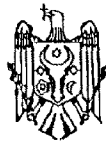




MD 4740 C1 2021.09.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4740** (13) **C1**
(51) Int.Cl: *A01N 43/653* (2006.01)
A01P 1/00 (2006.01)
C07D 249/08 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

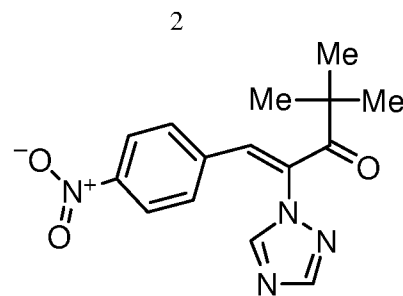
(21) Nr. depozit: a 2020 0056 (22) Data depozit: 2020.06.13	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2021.02.28, BOPI nr. 2/2021
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE CHIMIE AL MECC, MD (72) Inventatori: MACAEV Fliur, MD; ZVEAGHINȚEVA Marina, MD; STÎNGACI Eugenia, MD; POGREBNOI Serghei, MD; LUPAȘCU Lucian, MD (73) Titular: INSTITUTUL DE CHIMIE AL MECC, MD (74) Mandatar autorizat: JOVMIR Tudor	

(54) Aplicare a (Z)-4,4-dimetil-1-(4-nitrofenil)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-il)pent-1-en-3-onei în calitate de compus activ contra bacteriilor fitopatogene

(57) Rezumat:

Invenția se referă la aplicarea compușilor heterociclici, derivați ai 1,2,4-triazolului, în calitate de remediu antibacterian și poate fi utilizată în agricultură.

Esența invenției revendicate constă în aplicarea în calitate de compus activ contra bacteriilor fitopatogene din genul *Erwinia* și *Xanthomonas* a (Z)-4,4-dimetil-1-(4-nitrofenil)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-il)pent-1-en-3-onei cu formula:



Valorile concentrației minime
bactericide constituie 0,4...2,0 μg/mL.
Revendicări: 1

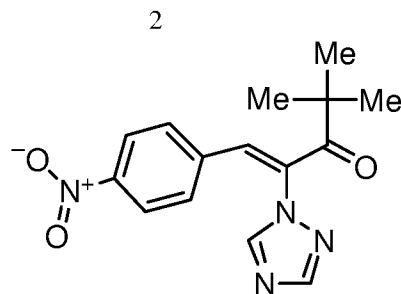
MD 4740 C1 2021.09.30

(54) Use of (Z)-4,4-dimethyl-1-(4-nitrophenyl)-2-(1H-1,2,4-triazole-1-yl)pent-1-en-3-one as an active compound against phytopathogenic bacteria

(57) Abstract:

The invention relates to the use of heterocyclic compounds, 1,2,4-triazole derivatives, as an antibacterial agent and can be used in agriculture.

Summary of the claimed invention consists in the use as an active compound against phytopathogenic bacteria of the *Erwinia* and *Xanthomonas* genus of (Z)-4,4-dimethyl-1-(4-nitrophenyl)-2-(1H-1,2,4-triazole-1-yl)pent-1-en-3-one with the formula:



The values of the minimum bactericidal concentration are 0.4...2.0 µg/mL.

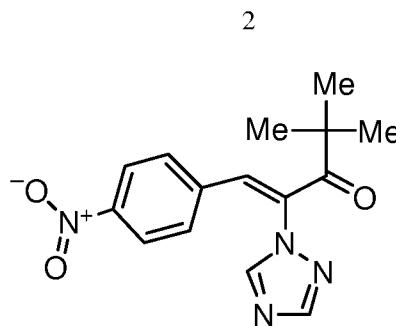
Claims: 1

(54) Применение (Z)-4,4-диметил-1-(4-нитрофенил)-2-(1H-1,2,4-триазол-1-ил)пент-1-ен-3-она в качестве активного соединения против фитопатогенных бактерий

(57) Реферат:

Изобретение относится к применению гетероциклических соединений, производных 1,2,4-триазола, в качестве антибактериального средства и может быть использовано в сельском хозяйстве.

Сущность заявленного изобретения заключается в применении в качестве активного соединения против фитопатогенных бактерий рода *Erwinia* и *Xanthomonas* соединения (Z)-4,4-диметил-1-(4-нитрофенил)-2-(1H-1,2,4-триазол-1-ил)пент-1-ен-3-она с формулой:



Значения минимальной бактерицидной концентрации составляют 0,4...2,0 мкг/мл.

П. формулы: 1

Descriere:**(Descrierea se publică în varianta redactată de solicitant)**

Invenția se referă la aplicarea compușilor heterociclici, derivați ai 1,2,4-triazolului, în calitate de remediu antibacterian și poate fi utilizată în agricultură.

Speciile de bacterii fitopatogene pot provoca diferite boli ale plantelor agricole, în special din genurile *Erwinia* și *Xanthomonas*. De exemplu, *Erwinia amylovora*, bacteria gram-negativă din familia *Enterobacteriaceae*, este agentul cauzal al focului bacterian, o boală devastatoare a plantelor care afectează o gamă largă de specii din cadrul genului *Rosaceae* și este o amenințare globală majoră pentru producția comercială de mere și pere (Pique N., Minana-Galbis D., Merino S. M. Tomas J.. Virulence Factors of *Erwinia amylovora*: A Review. Int. J. Mol. Sci., 2015, 16(6), p. 12836–12854). O altă specie, *E. carotovora*, cauzează putregaiul moale la culturile economico-importante, precum cartofi, roșii, castraveți. În cazul cartofului se produce putregaiul moale al tulpinii și tuberculilor până și după recoltare, astfel reducând considerabil randamentul roadei (Benada M., Boumaaza B., Boudalia S., Khaladi O., Guessas B. Variability of aggressiveness and virulence of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovorum* causing the soft rot on potato tubers in the western of Algeria. Int. J. of Plant Biology, 2018, vol. 9:7568, p. 52-56). *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* este o bacterie gram-negativă biotrofică și este agentul care provoacă pătarea bacteriană a tomatelor (*Solanum lycopersicum* L.) sau a ardeiului (*Capsicum annuum*), o boală care este prezentă la nivel mondial. Simptomele infectării bacteriene includ desfolierea și leziunile necrotice clorotice pe frunze, tulpini, fructe și flori, care conduc ulterior la un randament redus al roadei (Tamir-Ariel D., Navon N., and Burdman S. Identification of Genes in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* induced during its interaction with tomato. J. Bacteriol., 2007, 189(17), p. 6359–6371).

În calitate de remedii contra unor fitopatogeni pot servi compușii heterociclici din clasa triazolilor derivatizați sau fuzionați cu alte grupări ciclice [1]. Triazolii reprezintă o clasă de compuși heterociclici cu catena de 5 atomi ce conține trei atomi de azot în ciclu situați în pozițiile 1,2,4 sau 1,2,3. Proprietățile antimicrobiene ale triazolilor depind puternic de natura substituenților și de conformarea lor. Sunt cunoscuți mii de derivați triazolici, doar unii din ei manifestă activitate suficientă contra agenților fitopatogeni și sunt utilizați în agricultură, în special în calitate de fungicide. De exemplu, propinacozolul (1-[[2-(2,4-diclorofenil)-4-propil-1,3-dioxolan-2-il]metil]-1,2,4-triazol) [2] sau derivatul terț-alcoolic flutriafol (alcoolul (RS)-2,4'-difluoro-α-(1H-1,2,4-triazol-1-ilmetil)benzhidrilic) [3]. De asemenea au fost depistate proprietăți antifungice la un șir de derivați din grupul de viniltriazolilcetone, totodată ele au manifestat proprietăți erbicide și de reglare a creșterii plantelor [4]. Este necesar de menționat că în calitate de agenți contra putregaiului moale, cauzat de bacteria *Erwinia carotovora*, au fost propuși un grup de compuși fungicizi cu diverse structuri chimice, și care nu sunt activi contra bacteriei sus-menționate în caz de aplicare directă pe bacterie, dar sunt activi contra putregaiului moale în caz de aplicare pe solul adiacent prin acțiune fungicidă. Printre compușii propuși se regăsește și unul din clasa 1,2,4-triazolilor cu grupări sulfonamidice în pozițiile 1 și 4 [5]. Prin urmare, prezența ciclului 1,2,4-triazolic nu conferă obligator proprietăți antibacteriene compusului, care se manifestă ca fungicid.

În calitate de remediu contra bacteriilor fitopatogene din specia *Xanthomonas oryzae* a fost propus derivatul 1,4-pentandien-3-onic legat prin gruparea 3-tioeterică cu nucleul de 1,2,4-triazol [6]. Un dezavantaj al acestui compus constă în faptul că el posedă o structură destul de complexă și ca urmare este relativ greu de sintetizat.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în lărgirea arsenalului de remedii antibacteriene contra fitopatogenilor din genul *Erwinia* și *Xanthomonas* care conțin compuși 1,2,4-triazolici, care pot fi obținuți relativ simplu.

Esența invenției constă în aceea că se propune aplicarea în calitate de compus activ contra bacteriilor fitopatogene din genul *Erwinia* și *Xanthomonas* a Z-izomerului viniltriazolcetonei, și anume, (Z)-4,4-dimetil-1-(4-nitrofenil)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-il)pent-1-en-3-ona.

Sinteza acestui izomer este bine elaborată, se desfășoară stereospecific în două etape, din intermediari ușor accesibili și cu un randament mare (70%), conform brevetului MD 4515 B1 2017.09.30. Compusul dezvăluit posedă proprietăți antituberculoase (MD 4519 B1 2017.10.31).

Exemplu de realizare a invenției

În calitate de compus inițial în sinteza Z-izomerului antibacterian (Z)-4,4-dimetil-1-(4-nitrofenil)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-il)pent-1-en-3-ona se utilizează cetona 3,3-dimetil-1-(1H-1,2,4-triazol-1-il)butan-2-ona, obținută conform brevetului MD 4505 B1 2017.08.31.

Procedeul de sinteză stereospecifică a Z-izomerului prevede interacțiunea cetonei sus-menționate cu 4-nitrobenzaldehida în benzen în prezența piperidinei și acidul acetic în cantități catalitice, conform protocolului descris în brevetul MD 4515 B1 2017.09.30.

Activitatea antibacteriană

(Z)-4,4-dimetil-1-(4-nitrofenil)-2-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)pent-1-en-3-ona a fost testată *in vitro* pentru determinarea activității antibacteriene împotriva tulpinilor *Erwinia amylovora*, *Erwinia carotovora* și *Xanthomonas campestris*. Ca standard de control în testele de inhibare *in vitro* au fost folosite preparatele comerciale din clasa triazolilor propiconazolul și flutriafolul.

Pentru evaluarea activității antimicrobiene a fost utilizată metoda diluțiilor succesive duble (http://www.dntpasteur.ru/metodic2_4_2_2.php), care constă în aceea că la etapa inițială se iau șiruri de 10 eprubete în care se introduc câte 1 mL de bulion peptonat pentru bacterii. Ulterior se picură 1 mL de preparat (dizolvat în DMSO) în prima eprubetă (din șirul de 10 eprubete). Se pipetează amestecul obținut, după care 1 mL din acesta se transferă în eprubeta următoare, astfel că procedura se repetă până la eprubeta nr. 10 a șirului. În așa mod, concentrația preparatului inițial se micșorează de 2 ori în fiecare eprubetă următoare. În același timp, se prepară culturi de 24 ore de microorganisme-test. Se prepară inițial suspensii de culturi bacteriene cu densitățile optice (D.O.) de 2,0 și 7,0, respectiv, în conformitate cu indicele McFarland. Ulterior, se transferă 1 mL de suspensie bacteriană obținută într-o eprubetă ce conține 9 mL de apă distilată sterilă. Se amestecă conținutul obținut, după care se transferă 1 mL în eprubeta nr. 2 din șirul de 5 eprubete ce conțin câte 9 mL de apă distilată sterilă. Din eprubeta nr. 5 a șirului se ia câte 0,1 mL de suspensie bacteriană, ceea ce reprezintă doza de însămânțare, și se adaugă în fiecare eprubetă care conține preparatele titrate. Ulterior, eprubetele cu preparatele titrate, în care s-au introdus dozele de însămânțare ale bacteriilor, se plasează în termostat la temperatura de 35°C timp de 24 ore. A 2-a zi se analizează preliminar rezultatele obținute. Ultima eprubetă din șir în care nu se atestă o creștere vizibilă a bacteriilor se consideră a fi concentrația minimă inhibitorie (CMI) a preparatului. Pentru aprecierea concentrației minime bactericide (CMB), conținutul eprubetelor cu CMI și a eprubetelor cu concentrații mai înalte ale preparatelor se însămânțează pe agarul peptonat solid din cutiile Petri cu ajutorul ansei bacteriologice. Cutiile însămânțate se plasează în termostat la temperatura de 35°C pentru 24 ore. Concentrația preparatelor care nu permit creșterea nici a unei colonii bacteriene se consideră a fi concentrația minimă bactericidă a preparatului.

Rezultatele determinării activității contra bacteriilor fitopatogene sunt expuse în Tabelul de mai jos.

Tabel

Concentrațiile bactericide minime (CBM) ale Z-izomerului sus-menționat și ale compușilor de referință

Tulpina de bacterii	CBM (μg/mL)		
	(Z)-4,4-dimetil-1-(4-nitrofenil)-2-(1 <i>H</i> -1,2,4-triazol-1-il)pent-1-en-3-ona	Propiconazol	Flutriafol
<i>Erwinia amylovora</i>	0,4...2,0	62,5...125,0	62,5...125,0
<i>Erwinia carotovora</i>	0,4...2,0	62,5...125,0	62,5...125,0
<i>Xanthomonas campestris</i>	0,4...2,0	62,5...125,0	62,5...125,0

Rezultatul determinării activității antibacteriene, exprimat în concentrația minimă bactericidă (100% inhibiție), a constituit 0,4...2,0 μg/mL pentru Z-viniltriazolcetona revendicată. Totodată pentru compușii de referință propiconazol și flutriafol acest procent de inhibiție constituie respectiv 62,5...125,0 μg/mL.

Aceste rezultate demonstrează că (Z)-4,4-dimetil-1-(4-nitrofenil)-2-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)pent-1-en-3-ona manifestă o acțiune antibacteriană sporită contra tulpinilor fitopatogene din genul *Erwinia* și *Xanthomonas*. Această activitate este una neevidentă, reieșind din activitatea manifestată de triazolii comerciali.

5 Așadar, a fost stabilit că activitatea bactericidă a Z-izomerului propus față de tulpinile fitopatogene sus-menționate este de 31 de ori mai mare față de cea a pesticidelor de referință propiconazol și flutriafol. Prin urmare, (Z)-4,4-dimetil-1-(4-nitrofenil)-2-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)pent-1-en-3-ona poate fi utilizată în calitate de compus activ în remediile antibacteriene pentru agricultură.

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Subhas Sahoo, K.N. Sindhu, K. Sreeveena. The Significance of 1, 2, 4 Triazoles in Agriculture Science: A Review. Research J. Pharm. Techn., 2019, 12(10), p. 5091-5097. Regăsit în Internet la 2020.05.19, URL: <https://rjptonline.org/HTMLPaper.aspx?Journal=Research%20Journal%20of%20Pharmacy%20and%20Technology;PID=2019-12-10-92>
2. Propinocazole. Wikipedia, The Free Encyclopedia. Regăsit în Internet la 2020.05.18, URL: <https://en.wikipedia.org/wiki/Propiconazole>
3. JMPR2005- FAO of UN. FLUTRIAFOL. Regăsit în Internet la 2020.05.19, URL: http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Report11/Flutriafol.pdf
4. US 4554007 A 1985.11.19
5. WO 2012011287 A2 2012.01.26
6. CN 109721559 A 2019.05.07

(57) Revendicări:

Aplicare a (Z)-4,4-dimetil-1-(4-nitrofenil)-2-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)pent-1-en-3-unei în calitate de compus activ contra bacteriilor fitopatogene din genul *Erwinia* și *Xanthomonas*.

RAPORT DE DOCUMENTARE

I. Datele de identificare a cererii		
(21) Nr. depozit: a 2020 0056 (22) Data depozit: 2020.06.13 (71) Solicitant: INSTITUTUL DE CHIMIE AL MECC, MD (54) Titlul: Utilizare a (Z)-4,4-dimetil-1-(4-nitrofenil)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-il)pent-1-en-3-onei in calitate de ingredient activ contra bacteriilor fitopatogene		
II. Clasificarea obiectului invenției:		
(51) Int.Cl: <i>A01N 43/653</i> (2006.01) <i>A01P 1/00</i> (2006.01) <i>C07D 249/08</i> (2006.01)		
III. Colecții și Baze de date de brevete cercetate (denumirea, termeni caracteristici, ecuații de căutare reprezentative)		
MD - Intern « Documentare Invenții » (inclusiv cereri nepublicate; trunchiere automată stanga/dreapta): A01N 43/653, C07D 249/08, A01P 1/00 viniltriazol, Erwinia, Xanthomonas, antibacterial "Worldwide" (Espacenet): A01N43/653, C07D249/08, A01P1/00 "vinyl triazole ketone", Erwinia, Xanthomonas, bactericidal EA, CIS (Epatis): A01N 43/653, C07D 249/08, A01P 1/00 винилтриазолкетон, Erwinia, Xanthomonas, антибактериальный		
IV. Baze de date și colecții de literatură nonbrevet cercetate		
www.google.com books.google.com Google Scholar		
V. Documente considerate a fi relevante		
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si, unde este cazul, indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A, D	Subhas Sahoo, K.N. Sindhu, K. Sreeveena. The Significance of 1, 2, 4 Triazoles in Agriculture Science: A Review. Research J. Pharm. Techn., 2019, 12(10), p. 5091-5097. Regăsit în Internet la 2020.05.19, URL: https://rjptonline.org/HTMLPaper.aspx?Journal=Research%20Journal%20of%20Pharmacy%20and%20Technology;PID=2019-12-10-92	1
A, D	Propinocazole. Wikipedia, The Free Encyclopedia. Regăsit în Internet la 2020.05.18, URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Propiconazole	1
A, D	JMPR2005- FAO of UN. FLUTRIAFOL. Regăsit în Internet la	1

	2020.05.19, URL: < http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Report11/Flutriafol.pdf >	
A, D	US 4554007 A 1985.11.19	1
A, D	WO 2012011287 A2 2012.01.26	1
A, D, C	CN 109721559 A 2019.05.07	1
A	MD 4519 B1 2017.10.31	1
A	MD 4515 B1 2017.09.30	1
A	JPS 60202868 A 1985.10.14	1
A	JPS 55111477 A 1980.08.28	1
A	US 4749716 A 1988.06.07	1
A	Yuji Funaki, Yukio Ishiguri, Toshiro Kato, Shizuya Tanaka. Structure-Activity Relationships of Vinyl Triazole Fungicides. J. Pesticide Sci., 1984, v. 9, p. 229-236, găsit în Internet la 14.12.2020, URL : https://www.jstage.jst.go.jp/article/jpestics1975/9/2/9_2_229/_pdf	1
A	Lan Yanga, Xiao-Ping Bao. Synthesis of novel 1,2,4-triazole derivatives containing the quinazolinylpiperidinyl moiety and N-(substituted phenyl)acetamide group as efficient bactericides against the phytopathogenic bacterium Xanthomonas oryzae pv. oryzae. RSC Adv., 2017, v. 7, p. 34005-34011, găsit în Internet la 14.12.2020, URL : https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2017/ra/c7ra04819j#!divAbstract	1

*** categoriile speciale ale documentelor citate:**

A – document care definește stadiul anterior **T** – document publicat după data depozitului sau

general	a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidență principiul sau teoria pe care se bazează invenția
X – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă când documentul este luat în considerație de unul singur	E – document anterior dar publicat la data depozit național reglementar sau după aceasta dată
Y – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă când documentul este asociat cu unul sau mai multe documente de aceeași categorie	D – document menționat în descrierea cererii de brevet
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expoziție sau la orice alte mijloace de divulgare	C – document considerat ca cea mai apropiată soluție
	& – document, care face parte din aceeași familie de brevete
P - document publicat înainte de data de depozit, dar după data priorității invocate	L – document citat cu alte scopuri
Data finalizării documentării 14.12.2020	
Examinator	GUȘAN Ala 