %).	3B (0,1 %).	4B (0,1 %).	5B (0,1 %).
Touchdown C (1 %, 0,05 ml).	1C (0,05 %)	2C (0,05 %)	3C (0,05 %)	4C (0,05 %)	5C (0,05 %)
Touchdown D (1 %, 0,05 ml).	1D (0,1 %).	2D (0,1 %).	3D (0,1 %).	4D (0,1 %).	5D (0,1 %).
GrowChoice E (0,5 %, 0,025 ml)	1E (0,05 %)	2E (0,05 %)	3E (0,05 %)	4E (0,05 %)	5E (0,05 %)
Touchdown F (0,5 %, 0,025 ml)	1F (0,05 %)	2F (0,05 %)	3F (0,05 %)	4F (0,05 %)	5F (0,05 %)
GrowChoice A (1 %, 0,05 ml).	Control GC				
Touchdown C (1 %, 0,05 ml).	Control TD				

Evaluación biológica: Uso de plantas de cardo en un invernadero

Se aplicó una única gotita de 5 µl de cada formulación preparada anteriormente mediante una microjeringa sobre la superficie adaxial (superior) de la tercera hoja, por el lado del nervio central. Se efectuaron evaluaciones de la salud de las plantas a los 5 días. El ensayo continuó para efectuar evaluaciones a intervalos de 14 y 21 días. La Tabla 2 siguiente muestra las plantas al cabo de 5 días (2 = control de Touchdown, 11 = solución de 4C).

Tabla 2

Tratamiento	Solución	Estadio de hoja presente	Diámetro nominal de la planta, cm	% daño
1	Control de GrowChoice	9	22	5
2	Control de Touchdown	8	22	5
3	1A	9	24	10
4	2A	9	26	5
5	3A	9	27	0
6	4A	8	25	0
7	5A	8	27	5
8	1C	9	23	0
9	2C	8	21	5
10	3C	9	24	5
11	4C	8	28	10
12	5C	9	27	5

Las indicaciones preliminares a los 5 días a partir de estos resultados son que las soluciones 1A y 4C muestran un color amarronado en el centro ligeramente mayor que las otras soluciones (puntuadas como un 10 % frente a un 5 % para los controles). Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se cree que con la presente formulación de dendrímero se produce un mayor porcentaje de daño (es decir, el dendrímero hace más eficaz a la entidad activa) probablemente al ayudar a introducir más entidad activa en la planta, destruyendo más rápidamente la planta o aumentando la actividad para una dosis menor.

Sumario de los resultados observados:

1. Fue prácticamente imposible identificar el sitio de aplicación original para las dos soluciones control.
2. Había evidencia de daño necrótico en el sitio de aplicación para las soluciones 5, 6, 7 y 10, 11, 12.
3. Las puntuaciones del % de daño son principalmente una evaluación de la extensión del color amarronado en los nuevos brotes emergentes.
4. Los grupos de tratamiento 3 y 11, que incorporan el dendrímero PEHAM, muestran un porcentaje de daño significativamente mayor, que es una indicación clara de que las soluciones dendrímero-glifosato penetran en la superficie de la hoja y proporcionan mayor eficacia.

Ejemplo 18: Determinación de una mejora de la penetración en las hojas de compuestos agroquímicos en presencia de dendrímeros PEHAM

Usando el mismo esquema de procedimiento de formulación del Ejemplo 14 anterior, se prepararon una serie de mezclas 1:1 de compuestos agroquímicos y dendrímeros PEHAM usando soluciones radiomarcadas con ^{14}C de los compuestos agroquímicos [atrazina 1 mCi/mmol y glifosato-sal mono(isopropil amonio) 10-30 mCi/mmol marcados con ^{14}C]. Las mezclas oleosas se diluyeron con agua a una concentración del 1 % de entidad activa para su aplicación a las plantas. Se prepararon también soluciones control con la misma concentración de compuesto agroquímico pero sin dendrímero. Usando un micropulverizador, se aplicaron gotitas uniformes de herbicida marcado con ^{14}C a un área circular (10 mm de diámetro) adyacente al nervio central de la superficie adaxial de la cuarta hoja de plantas de guisantes de 21 días de edad. Cada grupo de tratamiento se replicó cuatro veces. Las muestras se dejaron durante un periodo de absorción fijado (1 - 48 h), después las hojas se retiraron y la superficie adaxial se lavó sucesivamente con MeOH + agua (1 ml; 1 + 1 en volumen) seguido de MeOH (1 ml) administrados con una jeringa cada uno durante un periodo de 20 segundos. Los lavados de la superficie se combinaron y se determinó la radiactividad mediante recuento de centelleo usando Lumagel (Lumac) como centelleador. El radiomarcaje retenido en la cera epicuticular se recuperó posteriormente mediante lavado del disco de hoja con cloroformo (1 ml). El cloroformo se eliminó en una corriente de nitrógeno y después la radiactividad de los extractos de cera y los lavados de la superficie se determinó mediante recuento de centelleo líquido (LSC) tras la adición del centelleador Hisafe 3' (4 ml). Los niveles relativos de radiactividad entre muestras constituían una comparación directa de la cantidad de entidad activa retirada por lavado. La absorción se definió como la proporción de producto químico no recuperada en los lavados con MeOH.

Se pueden determinar concentraciones mayores de entidad activa mediante espectroscopía HPLC-UV usando un espectrofotómetro UV/VIS Perkin Elmer® Lambda 2 y HPLC Waters. El contenido de atrazina de las formulaciones basadas en dendrímeros se comparó con el control de atrazina (sin dendrímero) para determinar la penetración comparativa en las hojas.

Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se cree que la presente formulación de entidad activa con dendrímero muestra un mayor porcentaje de la entidad activa retenida en la hoja.

Ejemplo 19 (fuera del alcance de la invención): Uso de dendrímeros PEHAM para potenciar la estabilidad de la entidad activa cuando está expuesta a la luz solar

Una solución de 5 ml de una formulación convencional de la entidad agrícola activa y dendrímero PEHAM (preparada en el Ejemplo 15) anterior se colocó en una placa de Petri de vidrio y se expuso a la luz solar durante 2, 4 y 8 h. La radiación UV se controló en tiempo real en la página web de ARPANSA. El flujo de UV a lo largo de 8 h se consideró el 100 % y la exposición de 2 y 4 horas se calculó como un porcentaje del registro de ARPANSA.

Después del intervalo de tiempo apropiado (2, 4, 8 h) los discos relevantes se retiraron, se lavaron y se analizaron mediante HPLC para determinar el ingrediente activo residual y los productos de degradación.

Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se cree que la presente formulación de entidad activa con dendrímero muestra un mayor porcentaje de la entidad activa presente; y está protegida, por tanto, del daño por radiación UV. Aunque se ensayó una entidad activa sin mostrar resultados favorables, se cree que esta formulación debe ser eficaz con otras entidades activas. Las entidades activas que se van a ensayar son azoxistrobina, fipronil, trifluralina y tebuconazol.

Ejemplo 20: Ensayo de adherencia al suelo / penetración en el suelo de una entidad agrícolamente activa en presencia de dendrímeros PEHAM

5 Como prueba inicial, se trataron columnas de ensayo (aproximadamente 8 cm de diámetro, 10 cm de longitud) de arena fina que contenía un 10 % de humedad con 10 ml de entidad activa acuosa y 1 ml de un dendrímero al 5 %. Se prepararon también columnas de control que no contenían dendrímero.

10 Las columnas se sometieron a 1 día de lixiviación con las soluciones que contenían la entidad activa. Después de ese tiempo las columnas se trataron con 10 ml adicionales de agua para promover el movimiento de la entidad activa en la columna de suelo. Después de los tres días, las columnas se dividieron en secciones horizontales y cada sección se ensayó mediante HPLC o GLC para determinar el contenido de entidad activa a fin de poder construir un perfil vertical para la columna de suelo. La comparación de las cantidades de entidad activa en el eluyente de agua frente a las cantidades retenidas en el suelo proporciona una evaluación del nivel relativo de adherencia al suelo frente a la penetración con o sin dendrímero PEHAM.

15 Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se cree que las presentes formulaciones con dendrímero y entidad activa aumentarán la penetración en el suelo de modo que la entidad activa llegue a las raíces de las plantas o a las partes de las plantas por debajo del suelo.

20 Ejemplo 21 (fuera del alcance de la invención): Formación del complejo dendrímero-cobre y mejora de la retención en las hojas / la resistencia al agua

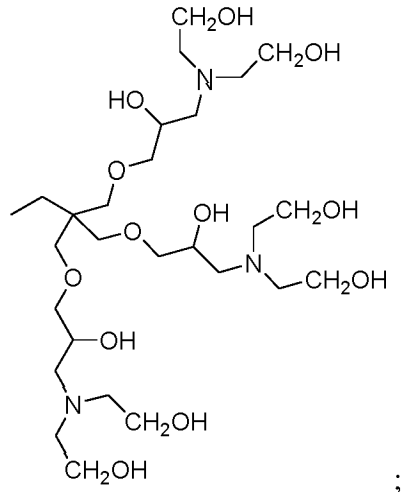
25 Se preparó una solución madre de sulfato de cobre al 1 % disolviendo 10 g de sulfato de cobre en 1 l de agua. Se preparó una serie de cuatro soluciones añadiendo 0 mg (0,0 % p/v), 25 mg, 0,1 % p/v), 50 mg, 1,0 % p/v) o 500 mg, 10,0 % p/v) de dendrímero PEHAM a 5 ml de la solución madre de sulfato de cobre preparada anteriormente. Estos complejos se expusieron brevemente a ultrasonidos, después se incubaron durante la noche a 37 °C y 100 r.p.m. en un baño de agua con agitación, y se dejaron equilibrar a TA durante 1 h. Las suspensiones de dendrímero-entidad activa de sulfato de cobre se filtraron a través de un filtro Whatman a fin de eliminar cualquier contenido sólido. Las muestras se analizaron para determinar el cobre usando procesos convencionales.

30 Las diversas formulaciones de dendrímero PEHAM-sulfato de cobre, preparadas anteriormente, se aplicaron a hojas de plantas (3-5 semanas de edad) y se incubaron durante 24 h en un invernadero. Al cabo de 24 h, las hojas se lavaron con cuidado con 10 ml de agua mientras se recogían todas las aguas de lavado. Las aguas de lavado combinadas se analizaron para determinar el contenido de cobre mediante espectroscopía UV usando un espectrofotómetro UV/VIS Perkin Elmer® Lambda 2. De forma alternativa, se pueden detectar bajos niveles de cobre mediante espectroscopía de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente. El contenido de cobre de formulaciones basadas en dendrímeros se comparó con el control (cobre solo).

35 40 Sin desear quedar ligado a teoría alguna, el uso de cobre con dendrímero en las presentes formulaciones tiene menos cobre eliminado de la hoja por lavado y, por tanto, se retiene un mayor porcentaje de cobre activo sobre la hoja. El cobre se usa como fungicida en uvas. Así pues, se desea menos aplicación de cobre (cantidad y frecuencia) para el medio ambiente mientras se sigue proporcionando protección como fungicida a las uvas.

REIVINDICACIONES

1. Una formulación para su uso en agricultura que comprende un dendrímero con la estructura:



y

asociado con al menos una entidad agrícolamente activa seleccionada entre atrazina y glifosato; y está presente al menos un diluyente o vehículo agrícolamente aceptable; y en el que la eficacia o la duración de la actividad de la entidad agrícolamente activa aumentan.

2. La formulación de acuerdo con la reivindicación 1, estando la formulación en forma de un polvo, espolvoreo, gránulo, líquido, concentrado, suspensión, emulsión, pulverización, gel o aerosol agrícolamente aceptable.

3. Un método para tratar plantas o semillas con una formulación de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la eficacia o la duración de la actividad de la entidad agrícolamente activa aumentan.

4. El método de la reivindicación 5, en el que la formulación mejora la adhesión de la entidad agrícolamente activa a las superficies de las plantas.

5. El método de la reivindicación 5, en el que la formulación mejora la resistencia al agua de la entidad agrícolamente activa adherente a la planta o semilla.

6. El método de la reivindicación 5, en el que la formulación mejora la penetración de la entidad agrícolamente activa en los tejidos de la planta o semilla.