

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 673 607**

51 Int. Cl.:

C07F 9/58 (2006.01)

A01N 43/56 (2006.01)

A01N 43/647 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.01.2015 PCT/EP2015/051535**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.08.2015 WO15113944**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.01.2015 E 15701350 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.03.2018 EP 3099699**

54 Título: **Análogos de pirabactina para modular el desarrollo vegetal**

30 Prioridad:

28.01.2014 EP 14152795

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

25.06.2018

73 Titular/es:

**UNIVERSITEIT GENT (100.0%)
Sint-Pietersnieuwstraat 25,
9000 Ghent, BE**

72 Inventor/es:

**STEVENS, CHRISTIAN;
GEELEN, DANNY;
HEUGEBAERT, THOMAS y
VERSTRAETEN, INGE**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 673 607 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

Análogos de pirabactina para modular el desarrollo vegetal

Campo técnico de la invención

La presente invención se refiere a compuestos que se pueden utilizar para controlar el desarrollo vegetal. De hecho, la presente invención describe una nueva clase de análogos de pirabactina que tienen un efecto fisiológico sobre, por ejemplo, la germinación de semillas y/o el cierre de los estomas, y/o que tienen efectos sobre el desarrollo de la raíz y los brotes y la organogénesis. Por lo tanto, estos compuestos anteriores se pueden utilizar para controlar el desarrollo vegetal, tal como, por ejemplo, incrementando la tolerancia de las plantas frente al estrés por sequía o para controlar fenómenos fisiológicos tales como la germinación precoz, la tolerancia frente a agentes patógenos, etc.

Técnica anterior

Con los cambios climáticos en curso y el aumento de la población, las demandas de rendimiento de los cultivos están en continuo aumento (International Panel on Climate Change, 2007; Tilman et al., 2011). Además de minimizar las emisiones de CO₂ de la agricultura, es necesario desarrollar cultivos que hagan frente mejor a las condiciones de crecimiento subóptimas, como la sequía, la salinidad y las temperaturas crecientes. Las manipulaciones o el control del desarrollo vegetal y la señalización en plantas son formas de mejorar las respuestas de tolerancia en las plantas y de asegurar su flexibilidad en un entorno cambiante sin efectos negativos sobre el rendimiento.

Aunque se ha mostrado que los tratamientos de las plantas con hormonas vegetales exógenas, tales como ácido abscísico (ABA), mejoran la tolerancia al estrés, el uso de ABA mediante pulverización tópica, para proteger las plantas contra los efectos de condiciones de sequía, es limitado debido a los efectos pleiotrópicos colaterales, tales como un crecimiento inhibido de la raíz primaria (Sreenivasulu et al., 2012). Por otra parte, ABA es sensible a la luz y se degrada rápidamente cuando entra en contacto con las plantas (Hao et al., 2010). Estos inconvenientes han estimulado la búsqueda de nuevas moléculas que pongan en marcha la vía de señalización de ABA más específicamente, sin los efectos colaterales y con una mejor estabilidad para que las aplicaciones en la agricultura sean factibles (Joshi-Saha et al., 2011; Melcher et al., 2009).

En 2009, un escrutinio de genética química dio como resultado la identificación de un agonista de ABA: la pirabactina, que estructuralmente no se relaciona con ABA (Park et al., 2009). Un análisis con micromatrices de las respuestas de ABA en semillas y plántulas sugirió que la pirabactina es un agonista selectivo de ABA (Kitahata y Asami, 2011; Park et al., 2009). Un escrutinio adicional de mutantes resistentes a la pirabactina hizo posible la identificación de una familia de proteínas del receptor de ABA: las proteínas PYR1/PYL/RCAR START (Kitahata y Asami, 2011; Park et al., 2009). Aunque no hay similitudes estructurales o químicas aparentes entre la sulfonamida pirabactina y ABA, ambos actúan a través de la familia de receptores PYR/PYL (Hao et al., 2010). Sin embargo, la pirabactina no provoca todas las respuestas descritas para ABA (Park et al., 2009; Peterson et al., 2010). Además, también la interacción con los receptores difiere entre las dos moléculas. La pirabactina actúa como un antagonista de PYL2, lo que significa que la unión de pirabactina en el receptor no estimula la atracción de PP2Cs y, por lo tanto, no elimina los factores inhibidores de la señalización aguas abajo. Esto es al contrario que en ABA, que es un agonista de este receptor (Melcher et al., 2010a; Mosquna et al., 2011). Esta observación sugiere que la pirabactina modula diferencialmente la actividad de los receptores de ABA y se puede dirigir incluso únicamente a un subgrupo de receptores. Sin embargo, desde su descubrimiento, la pirabactina no se ha aplicado para mejorar la producción de cultivos, por ejemplo, en condiciones de sequía. De hecho, se ha descrito que las sulfonamidas tienen efectos negativos sobre el crecimiento de las plantas e incluso se emplean como herbicidas (Audus y Quastel, 1948; Crowdy y Jones, 1956). Por otra parte, los efectos de la pirabactina sobre el tejido vegetativo son limitados y la actividad agonista de ABA es específica para las semillas.

Por tanto, existe una gran necesidad de compuestos alternativos a la pirabactina con propiedades químicas mejoradas.

Breve descripción de las figuras

Fig. 1: Efecto sobre la elongación de la raíz primaria de ABA, pirabactina y los diferentes análogos en una concentración de 10 μ M.

Fig. 2: ABA, pirabactina y los diferentes análogos de pirabactina afectan diferencialmente a la iniciación de la raíz lateral, (A) representada como la suma de raíces laterales emergidas (LR) y los primordios de raíces laterales (LRP) o como valores de densidad (n°/cm de raíz primaria) (B).

Fig. 3: Iniciación de las raíces adventicias en plántulas etioladas de *Arabidopsis thaliana* que crecen sobre un medio con ABA, pirabactina o análogo de pirabactina. Los compuestos se administran a 10 μ M.

Fig. 4: Porcentajes de germinación a diferentes concentraciones de ABA y pirabactina respectivamente.

Fig. 5: Porcentajes de germinación obtenidos con una concentración 10 μ M de los diferentes análogos de pirabactina.

Fig. 6: A. Fenotipo de los brotes de plántulas de control cultivadas sobre medio basal, exento de hormonas. B. Las plántulas que crecen sobre medio con ABA 10 μ M muestran un número reducido de hojas formadas recientemente, el área de la hoja es más pequeña y el contenido en clorofila de las hojas se ve afectado. C. La pirabactina 10 μ M también afecta al crecimiento de los brotes y da como resultado plántulas con brotes más pequeños que las plántulas de control. D. El área promedio de los brotes en las plántulas se mide usando ImageJ. Las barras en el gráfico con un código de letras diferente son números significativamente diferentes.

Fig. 7: Pérdida de peso promedio de las hojas tratadas previamente con ABA 10 μ M o los análogos de pirabactina E1-E10 después de 6 horas de exposición a un flujo de aire seco.

Fig. 8: Apertura estomática relativa de estomas de control controlada durante 30 minutos en ausencia de compuestos. Los valores indicados son en relación con la apertura estomática medida al comienzo del experimento.

Fig. 9: A. ABA 10 μ M induce rápidamente el cierre de los estomas. B. Tiras de hojas epidérmicas tratadas con pirabactina 10 μ M en solución mostraron un efecto sobre los estomas.

Fig. 10: Apertura estomática relativa después del tratamiento de A. E1, B. E2, C. E3, D. E4, E. E5, F. E6, G. E7, H. E8, I. E9, J. E10, K. D1, L. D2 y M. D3. Todos los compuestos se evaluaron a una concentración 10 μ M.

Descripción de la invención

La presente invención se refiere, en esencia, a la sustitución del grupo sulfonamida dentro de la pirabactina por un grupo fosfonamida. Puesto que el fósforo es uno de los elementos esenciales para un crecimiento óptimo de las plantas, el grupo funcional fosfonamida es una alternativa favorable a las sulfonamidas, ya que las plantas están mejor equipadas para su absorción. La biocompatibilidad con enzimas vegetales también se adapta mejor para productos a base de fosfato que para los sulfatos. A pesar de la sustitución del receptor de azufre por un receptor de fósforo, la unión se puede mantener debido a su peso molecular y su geometría similares. Por otra parte, la formación de enlaces de hidrógeno en la cavidad de la unión de los receptores podría tener lugar a través de las dos sustituciones de oxígeno presentes tanto en la sulfonamida como en la fosfonamida. Ambas moléculas tienen una solubilidad, polaridad comparables y se ven afectadas de manera similar por diferentes pH. Todas estas características son favorables para la actividad biológica de estas moléculas.

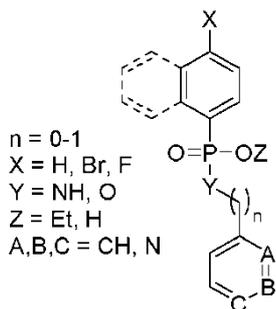
La presente invención, por lo tanto, se refiere a compuestos que contienen fosfonamida que se pueden utilizar para controlar una ruta implicada en el desarrollo vegetal. La expresión 'una ruta implicada en el desarrollo vegetal' se refiere a una serie de estados transitorios de expresión génica y de proteínas, productos bioquímicos y condiciones fisiológicas que conducen a la formación de nuevos órganos y estructuras de una planta.

El término 'planta' incluye plantas completas, órganos y/o estructuras vegetativas de los brotes (por ejemplo, hojas, tallos y tubérculos), raíces, flores y órganos florales, óvulos, semillas, frutas, plántulas, tejido vegetal, células y progenie de las mismas. La clase de plantas es generalmente tan amplia como la clase de plantas superiores e inferiores, incluyendo angiospermas (plantas monocotiledóneas y plantas dicotiledóneas), gimnospermas, helechos y algas multicelulares.

La presente invención describe una nueva clase de análogos de pirabactina que tienen un efecto fisiológico sobre, por ejemplo, la germinación de semillas y/o el cierre de los estomas, y/o tienen efectos sobre el desarrollo de la raíz y el desarrollo de los brotes y la organogénesis. Por lo tanto, estos últimos compuestos se pueden utilizar para controlar el desarrollo de plantas tal como, por ejemplo, el aumento de la tolerancia de las plantas al estrés por sequía o para controlar fenómenos fisiológicos tales como la germinación precoz, la tolerancia a agentes patógenos, etc.

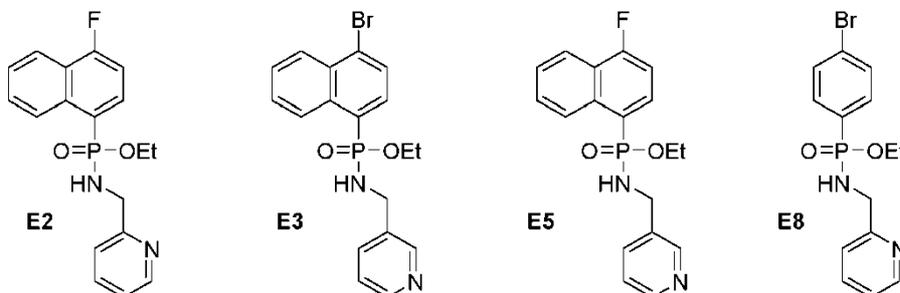
La expresión 'desarrollo de los brotes' se refiere a la expansión de la biomasa del brote mediante división celular y la expansión de las células en el meristemo apical, el meristema axilar y brotes adventicios formados de nuevo.

La presente invención se refiere por tanto a un compuesto, o a una de sus sales, de fórmula:



Esta última fórmula representa de este modo una fórmula genérica de los compuestos reivindicados.

La presente invención se refiere más específicamente a los compuestos denominados E2, E3, E5 o E8 y que tienen las siguientes fórmulas:



- 5 La presente invención se refiere además a un método para sintetizar un compuesto como se ha descrito anteriormente que comprende:
- fosfonilar un precursor de benceno o de naftaleno halogenado adecuado por medio de un intercambio de litio-halógeno y una desactivación posterior con clorofosfato de dietilo para obtener compuestos intermedios de fenilfosfonato o naftilfosfonato de dietilo,
- 10
- monodesalquilar dichos compuestos intermedios de fenilfosfonato o naftilfosfonato de dietilo por medio de condiciones de hidrólisis básica con el fin de obtener compuestos intermedios de ácido fosfónico,
 - activar dichos compuestos intermedios de ácido fosfónico a sus clorofosfonatos correspondientes por medio de cloruro de tionilo, y realizar un desplazamiento nucleófilo de dicho cloruro en condiciones básicas por medio de un bencil- (n=1) o fenil- (n=0) amina (Y=NH) o alcohol (Y=O),
- 15
- intercambiar el grupo alcoxi del fosfonato restante por un grupo hidroxilo mediante hidrólisis básica, mediada por hidróxido de litio.

En otras palabras, la presente invención se refiere a un método para sintetizar el compuesto tal y como se ha descrito anteriormente, que comprende (véase también adicionalmente en la sección de Ejemplos: 'Esquema general para la síntesis de compuestos E y D, y sus respectivos compuestos intermedios 2, 3 y 3'):

- 20
- Etapa 1: La fosfonilación de un benceno o naftaleno halogenado adecuado (precursor **1**, véase el Esquema general) por medio de un intercambio de litio-halógeno y una desactivación posterior con clorofosfato de dietilo. Los regímenes de temperatura, tiempo y orden de adición dependientes del sustrato que evitan la litiación dual, la alquilación dual de fosfonato y la adición de alquil-litio al fosfonato resultante, se describen adicionalmente en la sección de ejemplos.
- 25
- Etapa 2: La monodesaquilación de fenilfosfonato o naftilfosfonato de dietilo (compuestos intermedios **2**, tal y como se obtienen a partir de la etapa 1) por medio de condiciones de hidrólisis básica, lo que da como resultado ácidos fosfónicos (compuesto intermedio **3**). Se obtuvieron conversiones completas y limpias, en consonancia con los informes de Mucha y Xie (Mucha, 2006; Xie, 2009). Una extracción ácido-base proporciona un método de aislamiento conveniente.
- 30
- Etapa 3: La activación de los ácidos fosfónicos **3** tal y como se han obtenido a partir de la etapa 2 a sus correspondientes clorofosfonatos **3'** por medio de cloruro de tionilo (etapa 3a). El desplazamiento nucleofílico de dicho cloruro en condiciones básicas (etapa 3b) por medio de un bencil- (n=1) o fenil- (n=0) amina (Y=NH) o alcohol (Y=O) adecuados, proporciona los compuestos reivindicados tales como los compuestos denominados E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9 y E10, y D1, D2 y D3 (véase más adelante en la sección de ejemplos) con un rendimiento de moderado a bueno. La etapa de activación y la etapa de desplazamiento nucleofílico se combinan ya que el compuesto intermedio **3'** no se tiene que aislar.
- 35

Etapa 4: El intercambio mediado por hidróxido de litio del grupo alcoxi fosfonato restante por un grupo hidroxilo.

La presente invención se refiere además al uso del compuesto 'E2', 'E3' y 'E8' para inducir específicamente el cierre de los estomas sin afectar al crecimiento de la raíz o de los brotes.

- 40
- La expresión 'cierre de los estomas' se refiere a la pérdida de la presión de turgencia en las células oclusivas lo que conduce a una reducción en la conductancia estomática, determinando la tasa de paso de dióxido de carbono, oxígeno y vapor de agua a través de los estomas de una hoja.

La expresión 'crecimiento de la raíz' se refiere a la expansión de la biomasa de la raíz mediada por la división celular

y la expansión celular en el meristemo primario y en los meristemos radiculares laterales y adventicios iniciados de nuevo.

La expresión 'crecimiento de los brotes' se refiere a la expansión de la biomasa de los brotes mediante división celular y expansión celular en el meristemo apical, el meristema axilar y los brotes adventicios formados de nuevo.

- 5 El cierre de los estomas se induce típicamente mediante condiciones de sequía o se puede imitar en condiciones normales de agua, pulverizando las hojas con una solución de ácido abscísico a una concentración entre 1-10.000 ppm, con el objetivo de aumentar la conservación de agua (Daszkowska-Golec y Szarejko, 2013). El compuesto E2 se puede aplicar utilizando una tecnología de pulverización similar para lograr lo mismo, con la diferencia principal de que E2 no ejerce una inhibición del crecimiento de la raíz o de los brotes, sino que por el contrario favorece el crecimiento regular de la raíz, lo que promueve una tolerancia frente a condiciones de sequía futuras y el acceso a recursos de agua más profundos.

La presente se refiere además al uso del compuesto 'E5' para inhibir específicamente la germinación de semillas.

- 15 La expresión 'germinación de semillas' se refiere a la transición de un estado latente a un estado de crecimiento activo durante el cual el embrión se desarrolla en una plántula. En algunos cultivos la pérdida de latencia de las semillas debido a una domesticación y cría, provoca una germinación prematura que conduce a una mala calidad del grano y a pérdidas económicas.

Empapar, embeber u otro tipo de tratamiento de semillas tal como el revestimiento con soluciones que contienen ácido abscísico, inhiben la germinación de las semillas (Zhang et al., 2010). En un enfoque similar, el compuesto E5 se puede aplicar en soluciones para pulverizar, embeber o revestir.

- 20 La presente invención, por lo tanto, también se refiere a una formulación química agrícola formulada para poner en contacto con plantas, en donde la formulación comprende un compuesto como se ha descrito anteriormente.

- 25 Las formulaciones son, por lo tanto, adecuadas para el tratamiento de plantas o material de propagación de plantas, tales como semillas. Los aditivos adecuados incluyen agentes tamponadores, agentes de recubrimiento, polisacáridos y agentes de abrasión. Ejemplos de vehículos incluyen agua, soluciones acuosas, suspensiones, sólidos y polvos secos. Opcionalmente, las formulaciones también pueden incluir al menos un tensioactivo, un herbicida, un fungicida, un pesticida o un fertilizante. Por lo tanto, la presente invención se refiere a una formulación como se ha descrito anteriormente que comprende además al menos uno entre un herbicida, un fungicida, un pesticida, un fertilizante o un tensioactivo.

- 30 La presente invención se refiere además a un método para modular el desarrollo de una planta, en donde el método comprende poner en contacto una planta con una cantidad suficiente de la formulación como se ha descrito anteriormente, para modular el desarrollo de dicha planta en comparación con no poner en contacto la planta con dicha formulación.

- 35 La expresión 'desarrollo de la planta' se define por el crecimiento de una planta mediante división celular y expansión celular. Estos procesos se producen de una manera coordinada y organizada dentro de los meristemos en ciertos lugares en el organismo vegetal. Los meristemos generan nuevos órganos ya sea en la raíz o en la parte de los brotes de la planta. El control de la división celular y la expansión en los meristemos determina la estructura de una planta. El desarrollo de la planta también incluye la transición de un estado ontogénico a otro, tal como por ejemplo de la fase vegetativa a la fase regenerativa.

El término 'modular' significa cambiar, regular, influir y/o ajustar el desarrollo de una planta.

- 40 La presente invención se refiere además a un método como se ha descrito anteriormente en el que dicha modulación incrementa la tolerancia frente al estrés por sequía.

El término 'estrés' se refiere a un estado molecular, bioquímico y fisiológico provocado por condiciones ambientales desfavorables. Una respuesta frente al estrés se refiere a los cambios moleculares, bioquímicos y fisiológicos que son inducidos por condiciones ambientales alteradas.

- 45 La expresión 'estrés por sequía' se refiere a un estado fisiológico de una planta que está expuesta a condiciones con reducción de la disponibilidad de agua. El estrés por sequía suele ir acompañado de cambios físicos y bioquímicos o de lesión de las estructuras vegetales. Estos incluyen el marchitamiento, la reducción de la fotosíntesis y el aumento temporal del crecimiento de las raíces, la detención del desarrollo de los brotes.

- 50 La expresión 'tolerancia al estrés por sequía' se refiere a adaptaciones genéticas, bioquímicas y fisiológicas que experimenta una planta para resistir los períodos de sequía.

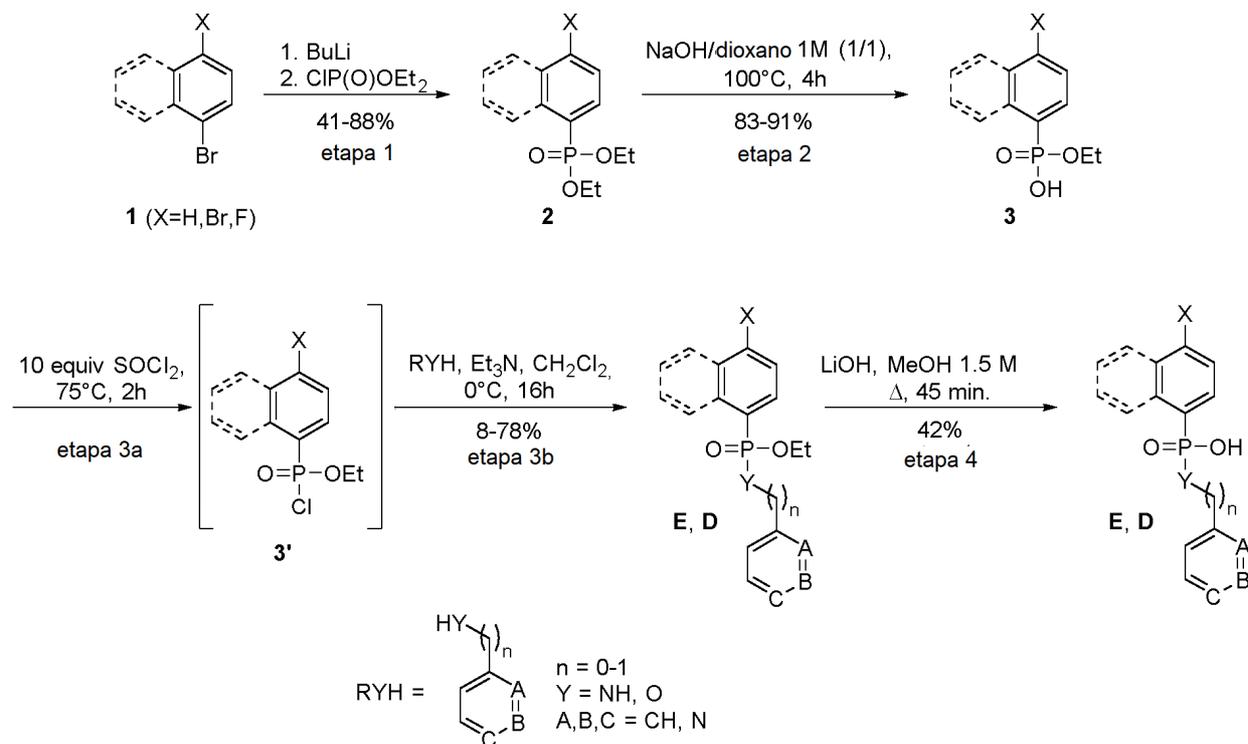
La presente invención se ilustrará ahora mediante los siguientes ejemplos, no limitativos.

Ejemplos

Materiales y métodos

1. Síntesis de los análogos con fosfonamida de la presente invención

La síntesis química y las estructuras de los 13 análogos con fosfonamida (denominados E1-E10 y D1-D3, véase 'E' y 'D' en las figuras), así como sus compuestos intermedios sintéticos **2**, **3** y **3'** se proporcionan en el 'Esquema general para la síntesis de los compuestos E y D, y sus respectivos compuestos intermedios 2, 3 y 3' como se proporciona a continuación:



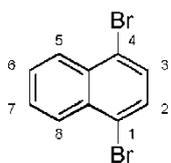
Esquema general para la síntesis de los compuestos E y D, y sus respectivos compuestos intermedios 2, 3 y 3'

Observaciones generales para los métodos sintéticos orgánicos:

El éter dietílico y el tetrahidrofurano se destilaron a partir de cetil benzofenona de sodio o sodio antes del uso. Los disolventes y reactivos disponibles comercialmente se adquirieron en Sigma-Aldrich o Acros y se usaron sin una purificación adicional, a menos que se indique lo contrario. La purificación de las mezclas de reacción se realizó mediante cromatografía en columna usando una columna de vidrio rellena de gel de sílice (Acros, tamaño de partícula 0,035-0,070 mm, diámetro de poro aprox. 6 nm). Los sistemas disolventes se determinaron mediante un análisis inicial con TLC sobre placas de vidrio, recubiertas con gel de sílice (Merck, Kieselgel 60 F254, recubiertas previamente 0,25 mm). La visualización de los compuestos sobre las placas de TLC se realizó por radiación UV o colocación con una solución de KMnO_4 o yodo elemental. Los espectros de alta resolución de $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz) y $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz) se ejecutaron en un espectrómetro Jeol Eclipse FT 300 a temperatura ambiente. Las asignaciones de picos se obtuvieron con la ayuda de los espectros DEPT, 2D-HSQC y 2D-COSY. Los compuestos se diluyeron en cloroformo deuterado. Los espectros de masas de baja resolución se registraron por medio de una inyección directa en un espectrómetro de masas Agilent 1100 Series LC/MSD tipo SL con geometría de ionización por electrospray (ESI 70V) y usando un detector selectivo de masas (cuadrupolo). Los espectros IR se obtuvieron a partir de un espectrómetro Perkin-Elmer BX FT-IR. Todos los compuestos se analizaron en forma pura con un accesorio ATR (reflectancia total atenuada).

25 Síntesis de 1,4-dibromonaftaleno (Precursor 1 que contiene un núcleo de naftilo en donde X = Br)

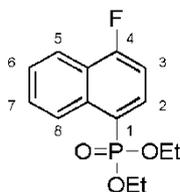
En un matraz de 100 ml se disuelven 5,00 g (0,039 mol, 1 equiv.) de naftaleno en 75 ml de diclorometano. El matraz se coloca bajo atmósfera inerte y se enfría a -30°C , después de lo cual 25,00 g (0,156 mol, 4 equiv.) de Br_2 se añaden gota a gota. Quince minutos después de completar la adición de bromo, la reacción continúa durante 72 h a temperatura ambiente. La reacción se inactiva usando NaHSO_3 1 M. La fase orgánica se seca mediante MgSO_4 y se evaporan los elementos volátiles. El compuesto cristaliza utilizando diclorometano frío (-18°C), mediante la adición lenta de hexanos, dando como resultado un rendimiento del 70%. A partir del licor madre, se podía recuperar un 17% adicional mediante cromatografía en columna usando hexanos.



¹H-RMN (300MHz, CDCl₃): δ 7,61-7,67 (4H, m, C₂H_{arom}, C₃H_{arom}, C₆H_{arom}, C₇H_{arom}); 8,22-8,28 (2H, m, C₅H_{arom}, C₈H_{arom}). **¹³C-RMN (75MHz, CDCl₃):** δ 122,7 (2x C_qBr); 127,9 (C₅H_{arom}, C₈H_{arom}); 128,3 (C₆H_{arom}, C₇H_{arom}); 130,2 (C₂H_{arom}, C₃H_{arom}); 133,0 (2x C_qC_qBr). **IR (cm⁻¹) vmáx:** 1584; 1492. **PF:** 74,3-75,3°C (hexanos). **Rendimiento:** 87%.

5 **Síntesis de 4-fluoronaft-1-il-fosfonato de dietilo: método general para la síntesis del compuesto intermedio 2, en donde X = F**

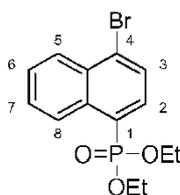
En un matraz seco de 250 ml se disuelven 3,00 g (13,3 mmol, 1 equiv.) de 1-bromo-4-fluoronaftaleno en 150 ml de éter dietílico seco. La mezcla se coloca bajo atmósfera inerte y se enfría a -78°C. Posteriormente, se gotean lentamente 10 ml (0,020 mol, 1,5 equiv.) de una solución 2 M de BuLi. Después de continuar la reacción durante 1 h, se añaden 3,44 g (0,020 mol, 1,5 equiv.) de clorofosfato de dietilo a -78°C y se permite que la mezcla se caliente a temperatura ambiente. Después de 1 h a temperatura ambiente, la reacción se inactiva usando 200 ml de cloruro de amonio acuoso saturado y se extrae tres veces por medio de diclorometano. Las fracciones orgánicas combinadas se secan usando MgSO₄ y los elementos volátiles se evaporan. La purificación se realizó usando cromatografía en columna y el compuesto se aisló con un rendimiento del 88% como un aceite amarillo.



15 **¹H-RMN (300MHz, CDCl₃):** δ 1,31 (6H, t, J=7,2Hz, 2x CH₃); 4,01-4,27 (4H, m, 2x CH₂); 7,20 (1H, dxdd, J=10,2Hz, 7,7Hz, 2,8Hz, C₂H_{arom}); 7,59-7,71 (2H, m, 2x CH_{arom}); 8,20 (1H, dxd, J=8,0Hz, 6,1Hz, CH_{arom}); 8,25 (1H, dxd, J=8,0Hz, 5,8Hz, C₃H_{arom}); 8,52 (1H, d, J=8,0Hz, CH_{arom}). **¹³C-RMN (75MHz, CDCl₃):** δ 16,4 (2x CH₃, d, J=6,9Hz); 62,3 (2x CH₂, d, J=5,8Hz); 108,6 (C₂H_{arom}, dxdd, J=20,2Hz, 17,9Hz); 120,7 (C_qP, dxdd, J=186,9Hz, 4,6Hz); 121,2 (CH_{arom}, d, J=6,9Hz); 124,1 (C_q C_qP, t, J=15,0Hz); 126,6 (CH_{arom}, t, J=3,5Hz); 126,8 (CH_{arom}); 128,5 (CH_{arom}); 134,6 (C_q C_qF, dxdd, J=12,7Hz, 4,6Hz); 135,5 (C₃H_{arom}, t, J=9,8Hz); 162,1 (C_qF, dxdd, J=259,6Hz, 4,6Hz). **¹⁹F-RMN (282MHz, CDCl₃):** δ 114,30. **³¹P-RMN (121MHz, CDCl₃):** δ 19,00. **MS (ESI): m/z (%):** 565 (2M+H⁺, 35), 283 (M+H⁺, 100). **IR (cm⁻¹) vmáx:** 1164 (P-OEt); 1234 (P=O); 1628; 1600; 1573; 1509. **Cromatografía:** hexanos/EtOAc 50/50 R_f = 0,25. **Rendimiento:** 88%.

25 **Síntesis de 4-bromonaft-1-il-fosfonato de dietilo: método general para la síntesis del compuesto intermedio 2 en donde X = Br, H**

En un matraz seco de 250 ml se disuelven 3,00 g (10 mmol, 1 equiv.) de 1,4-dibromonaftaleno en 150 ml de éter dietílico seco. La mezcla se coloca bajo atmósfera inerte y se enfría a -78°C. Posteriormente, se gotean lentamente 5,5 ml (0,011 mol, 1,1 equiv.) de una solución 2 M de BuLi. Después de continuar la reacción durante 30 min a -30°C, 3,44 g (0,020 mol, 1,5 equiv), la mezcla se enfría a -78°C y se añade por medio de una cánula a un matraz de 250 ml que contiene 17,26 g (0,1 mol, 10 equiv) de clorofosfato de dietilo en éter dietílico a -78°C. La mezcla se deja calentar a temperatura ambiente y después de 1 h se inactiva usando 200 ml de agua. El compuesto se extrae tres veces por medio de diclorometano, las fracciones orgánicas combinadas se lavan tres veces con NaOH 1 M, se secan usando MgSO₄ y los elementos volátiles se evaporan. La purificación se realizó usando cromatografía en columna y el compuesto se aisló con un rendimiento del 74% como un sólido blanco.

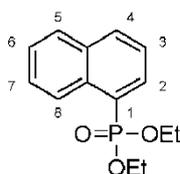


40 **¹H-RMN (300MHz, CDCl₃):** δ 1,31 (6H, t, J=7,2Hz, 2x CH₃); 4,01-4,28 (4H, m, 2x CH₂); 7,66 (2H, m, 2x CH_{arom}); 7,87 (1H, dxdd, J=7,7Hz, 2,8Hz, C₃H_{arom}); 8,08 (1H, dxdd, J=16,0Hz, 7,7Hz, C₂H_{arom}); 8,32-8,37 (1H, m, CH_{arom}); 8,53-8,57 (1H, m, CH_{arom}). **¹³C-RMN. (75MHz, CDCl₃):** δ 16,4 (2x CH₃, d, J=6,9Hz); 62,5 (2x CH₂, d, J=4,9Hz); 124,9 (C_qP, d, J=184,6Hz); 127,2 (CH_{arom}, d, J=3,5Hz); 127,9 (CH_{arom}); 128,0 (CH_{arom}); 128,3 (CH_{arom}); 129,0 (C₃H_{arom}, d, J=17,3Hz); 129,6 (C_qBr, d, J=4,6Hz); 132,2 (C_q C_qP, d, J=13,9Hz); 133,8 (C_q C_qBr, d, J=11,5Hz); 134,6 (C₂H_{arom}, d, J=9,2Hz). **³¹P-RMN (121MHz, CDCl₃):** δ 18,96. **MS (ESI): m/z (%):** 685/687/689 (2M+H⁺, 15/30/15), 343/345 (M+H⁺,

100/100). **IR (cm⁻¹) v_{max}**: 1165 (P-OEt); 1248 (P=O); 1617; 1560; 1503; 1477. **PF**: 56,4-56,9 °C (EtOAc). **Cromatografía**: hexanos/EtOAc 60/40 R_f = 0,23. **Rendimiento**: 74%

Síntesis de naft-1-il-fosfonato de dietilo: compuesto intermedio 2 que contiene un núcleo naftilo con X = H

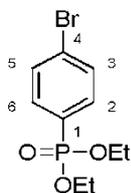
5 Se empleó un procedimiento similar al de la síntesis de (4-bromonaftil)fosfonato de dietilo. El intercambio de litio-halógeno se lleva a cabo a -40°C durante 90 minutos. Como material de partida se empleó 1 g (4,83 mmol, 1 equiv.) de 1-bromonaftaleno. Se obtuvo el compuesto con un rendimiento del 67% como un aceite amarillo. Su pureza mediante LC era del 95%.



10 **¹H-RMN (300MHz, CDCl₃)**: δ 1,31 (6H, t, J=7,2Hz, 2x CH₃); 4,01-4,28 (4H, m, 2x CH₂); 7,51-7,65 (3H, m, C₃H_{arom}, 2x CH_{arom}); 7,85-7,95 (1H, m, CH_{arom}); 8,04 (1H, d, J=8,3, CH_{arom}); 8,25 (1H, dxd, J=16,5Hz, 7,2Hz, C₂H_{arom}); 8,52 (1H, d, J=8,3Hz, CH_{arom}). **¹³C-RMN (75MHz, CDCl₃)**: δ 16,4 (2x CH₃, d, J=6,9Hz); 62,3 (2x CH₂, d, 4,6Hz); 124,6 (C_qP, d, J=182,3Hz); 124,6 (C₃H_{arom}, d, J=16,2Hz); 126,5 (CH_{arom}); 126,7 (CH_{arom}, d, J=4,6Hz); 127,5 (CH_{arom}); 128,9 (CH_{arom}); 132,8 (C_q C_qP, d, 11,5Hz); 133,8 (CH_{arom}, d, J=3,5Hz); 134,2 (CHC_qCH, d, 10,4Hz); 134,8 (C₂H_{arom}, d, J=9,2Hz). **³¹P-RMN (121MHz, CDCl₃)**: δ 19,80. **MS (ESI)**: m/z (%): 265 (M+H⁺, 100); 529 (2M+H⁺, 90). **IR (cm⁻¹) v_{max}**: 1163 (P-OEt); 1240 (P=O); 1477; 1508; 1571; 1591. **Cromatografía**: hexanos/EtOAc 50/50 R_f = 0,23. **Rendimiento**: 67%.

Síntesis de 4-bromofenilfosfonato de dietilo: compuesto intermedio 2 que contiene un núcleo de fenilo con X = Br

20 Se empleó un procedimiento similar al de la síntesis de (4-bromonaftil)fosfonato de dietilo. Como material de partida se emplearon 1,5 g (6,36 mmol, 1 equiv.) de 1,4-dibromobenceno y el producto se obtuvo con un rendimiento del 41% como un aceite amarillo. Su pureza mediante LC era del 90%.

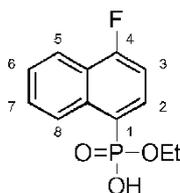


25 **¹H-RMN (300MHz, CDCl₃)**: δ 1,32 (6H, t, J=6,9Hz, 2x CH₃); 4,01-4,19 (4H, m, 2x CH₂); 7,59-7,72 (4H, m, 4x CH_{arom}). **¹³C-RMN (75MHz, CDCl₃)**: δ 16,4 (2x CH₃, d, J=6,9Hz); 62,4 (2x CH₂, d, J=5,8Hz); 127,5 (C_qP, d, J=195,0Hz); 127,6 (C_qBr, d, J=3,5Hz); 131,9 (2x CHC_qBr, d, J=15,0Hz); 133,4 (2x CHC_qP, d, J=10,4Hz). **³¹P-RMN (121MHz, CDCl₃)**: δ 18,39. **MS (ESI)**: m/z (%): 585/587/589 (2M+H⁺, 12/24/12), 293/295 (M+H⁺, 100/100). **IR (cm⁻¹) v_{max}**: 1164 (P-OEt); 1248 (P=O); 1646; 1580; 1478; 1443. **Cromatografía**: hexanos/EtOAc 60/40 R_f = 0,23. **Rendimiento**: 41%

Procedimiento general para la síntesis de los compuestos intermedios 3: ácidos arilfosfónicos

30 En un matraz de 100 ml se disuelve 1 g de fosfonato (compuesto intermedio 2) en 25 ml de dioxano. A esto, se añaden 25 ml de una solución de NaOH 1 M. La reacción se calienta a reflujo durante un período de 4 horas. La mezcla resultante se lava usando diclorometano. La fase acuosa se acidifica usando HCl a pH 1. El producto se extrae usando tres fracciones de diclorometano. Las fases orgánicas combinadas se lavan con salmuera, se secan usando MgSO₄ y se concentran. Los restos de dioxano se eliminaron mediante alto vacío.

4-Fluoronaft-1-il-fosfonato de etilo: compuesto intermedio 3 que contiene un núcleo de naftilo con X = F

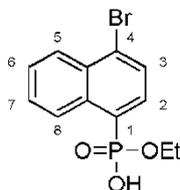


35 El compuesto se obtiene como cristales blancos con un rendimiento del 83%. **¹H-RMN (300MHz, CDCl₃)**: δ 1,24 (3H, t, J=6,9Hz, CH₃); 4,04 (2H, m, CH₂); 7,08 (1H, m, C₂H_{arom}); 7,59 (2H, m, 2x CH_{arom}); 8,08-8,16 (2H, m, C₃H_{arom}, CH_{arom}); 8,50 (1H, d, J=7,7Hz, CH_{arom}). **¹³C-RMN (75MHz, CDCl₃)**: δ 16,3 (CH₃, d, J=6,9Hz); 62,2 (CH₂, d, J=5,8Hz);

108,4 (C₂H_{arom}, t, J=19,0Hz); 121,2 (CH_{arom}, d, J=5,8Hz); 121,4 (C_qP, dxd, J=193,8Hz, 3,5Hz); 124,0 (C_qC_qP, t, J=15,0Hz); 126,8 (2x CH_{arom}); 128,5 (CH_{arom}); 134,4-134,7 (C₃H_{arom}, C_qC_qF, m); 162,0 (C_qF, dxd, J=259,0Hz, 4,6Hz). **¹⁹F-RMN (282MHz, CDCl₃):** δ -114,14. **³¹P-RMN (121MHz, CDCl₃):** δ 19,90. **MS (ESI):** m/z (%): 509 (2M+H⁺, 100); 255 (M+H⁺, 50). **IR (cm⁻¹) vmax:** 1162 (P-OEt); 1628; 1600; 1573; 1509; 2623 (POOH). **PF:** 80,9-81,3 °C (dioxano).

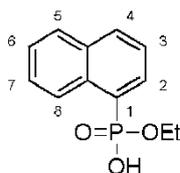
5 **Rendimiento:** 83%.

4-Bromonaft-1-il-fosfonato de etilo: compuesto intermedio 3 que contiene un núcleo de naftilo con X = Br



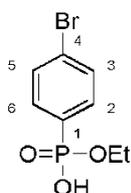
El compuesto se obtiene como cristales blancos con un rendimiento del 91%. **¹H-RMN (300MHz, CDCl₃):** δ 1,22 (3H, t, J=6,9Hz, CH₃); 4,02 (2H, m, CH₂); 7,56-7,64 (2H, m, 2x CH_{arom}); 7,70 (1H, dxd, J=7,7Hz, 2,8Hz, C₃H_{arom}); 7,93 (1H, dxd, J=16,5Hz, 7,7Hz, C₂H_{arom}); 8,30 (1H, d, J=7,7Hz, CH_{arom}); 8,49 (1H, d, J=9,4Hz, CH_{arom}); 12,42 (1H, s, OH). **¹³C-RMN (75MHz, CDCl₃):** δ 16,2 (CH₃, d, J=5,8Hz); 62,3 (CH₂, d, J=5,8Hz); 125,2 (C_qP, d, J=191,5Hz); 127,3 (CH_{arom}, d, J=4,6Hz); 127,8 (CH_{arom}); 128,0 (CH_{arom}); 128,2 (CH_{arom}); 128,8 (C₃H_{arom}, d, J=17,3Hz); 129,3 (C_qBr, d, J=4,6Hz); 132,1 (C_qC_qP, d, J=13,9Hz); 133,6 (C₂H_{arom}, d, J=10,4Hz). **³¹P-RMN (121MHz, CDCl₃):** δ 19,16. **MS (ESI):** m/z (%): 629/631/633 (2M+H⁺, 50/100/50); 315/317 (M+H⁺, 70/70). **IR (cm⁻¹) vmax:** 1162 (P-OEt); 1561; 1503; 1474; 2598 (PO-OH). **PF:** 125,8-126,5 °C (dioxano). **Rendimiento:** 91%.

Naft-1-il-fosfonato de etilo: compuesto intermedio 3 que contiene un núcleo de naftilo con X = H



El compuesto se obtiene como un aceite naranja con un rendimiento del 90%. **¹H-RMN (300MHz, CDCl₃):** δ 1,24 (3H, t, J=7,2Hz, CH₃); 4,06 (2H, m, CH₂); 7,43 (1H, txd, J=7,4Hz, 3,7Hz, C₃H_{arom}); 7,54 (2H, m, 2x CH_{arom}); 7,82-7,87 (1H, m, CH_{arom}); 7,98 (1H, d, J=8,3Hz, CH_{arom}); 8,51 (1H, d, J=7,7Hz, CH_{arom}); 8,19 (1H, dxd, J=16,5Hz, 7,4Hz, C₂H_{arom}); 10,31 (1H, s, OH). **¹³C-RMN (75MHz, CDCl₃):** δ 16,3 (CH₃, d, J=5,8Hz); 62,1 (CH₂, d, J=5,8Hz); 124,5 (C₃H_{arom}, d, J=17,3Hz); 125,3 (C_qP, d, J=190,4Hz); 126,4 (CH_{arom}); 126,9 (CH_{arom}, d, J=4,6Hz); 127,5 (CH_{arom}); 128,7 (CH_{arom}); 132,7 (C_qC_qP, d, J=11,5Hz); 133,3 (CHC_qCH, d, J=10,4Hz); 133,5 (CH_{arom}); 133,7 (C₂H_{arom}, d, J=9,2Hz). **³¹P-RMN (121MHz, CDCl₃):** δ 20,96. **MS (ESI):** m/z (%): 473 (2M+H⁺, 100), 237 (M+H⁺, 40). **IR (cm⁻¹) vmax:** 1154 (P-OEt); 1478; 1508; 1572; 1592; 2577 (PO-OH). **Rendimiento:** 90%.

4-Bromofenilfosfonato de etilo: compuesto intermedio 3 que contiene un núcleo de fenilo con X = Br



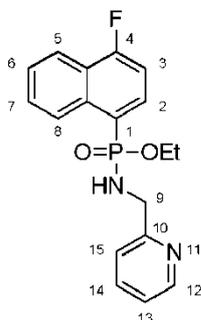
El compuesto se obtiene como un aceite claro con un rendimiento del 90%. **¹H-RMN (300MHz, CDCl₃):** δ 1,26 (3H, t, J=7,2Hz, CH₃); 4,02 (2H, ~quin, CH₂); 7,53-7,66 (4H, m, 4x CH_{arom}); 11,26 (1H, s, OH). **¹³C-RMN (75MHz, CDCl₃):** δ 16,3 (CH₃, d, J=6,9Hz); 62,3 (CH₂, d, J=5,8Hz); 127,4 (C_qBr, d, J=3,5Hz); 128,0 (C_qP, d, J=195,0Hz); 131,7 (2x CHC_qBr, d, J=16,2Hz); 133,0 (2x CHC_qP, d, J=10,4Hz). **³¹P-RMN (121MHz, CDCl₃):** δ 19,04. **MS (ESI):** m/z (%): 529/531/533 (2M+H⁺, 50/100/50), 265/267 (M+H⁺, 50/50). **IR (cm⁻¹) vmax:** 1162 (P-OEt); 1648; 1581; 1560; 1479; 2603 (PO-OH). **Rendimiento:** 90%.

Procedimiento general para la conversión de compuestos intermedios 3 a compuestos E y D

En un matraz de 25 ml se mezcla 1 equivalente de ácido fosfónico con 10 equivalentes de SOCl₂. La reacción se coloca bajo atmósfera inerte y se calienta a reflujo durante un período de 2 horas. Después de enfriar a temperatura ambiente, los elementos volátiles se evaporan y el residuo se disuelve de nuevo en 20 ml de diclorometano seco. La atmósfera inerte se restablece y se añade 1 equivalente de amina y 1 equivalente de trietilamina a 0°C. La mezcla resultante se agita a temperatura ambiente durante 16 horas, después de lo cual se inactiva con 20 ml de NaHCO₃ acuoso saturado. El compuesto se extrae con tres porciones de diclorometano y las fases orgánicas combinadas se

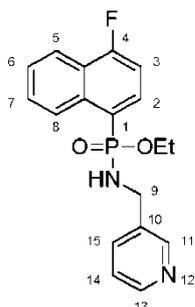
secan (MgSO_4) y se concentran.

***N*-(Piridin-2-ilmetil)-*P*-(4-fluoronaft-1-il)fosfonamidato de etilo (denominado 'E2')**



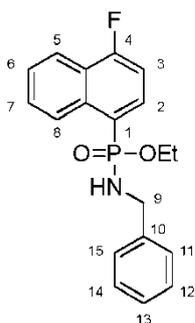
5 Se convierten 0,5 g de ácido fosfónico, dando como resultado el aislamiento de cristales de color amarillo con un rendimiento del 57% después de una cromatografía en columna. **¹H-RMN (300MHz, CDCl₃):** δ 1,34 (3H, q, J=6,8Hz, CH₃); 4,11-4,32 (4H, m, NHCH₂, OCH₂); 7,06-7,18 (3H, m, 3x CH_{arom}); 7,48-7,65 (3H, m, 3x CH_{arom}); 8,07-8,18 (2H, m, 2x CH_{arom}); 8,44 (1H, m, CH_{arom}); 8,68 (1H, d, J=7,7Hz, CH_{arom}). **¹³C-RMN (75MHz, CDCl₃):** δ 16,5 (CH₃, d, J=5,8Hz); 45,8 (NHCH₂); 61,1 (OCH₂, d, J=4,6Hz); 108,5 (C₂H_{arom}, t, J=17,9Hz); 121,2 (CH_{arom}, d, J=5,8Hz); 121,6 (CH_{arom}); 122,2 (CH_{arom}); 123,2 (C_qP, d, J=169,6Hz); 124,0 (C_qC_qP, d, J=16,2Hz); 126,6 (CH_{arom}); 126,7 (CH_{arom}); 128,3 (CH_{arom}); 134,3 (C₃H_{arom}, t, J=8,7Hz); 134,8 (C_qC_qF, dxd, J=12,7Hz, 5,8Hz); 136,5 (CH_{arom}); 149,0 (C₁₂H_{arom}); 157,7 (CH₂C_q, d, J=5,8Hz); 161,7 (C_qF, d, J=259,6Hz). **¹⁹F-RMN (282MHz, CDCl₃):** δ 115,36. **³¹P-RMN (121MHz, CDCl₃):** δ 22,12. **MS (ESI): m/z (%):** 345 (M+H⁺, 100). **IR (cm⁻¹) v_{max}:** 1162 (P-OEt); 1509; 1571; 1594; 1628; 3193 (NH). **PF:** 58,7-59,5 °C (Et₃N). **Cromatografía:** EtOAc/Et₃N 95/5 R_f= 0,21. **Rendimiento:** 57%.

***N*-(Piridin-3-ilmetil)-*P*-(4-fluoronaft-1-il)fosfonamidato de etilo (denominado 'E5')**



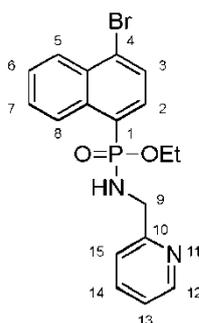
15 Se convierten 0,3 g de ácido fosfónico, dando como resultado el aislamiento de cristales de color amarillo con un rendimiento del 26% después de una cromatografía en columna. **¹H-RMN (300MHz, CDCl₃):** δ 1,33 (3H, t, J=6,9Hz, CH₃); 3,75-3,83 (1H, m, NH); 4,01-4,20 (4H, m, NHCH₂, OCH₂); 7,10-7,20 (2H, m, 2x CH_{arom}); 7,55 (1H, d, J=7,7Hz, CH_{arom}); 7,59-7,66 (2H, m, 2x CH_{arom}); 8,08-8,18 (2H, m, 2x CH_{arom}); 8,41 (2H, m, 2x CH_{arom}); 8,66 (1H, d, J=7,7Hz, CH_{arom}). **¹³C-RMN (75MHz, CDCl₃):** δ 16,5 (CH₃, d, J=6,9Hz); 42,4 (NHCH₂); 61,3 (OCH₂, d, J=4,6Hz); 108,6 (C₂H_{arom}, dxd, J=19,6Hz, 16,2Hz); 121,4 (CH_{arom}, d, J=5,8Hz); 123,4 (CH_{arom}); 123,7 (C_q, d, J=4,6Hz); 124,2 (C_q, dxd, J=15,6Hz, 13,3Hz); 126,4 (CH_{arom}); 126,8 (CH_{arom}); 128,5 (CH_{arom}); 134,7 (C₃H_{arom}, t, J=9,2Hz); 135,1 (C_q, d, J=5,8Hz); 135,4 (CH_{arom}); 148,7 (CH_{arom}); 149,0 (CH_{arom}); 161,9 (C_qF, dxd, J=259,6Hz, 3,5Hz). **¹⁹F-RMN (282MHz, CDCl₃):** δ -114,68. **³¹P-RMN (121MHz, CDCl₃):** δ 21,63. **MS (ESI): m/z (%):** 345 (M+H⁺, 100). **IR (cm⁻¹) v_{max}:** 1164 (P-OEt); 1571; 1579; 1600; 1628; 3192 (NH). **PF:** 133,6-134,3 °C (Et₃N). **Cromatografía:** EtOAc/Et₃N 95/5 R_f= 0,08. **Rendimiento:** 26%.

***N*-(Bencil)-*P*-(4-fluoronaft-1-il)fosfonamidato de etilo (denominado 'E6')**



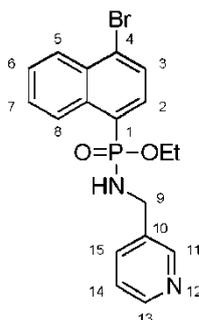
Se convierten 0,5 g de ácido fosfónico, dando como resultado el aislamiento de cristales de color amarillo con un rendimiento del 46% después de una cromatografía en columna. ¹H-RMN (300MHz, CDCl₃): δ 1,35 (3H, t, J=6,9Hz, CH₃); 3,14-3,22 (1H, m, NH); 4,02-4,23 (4H, m, NHCH₂, OCH₂); 7,14-7,28 (6H, m, 6x CH_{arom}); 8,10-8,20 (2H, m, 2x CH_{arom}); 7,63 (2H, m, 2x CH_{arom}); 8,70 (1H, d, J=7,7Hz, CH_{arom}). ¹³C-RMN (75MHz, CDCl₃): δ 16,5 (CH₃, d, J=6,9Hz); 44,9 (NHCH₂); 61,0 (OCH₂, d, J=5,8Hz); 108,5 (C₂H_{arom}, dxd, J=19,6Hz, 17,3Hz); 121,3 (CH_{arom}, d, J=3,5Hz); 123,1 (C_qP, d, J=171,9Hz); 124,2 (C_qC_qP, t, J=14,4Hz); 126,7 (2x CH_{arom}); 127,3 (CH_{arom}, d, J=4,6Hz); 127,5 (2x CH_{arom}); 128,4 (CH_{arom}); 128,5 (2x CH_{arom}, d, J=3,5Hz); 134,5 (C₃H_{arom}, d, J=8,1Hz); 134,8 (C_qC_qF, dxd, J=13,3Hz, 4,0Hz); 139,7 (CH₂C_q); 161,8 (C_qF, dxd, J=255,6Hz, 4,0Hz). ¹⁹F-RMN (282MHz, CDCl₃): δ -115,08. ³¹P-RMN (121MHz, CDCl₃): δ 22,05. MS (ESI): m/z (%): 344 (M+H⁺, 100), 687 (2M+H⁺, 90). IR (cm⁻¹) vmax: 1508; 1571; 1601; 1628; 3187 (NH). PF: 120,1-120,8 °C (Et₃N). Cromatografía: EtOAc/hexanos 60/40 + 5% de Et₃N Rf= 0,24. Rendimiento: 46%.

N-(Piridin-2-ilmetil)-P-(4-bromonaft-1-il)fosfonamidato de etilo (denominado 'E1')



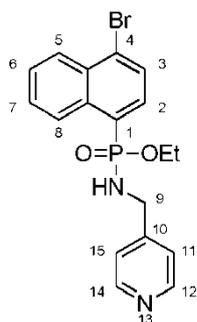
Se convierten 0,5 g de ácido fosfónico, dando como resultado el aislamiento de cristales de color amarillo con un rendimiento del 62% después de una cromatografía en columna. ¹H-RMN (300MHz, CDCl₃): δ 1,35 (3H, t, J=7,2Hz, CH₃); 4,29-4,11 (4H, m, NHCH₂, OCH₂); 7,10 (1H, d, J=7,2Hz, CH_{arom}); 7,12 (1H, d, J=7,7Hz, CH_{arom}); 7,54 (1H, txd, J=7,7Hz, 1,7Hz, CH_{arom}); 7,63 (2H, m, 2x CH_{arom}); 7,81 (1H, dxd, J=7,7Hz, 2,8Hz, C₃H_{arom}); 7,99 (1H, dxd, J=15,4Hz, 7,7Hz, C₂H_{arom}); 8,32 (1H, dxt, J=7,2Hz, 2,8Hz, CH_{arom}); 8,45 (1H, dxt, J=4,4Hz, 1,7Hz, CH_{arom}); 8,72-8,69 (1H, m, CH_{arom}). ¹³C-RMN (75MHz, CDCl₃): δ 16,5 (CH₃, d, J=5,8Hz); 45,8 (NHCH₂); 61,1 (OCH₂, d, J=5,8Hz); 121,6 (CH_{arom}); 122,2 (CH_{arom}); 127,5 (C_qP, d, J=170,8Hz); 127,3 (CH_{arom}, d, J=4,6Hz); 127,7 (CH_{arom}); 128,0 (CH_{arom}); 128,1 (CH_{arom}); 128,9 (C₃H_{arom}, d, J=15,0Hz); 132,2 (C_qC_qP, d, J=12,7Hz); 133,4 (C₂H_{arom}, d, J=8,1Hz); 134,0 (C_qC_qBr, d, J=12,7Hz); 136,5 (CH_{arom}); 148,9 (C₁₂H_{arom}); 157,6 (CH₂C_q). ³¹P-RMN (121MHz, CDCl₃): δ 22,08. MS (ESI): m/z (%): 405/407 (M+H⁺, 100/100). IR (cm⁻¹) vmax: 1159 (P-OEt); 1474; 1501; 1560; 1589; 3188 (NH). PF: 87,6-88,4 °C (Et₃N). Cromatografía: EtOAc/Et₃N 95/5 Rf= 0,15. Rendimiento: 62%.

N-(Piridin-3-ilmetil)-P-(4-bromonaft-1-il)fosfonamidato de etilo (denominado 'E3')



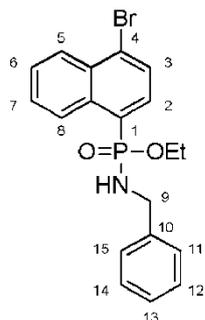
Se convierten 0,5 g de ácido fosfónico, dando como resultado el aislamiento de cristales de color marrón con un rendimiento del 57% después de la cristalización a partir de diclorometano/hexanos y cromatografía en columna del licor madre. ¹H-RMN (300MHz, CDCl₃): δ 1,32 (3H, t, J=7,2Hz, CH₃); 3,85 (1H, ~q, J=7,7Hz, NH); 4,00-4,09 (2H, m, NHCH₂); 4,13 (2H, ~quin, OCH₂); 7,12 (1H, dxd, J=7,7Hz, 5,0Hz, CH_{arom}); 7,53 (1H, d, J=7,7Hz, CH_{arom}); 7,58-7,67 (2H, m, 2x CH_{arom}); 7,82 (1H, dxd, J=7,7Hz, 2,8Hz, C₃H_{arom}); 7,97 (1H, dxd, J=15,4Hz, 7,7Hz, C₂H_{arom}); 8,33 (1H, m, CH_{arom}); 8,41 (2H, s a, 2x CH_{arom}); 8,67 (1H, d, J=7,7Hz, CH_{arom}). ¹³C-RMN (75MHz, CDCl₃): δ 16,5 (CH₃, d, J=6,9Hz); 42,4 (NHCH₂); 61,4 (OCH₂, d, J=4,6Hz); 123,4 (CH_{arom}); 125,6 (C_q); 126,9 (CH_{arom}, d, J=4,6Hz); 127,9 (2x CH_{arom}); 128,3 (CH_{arom}, d, J=6,9Hz); 129,0 (C₃H_{arom}, d, J=16,2Hz); 129,2 (C_q); 132,3 (C_q, d, J=12,7Hz); 133,8 (C₂H_{arom}, d, J=9,2 Hz); 133,9 (C_q); 135,1 (C_q, d, J=5,8Hz); 135,5 (CH_{arom}); 148,6 (CH_{arom}); 148,8 (CH_{arom}). ³¹P-RMN (121MHz, CDCl₃): δ 21,44. MS (ESI): m/z (%): 405/407 (M+H⁺, 100/100). IR (cm⁻¹) vmax: 1163 (P-OEt); 1478; 1500; 1560; 1579; 3187 (NH). PF: 105,6-106,4 °C (Et₃N). Cromatografía: EtOAc/Et₃N 95/5 Rf= 0,11. Rendimiento: 57%.

N-(Piridin-4-ilmetil)-P-(4-bromonaft-1-il)fosfonamidato de etilo (denominado 'E7')



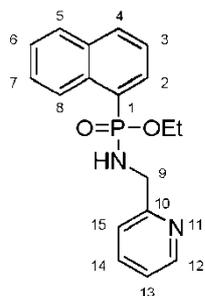
Se convierten 0,5 g de ácido fosfónico, dando como resultado el aislamiento de cristales de color blanco con un rendimiento del 8% después de una cromatografía en columna. **¹H-RMN (300MHz, CDCl₃):** δ 1,34 (3H, t, J=6,9Hz, CH₃); 3,80 (1H, ~q, J=8,3Hz, NH); 4,05-4,15 (2H, m, NHCH₂); 4,16 (2H, ~quin, J=7,3Hz, OCH₂); 7,14 (2H, d, J=5,5Hz, 2x CH_{arom}); 7,60-7,69 (2H, m, 2x CH_{arom}); 7,83 (1H, dxd, J=7,7Hz, 3,3Hz, C₃H_{arom}); 7,98 (1H, dxd, J=15,4Hz, 7,7Hz, C₂H_{arom}); 8,35 (1H, m, CH_{arom}); 8,43 (2H, s a, 2x CH_{arom}); 8,68 (1H, d, J=6,9Hz, CH_{arom}). **¹³C-RMN (75MHz, CDCl₃):** δ 16,5 (CH₃, d, J=6,9Hz); 43,8 (NHCH₂); 61,6 (OCH₂, d, J=5,8Hz); 122,2 (2x CH_{arom}); 126,7 (C_qP, d, J=169,6Hz); 126,9 (CH_{arom}, d, J=4,6Hz); 127,9 (2x CH_{arom}); 128,3 (CH_{arom}, d, J=2,3Hz); 129,0 (C₃H_{arom}, d, J=15,0Hz); 129,3 (C_qBr, d, J=3,5Hz); 132,3 (C_qC_qP, d, J=12,7Hz); 133,8 (C₂H_{arom}, d, J=9,2Hz); 133,9 (C_qC_qBr, d, J=12,7Hz); 148,7 (CH₂C_q); 149,8 (2x CH_{arom}). **³¹P-RMN (121MHz, CDCl₃):** δ 21,84. **MS (ESI): m/z (%):** 405/407 (M+H⁺, 100/100). **IR (cm⁻¹) vmax:** 1162 (P-OEt); 1463; 1501; 1561; 1600; 3161 (NH). **PF:** 131,8-132,5 °C (Et₃N). **Cromatografía:** EtOAc/Et₃N 95/5 Rf= 0,10. **Rendimiento:** 8%.

N-(Bencil)-P-(4-bromonaft-1-il)fosfonamidato de etilo (denominado 'E4')



Se convierten 0,5 g de ácido fosfónico, dando como resultado el aislamiento de cristales de color blanco con un rendimiento del 50% después de la cristalización a partir de diclorometano/hexanos y cromatografía en columna del licor madre. **¹H-RMN (300MHz, CDCl₃):** δ 1,34 (3H, t, J=6,9Hz, CH₃); 3,32 (1H, ~q, J=7,7Hz, NH); 4,00-4,10 (2H, m, NHCH₂); 4,17 (2H, quintuplete, J=7,2Hz, OCH₂); 7,17-7,25 (5H, m, 5x CH_{arom}); 7,60-7,68 (2H, m, 2x CH_{arom}); 7,82 (1H, dxd, J=7,7Hz, 2,8Hz, CH_{arom}); 7,99 (1H, dxd, J=14,9Hz, 7,7Hz, C₂H_{arom}); 8,34 (1H, m, CH_{arom}); 8,70-8,73 (1H, m, CH_{arom}). **¹³C-RMN (75MHz, CDCl₃):** δ 16,5 (CH₃, d, J=6,9Hz); 45,0 (NHCH₂); 61,3 (OCH₂, d, J=5,8Hz); 126,8 (C_qP, d, J=128,1Hz); 127,1 (CH_{arom}, d, J=4,6Hz); 127,4 (CH_{arom}); 127,5 (2x CH_{arom}); 127,8 (CH_{arom}); 128,2 (CH_{arom}, d, J=4,6Hz); 128,6 (3x CH_{arom}); 129,0 (CH_{arom}, d, J=15,0Hz); 129,0 (C_qBr, d, J=4,6Hz); 132,3 (C_qC_qP, d, J=12,7Hz); 133,8 (CH_{arom}, d, J=8,1Hz); 134,0 (C_qC_qBr, d, J=11,5Hz); 139,4 (CH₂C_q, d, J=6,9Hz). **³¹P-RMN (121MHz, CDCl₃):** δ 21,37. **MS (ESI): m/z (%):** 404/406 (M+H⁺, 100/100). **IR (cm⁻¹) vmax:** 1159 (P-OEt); 1451; 1500; 1560; 3196 (NH). **PF:** 135,8-136,7 °C (Et₃N). **Cromatografía:** EtOAc/hexanos 60/40 + 5% de Et₃N Rf= 0,21. **Rendimiento:** 50%.

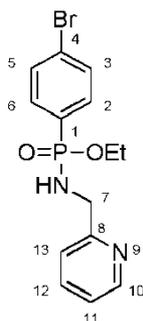
N-(Piridin-2-ilmetil)-P-(naft-1-il)fosfonamidato de etilo (denominado 'E9')



Se convirtieron 0,5 g de ácido fosfónico, dando como resultado el aislamiento de un aceite naranja con un rendimiento del 25% después de una cromatografía en columna. **¹H-RMN (300MHz, CDCl₃):** δ 1,33 (3H, t, J=7,2Hz,

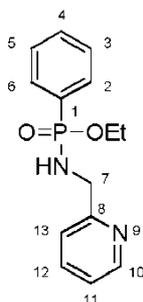
OCH₂CH₃); 4,17 (2H, qxd, J¹=J²=7,2Hz, OCH₂CH₃); 4,27 (2H, ~dxd, J¹=8,8Hz, J²=6,1Hz, CH₂NH); 4,39 (1H, s a, NH); 7,07 (1H, dxd, J¹=7,2Hz, J²=5,0Hz, C₁₃H_{arom}); 7,15 (1H, d, J=7,7Hz, C₁₅H_{arom}); 7,43-7,58 (4H, m, 4xCH_{arom}); 7,84 (1H, d, J=7,7Hz, CH_{arom}); 7,96 (1H, d, J=7,7Hz, CH_{arom}); 8,15 (1H, dxdxd, J¹=15,7Hz, J²=7,2Hz, J³=1,1Hz, CH_{arom}); 8,42 (1H, d, J=5,0Hz, C₁₂H_{arom}); 8,69 (1H, d, J=8,8Hz, CH_{arom}). **¹³C-RMN (75MHz, CDCl₃):** δ 16,5 (OCH₂CH₃, d, J=6,9Hz); 45,8 (CH₂NH); 61,0 (OCH₂CH₃, d, J=5,8Hz); 121,7 (C₁₅H_{arom}); 122,2 (C₁₃H_{arom}); 124,6 (CH_{arom}, d, J=16,2Hz); 126,3 (CH_{arom}); 126,7 (CH_{arom}, d, J=4,6Hz); 127,1 (C_qP, d, J=168,5Hz); 127,3 (CH_{arom}); 128,8 (CH_{arom}); 132,9 (C_q, d, J=10,4Hz); 133,1 (CH_{arom}, d, J=3,5Hz); 133,5 (CH_{arom}, d, J=8,1Hz); 133,7 (C_q, d, J=11,5Hz); 136,6 (CH_{arom}); 148,9 (C₁₂H_{arom}); 157,9 (C_qN, d, J=5,8Hz). **³¹P-RMN (121MHz, CDCl₃):** δ 22,95. **MS (ESI):** m/z (%): 327 (M+H⁺, 100). **HRMS (ESI):** calculado para C₁₈H₂₀N₂O₂P: 327,1257 (M+H⁺), encontrado: 327,1260 (M+H⁺). **IR (cm⁻¹) vmax:** 1199 (P=O); 1435; 1591; 3192 (NH). **Cromatografía:** EtOAc/hexanos 90/10 R_f = 0,14. **Rendimiento:** 25%.

N-(Piridin-2-ilmetil)-P-(4-bromofenil)fosfonamidato de etilo (denominado 'E8')



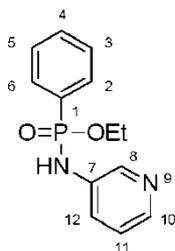
Se convirtieron 0,3 g de ácido fosfónico, dando como resultado el aislamiento de un aceite de color naranja con un rendimiento del 16% después de una cromatografía en columna. **¹H-RMN (300MHz, CDCl₃):** δ 1,23 (3H, t, J=7,2Hz, CH₃); 4,01 (2H, quinxd, J=7,2Hz, 2,2Hz, OCH₂); 4,11 (2H, dxd, J=9,4Hz, 6,4Hz, NHCH₂); 4,33 (1H, dxt, J=9,9Hz, 6,4Hz, NH); 7,08 (1H, dxd, J=7,6Hz, 4,9Hz, C₁₁H_{arom}); 7,13 (1H, d, J=7,6Hz, C₉H_{arom}); 7,46 (2H, dxd, J=8,3Hz, 3,3Hz, 2x CHC_qBr); 7,53 (1H, txd, J=7,6Hz, 1,7Hz, C₁₂H_{arom}); 7,57 (2H, dxd, J=12,7Hz, 8,3Hz, 2x CHC_qP); 8,41 (1H, d, J=4,9Hz, C₁₀H_{arom}). **¹³C-RMN (75MHz, CDCl₃):** δ 16,4 (CH₃, d, J=6,9Hz); 45,7 (NHCH₂); 60,9 (OCH₂, d, J=5,8Hz); 121,6 (CH_{arom}); 122,3 (CH_{arom}); 126,8 (C_qBr, d, J=3,5Hz); 130,1 (C_qP, d, J=175,4Hz); 131,7 (2x CHC_qBr, d, J=15,0Hz); 133,1 (2x CHC_qP, d, J=11,5Hz); 136,7 (C₁₂H_{arom}); 149,0 (C₁₀H_{arom}); 157,7 (CH₂C_q, d, J=6,9Hz). **³¹P-RMN (121MHz, CDCl₃):** δ 22,35. **MS (ESI):** m/z (%): 355/357 (M+H⁺, 100/100). **IR (cm⁻¹) vmax:** 1163 (P-OEt); 1475; 1579; 1592; 3204 (NH). **Cromatografía:** EtOAc/Et₃N 95/5 R_f= 0,16. **Rendimiento:** 16%

N-(Piridin-2-ilmetil)-P-(fenil)fosfonamidato de etilo (denominado 'D1')



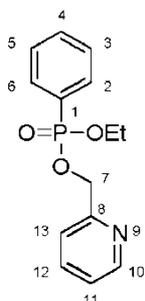
Se convirtieron 0,5 g de ácido fosfónico, dando como resultado el aislamiento de un aceite de color naranja con un rendimiento del 78%. No fue necesaria ninguna etapa de purificación. **¹H-RMN (300MHz, CDCl₃):** δ 1,33 (3H, t, J=7,2Hz, OCH₂CH₃); 3,97 (1H, ~s a, NH); 4,12 (2H, qxd, J¹=J²=7,2Hz, OCH₂); 4,23 (2H, dxd, J¹=8,5Hz, J²=6,3Hz, CH₂NH); 7,17 (1H, dxd, J¹=7,5Hz, J²=5,0Hz, C₁₁H_{arom}); 7,22 (1H, d, J=7,5Hz, C₁₃H_{arom}); 7,39-7,54 (3H, m, 3xCH_{arom}); 7,62 (1H, txd, J¹=7,5Hz, J²=1,7Hz, C₁₂H_{arom}); 7,77-7,86 (2H, m, C_{2,6}H_{arom}); 8,52 (1H, ~d, J=5,0Hz, C₁₀H_{arom}). **¹³C-RMN (75MHz, CDCl₃):** δ 16,5 (CH₃, d, J=6,9Hz); 45,8 (CH₂NH); 60,8 (OCH₂, d, J=5,8Hz); 121,6 (C₁₃H_{arom}); 122,3 (C₁₁H_{arom}); 128,4 (2xCH_{arom}, d, J=13,9Hz); 130,9 (C_qP, d, J=173,0Hz); 131,5 (2xCH_{arom}, d, J=10,4Hz); 131,8 (CH_{arom}, d, J=2,3Hz); 136,7 (C₁₂H_{arom}); 149 (C₁₀H_{arom}); 157,9 (C_qN, d, J=6,9Hz). **³¹P-RMN (121MHz, CDCl₃):** δ 23,33. **MS (ESI):** m/z (%): 277 (M+H⁺, 100). **HRMS (ESI):** calculado para C₁₄H₁₈N₂O₂P: 277,1100 (M+H⁺), encontrado: 277,1104 (M+H⁺). **IR (cm⁻¹) vmax:** 1207 (P=O); 1437; 1591; 3200 (NH). **Cromatografía:** EtOAc R_f = 0,13. **Rendimiento:** 78%.

N-(Piridin-3-il)-P-(fenil)fosfonamidato de etilo (denominado 'D3')



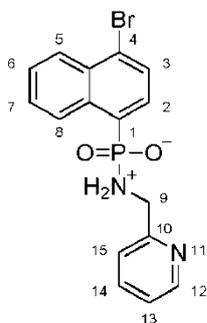
Se convirtieron 0,5 g de ácido fosfónico, dando como resultado el aislamiento de un aceite de color amarillo con un rendimiento del 75% después de una cromatografía en columna. **¹H-RMN (300MHz, CDCl₃):** δ 1,39 (3H, t, J=7,2Hz, CH₃); 4,13-4,37 (2H, m, OCH₂); 6,46 (1H, ~d, J=5,5Hz, NH); 7,08 (1H, dxd, J¹=8,3Hz, J²=4,5Hz, C₁₁H_{arom}); 7,33-7,38 (1H, m, C₁₂H_{arom}); 7,41-7,48 (2H, m, 2xCH_{arom}); 7,51-7,57 (1H, m, CH_{arom}); 7,81-7,89 (2H, m, C_{2,6}H_{arom}); 8,15 (1H, dxd, J¹=4,5Hz, J²=1,4Hz, C₁₀H_{arom}); 8,30 (1H, d, J=2,8Hz, C₈H_{arom}). **¹³C-RMN (75MHz, CDCl₃):** δ 16,3 (CH₃, d, J=6,9Hz); 61,2 (OCH₂, d, J=5,8Hz); 123,7 (C₁₁H_{arom}); 124,4 (C₁₂H_{arom}, d, J=5,8Hz); 128,6 (2xCH_{arom}, d, J=15,0Hz); 129,8 (C_qP, d, J=176,5Hz); 131,3 (C_{2,6}H_{arom}, d, J=10,4Hz); 132,4 (CH_{arom}, d, J=2,3Hz); 137,9 (C_qNH); 139,7 (C₈H_{arom}, d, J=8,1Hz); 142,1 (C₁₀H_{arom}). **³¹P-RMN (121MHz, CDCl₃):** δ 17,62. **MS (ESI): m/z (%):** 263 (M+H⁺, 100). **HRMS (ESI):** calculado para C₁₃H₁₆N₂O₂P: 263,0944 (M+H⁺), encontrado: 263,0951 (M+H⁺). **IR (cm⁻¹) vmax:** 1212 (P=O); 1472; 1586; 3396 (NH). **Cromatografía:** EtOAc/hexanos 90/10 R_f = 0,14. **Rendimiento:** 75%.

(Piridin-2-ilmetil)fenilfosfonato de etilo (denominado 'D2')



Se convirtieron 0,5 g de ácido fosfónico, dando como resultado el aislamiento de un aceite marrón con un rendimiento del 56% después de una cromatografía en columna. **¹H-RMN (300MHz, CDCl₃):** δ 1,34 (3H, t, J=7,2Hz, CH₃); 4,10-4,27 (2H, m, OCH₂); 5,15 (1H, dxd, J¹=13,2Hz, J²=7,7Hz, OCH₂H_aH_bC_q); 5,21 (1H, dxd, J¹=13,2Hz, J²=7,7Hz, OCH₂H_aH_bC_q); 7,21 (1H, ~dxd, J¹=7,2Hz, J²=4,8Hz, C₁₁H_{arom}); 7,44-7,50 (3H, m, 2xCH_{arom}, C₁₃H_{arom}); 7,54-7,61 (1H, m, CH_{arom}); 7,70 (1H, txd, J¹=7,2Hz, J²=1,5Hz, C₁₂H_{arom}); 7,82-7,90 (2H, m, C_{2,6}H_{arom}); 8,55 (1H, ~dxd, J¹=4,8Hz, J²=1,5Hz, C₁₀H_{arom}). **¹³C-RMN (75MHz, CDCl₃):** δ 16,2 (CH₃, d, J=6,9Hz); 62,4 (OCH₂CH₃, d, J=5,8Hz); 67,7 (OCH₂C_q, d, J=5,8Hz); 121,3 (C₁₃H_{arom}); 122,8 (C₁₁H_{arom}); 127,6 (C_qP, d, J=189,2Hz); 128,5 (2xCH_{arom}, d, J=15,0Hz); 131,7 (C_{2,6}H_{arom}, d, J=9,2Hz); 132,6 (CH_{arom}, d, J=2,3Hz); 136,8 (C₁₂H_{arom}); 149,0 (C₁₀H_{arom}); 156,1 (C_qN, d, J=8,1Hz). **³¹P-RMN (121MHz, CDCl₃):** δ 20,00. **MS (ESI): m/z (%):** 278 (M+H⁺, 100). **HRMS (ESI):** calculado para C₁₄H₁₇NO₃P: 278,0941 (M+H⁺), encontrado: 278,0946 (M+H⁺). **IR (cm⁻¹) vmax:** 1248 (P=O); 1438; 1592; 3453 (NH). **Cromatografía:** EtOAc/hexanos 60/40 R_f = 0,23. **Rendimiento:** 56%.

Síntesis de N-(piridin-2-ilmetil)-P-(4-bromonaft-1-il)fosfonamidato de hidrógeno (denominado 'E10')



En un matraz de 50 ml, se disolvieron 0,5 g de N-(piridin-2-ilmetil)-P-(4-bromonaft-1-il)fosfonamidato de etilo en 20 ml de una mezcla 1/1 de MeOH y LiOH 1,5 M acuoso. La mezcla se calentó a reflujo durante 45 minutos y se enfrió a temperatura ambiente. Después de lavar con cloroformo (3x15 ml), el pH se ajustó a 1, utilizando HCl concentrado (12 M). La extracción empleando cloroformo proporcionaba **E10** zwitteriónico, con un rendimiento de 42% y 70% de pureza mediante HPLC. Los intentos de aumentar la pureza mediante cristalización o cromatografía de intercambio iónico fracasaron.

Material vegetal

Las plántulas de *Arabidopsis thaliana* Columbia (Col0) se cultivaron en placas de Petri cuadradas de 12x12 cm (Gosselin, BP124-04) sobre 50 ml de medio basal que contenía 1,5 g/L de sales basales MS (Duchefa, M0221.0050), 5,0 g/L de D-sacarosa, 0,5 g/L de MES (Duchefa, M1503.0100) y 8,0 g/L de agar (MC29, Amersham), pH 5,7. Las semillas se esterilizaron en superficie durante 4 h en gas de cloro (100 ml de lejía comercial y 3 ml de ácido hipocloroso en una campana de vidrio), se extendieron sobre las placas de Petri y se estratificaron durante 4 d en la oscuridad a 5°C, seguido de 8 horas con luz (70 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) a 25°C para estimular la germinación. Acto seguido, las placas se cubrieron con papel de aluminio durante 3 días para inducir la etiolación y el crecimiento escotomorfo-génico con hipocótilos de 60 a 100 mm de longitud. Las plántulas etioladas se transfirieron a la sala de crecimiento (25°C, 70 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, 16 h de luz/8 h de oscuridad) y se sometieron a diferentes tratamientos durante 10 días.

2. Reguladores del crecimiento vegetal y análogos de pirabactina

El ácido abscísico y la pirabactina fueron adquiridos en Sigma Aldrich (B190923.27 y B3438) y se disolvieron en DMSO para preparar una reserva 10 mM. Los análogos con fosfonamida autosintetizados se disolvieron de modo similar en DMSO. Para los ensayos de germinación, las plántulas se incubaron sobre medio que contenía reguladores del crecimiento. Para los ensayos de crecimiento de raíces y brotes, las plántulas crecieron previamente sobre medio K1 y se transfirieron a medio que contenía reguladores del crecimiento. Los ensayos de apertura de los estomas se realizaron mediante la adición de reguladores del crecimiento directamente a las células en observación.

3. Análisis fenotípico de la raíz

Los fenotipos de la raíz se puntuaron usando un microscopio binocular (Olympus, SZX9).

Se tomaron fotos generales con una cámara Nikon D5000 y las imágenes se analizaron con el programa informático ImageJ[®]. La longitud de la raíz primaria se midió en las plántulas individuales a través de la herramienta Segmented Line, en la que se realiza un seguimiento de un perfil estimado de la raíz y se calcula la longitud de este perfil.

4. Análisis estadístico

Los datos de la raíz contabilizados y medidos se representan en gráficos que muestran los valores y las barras de error estadístico. Otro análisis estadístico para determinar la significación entre los diferentes tratamientos, se realiza en S-Plus (versión 8, TIBCO Software Inc.). Para comprobar la normalidad de los datos y la distribución de las varianzas (homocedasticidad), respectivamente, se aplicó una prueba de Kolmogorov-Smirnov y de Levene Modificada. En los conjuntos de datos que cumplen la normalidad y la homocedasticidad, las pruebas de ANOVA prosiguieron para comparar los tratamientos. El método de Bonferroni se utilizó para comparar los promedios múltiples. Con más frecuencia, una prueba de Rangos de Wilcoxon no paramétricos compara los promedios de dos en dos. Los gráficos de barras que reciben el mismo código de letra no son significativamente diferentes. Las letras diferentes indican promedios significativamente diferentes entre los tratamientos.

Resultados

Además del efecto de los análogos de pirabactina con fosfonamida mencionados a continuación sobre el desarrollo de la raíz, el efecto de los análogos en los procesos biológicos típicos relacionados con ABA, tales como la germinación de semillas y el cierre de los estomas, se describe adicionalmente.

Efecto de la pirabactina y los análogos con fosfonamida sobre el crecimiento de la raíz primaria

Los experimentos previos han mostrado que pirabactina y ABA 10 μM causan reducciones significativas en la longitud de la raíz primaria. Por lo tanto, inicialmente se evaluó el efecto de los análogos de pirabactina a esta concentración.

Como se esperaba, ABA y pirabactina 10 μM reducían la longitud de la raíz primaria 5 y 2,5 veces, respectivamente (**Fig. 1**). Los análogos de pirabactina E4 y E7 inhibían fuertemente el crecimiento de la raíz primaria, mientras que E1, E5, E9 y E10 eran inhibidores leves de la elongación de la raíz primaria. El análogo E6 era el único compuesto que reducía el crecimiento de las raíces, comparable a la pirabactina. Los otros análogos de pirabactina E2, E3, D1, D2 y D3 no mostraban un efecto significativo. Sorprendentemente, el compuesto E8 mostraba un ligero aumento, pero significativo, de la longitud de la raíz primaria (**Fig. 1**).

Pirabactina y análogos con fosfonamida implicados en el desarrollo de las raíces laterales

La ramificación de la raíz primaria es un determinante importante de la estructura de la raíz y está controlada por la señalización de ABA, que tiene una función reguladora durante el inicio y la aparición de las raíces laterales y traduce las señales ambientales en respuestas organogénicas (De Smet et al., 2003; De Smet et al., 2006; Guo et al., 2009; Guo et al., 2012; Signora et al., 2001). Por lo tanto, se analizó el número de primordios de raíces laterales (LRP) y las raíces laterales (LR) después de un tratamiento hormonal. La **Fig. 2 A** muestra el número total de primordios y raíces emergentes que aparecen en la raíz primaria de plántulas etioladas de *Arabidopsis thaliana* con una edad de 13d. ABA reducía fuertemente el número de LR + LRP, mientras que la pirabactina solamente afectaba

moderadamente al inicio de las raíces laterales (**Fig. 2 B**). Los análogos E1, E4, E6 y E7 eran inhibidores fuertes, mientras que E2, E3, E5, E8, E9, E10 y D1 eran inhibidores de leves a débiles de la formación de raíces laterales. El análogo D2 no tenía un efecto significativo y D3 mejoraba la inducción de raíces laterales (**Fig. 2 A**). Por otra parte, al considerar los valores de densidad, el tratamiento con ABA reducía el número de raíces por cm de raíz primaria. La pirabactina, por el contrario, aumentaba significativamente la densidad LR + LRP (**Fig. 2 B**). El tratamiento con los análogos E1, E4 y E6 se tradujo en una reducción fuerte de la densidad (incluso más fuerte que con ABA). El análogo E7, afectaba tanto a la cantidad de raíces laterales como a la longitud de la raíz primaria, dando como resultado valores de densidad normales de aproximadamente 5 LR + LRP por cm de raíz primaria. E2, E3, E8, E9, E10 y D1 reducían la cantidad de LR + LRP de manera similar a ABA. Aunque el análogo D2 no afectaba significativamente a la cantidad de LR, el tratamiento con D3 aumentaba la densidad de LR (**Fig. 2 B**).

Los efectos opuestos de ABA y pirabactina sobre la densidad de raíces laterales, así como los efectos variables de los análogos de pirabactina ofrecen apoyo a la hipótesis de que la regulación de la formación de raíces laterales sigue una ruta compleja, incluyendo una señalización de ABA tanto inhibitoria como estimuladora.

El efecto de los análogos con fosfonamida sobre la organogénesis de raíces adventicias

El sistema de raíces también puede consistir en raíces producidas por brotes o adventicias (AR) que aparecen en los hipocotilos de plántulas de *Arabidopsis* etioladas. El hecho de que las ARs estén influidas por el estado hídrico, indica un posible papel de ABA o de moléculas relacionadas durante la formación de las ARs. Para determinar el efecto de ABA y de compuestos relacionados, puntuamos la formación de ARs en plántulas tratadas. Dado que la longitud del hipocotilo de las plántulas no se ve afectada por los análogos, no se requería ninguna corrección de la densidad.

La organogénesis de raíces adventicias no estaba afectada por ABA, pero la pirabactina reducía la formación de estas raíces (**Fig. 3**). Los diferentes análogos evaluados mostraron una amplia gama de efectos, incluyendo la estimulación y la inhibición de la formación de raíces adventicias. Tres análogos, E4, E6 y E7 proporcionaban una reducción de la formación de raíces adventicias, respectivamente más fuerte o similar a la de pirabactina. Estas tres moléculas se sometieron a ensayo adicionalmente en un intervalo de concentración más amplio para describir a fondo su efecto sobre la formación de ARs. Los análogos más débiles E8 y E2 añadidos a 10 μM , respectivamente, no tenían ningún efecto o no estimulaban la formación de ARs (**Fig. 3**). El análogo E4 tenía un fuerte efecto inhibitorio sobre el desarrollo de la planta lo que sugería que mostraba una toxicidad celular a la concentración utilizada.

El efecto de los análogos con fosfonamida sobre la germinación de semillas

El ensayo de germinación de las semillas de *Arabidopsis thaliana*

El ensayo de germinación en semillas de *Arabidopsis thaliana* consiste en semillas maduras incubadas sobre un medio que contiene hormonas durante la estratificación (4d a 5°C) y a continuación crecimiento en la sala de crecimiento. La germinación de las semillas se evalúa después de 10d en la sala de crecimiento (25°C, 70 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, 16 h de luz/8 h oscuridad). La germinación se puntuó como un porcentaje que representaba la relación entre el número de semillas germinadas y el total de semillas diseminadas inicialmente sobre la placa. ABA y pirabactina se escrutaron a diferentes concentraciones. Ambos inhibían la germinación de semillas y la inhibición era gradual y dependiente de la dosis. A 50 μM , ABA inhibía la germinación de semillas de modo más fuerte que la pirabactina. Esto está de acuerdo con los resultados publicados anteriormente (Puli y Raghavendra, 2012). Sin embargo, la respuesta a ambas moléculas es muy similar, lo que confirma la acción de tipo ABA de la pirabactina durante la germinación de las semillas (**Fig. 4**).

Se analizó el efecto de los análogos de pirabactina con fosfonamida de la presente invención a 10 μM y se comparó con el de ABA y pirabactina. Los análogos de pirabactina con fosfonamida eran inhibidores malos de la germinación, ya que solo 1 compuesto, E5, mostraba una reducción significativa del porcentaje de semillas en germinación (**Fig. 5**).

El efecto de los análogos con fosfonamida sobre el desarrollo de las plántulas

Desarrollo de las plántulas de *Arabidopsis thaliana*

Se analizó también el desarrollo de los brotes en presencia de ABA, pirabactina y análogos con fosfonamida de la presente invención. En presencia de ABA, tanto la iniciación de nuevas hojas como su tamaño se reducía en comparación con el control, plántulas no tratadas (**Fig. 6 A, B**). La pirabactina por otro lado no afectaba al desarrollo de los brotes tan fuertemente como ABA, pero el tamaño de las hojas también se redujo significativamente cuando se aplicó pirabactina a una concentración 10 μM (**Fig. 6 C**).

El efecto de los diferentes análogos de pirabactina sobre el crecimiento de los brotes también se registró. Especialmente los compuestos E4 y E7 producían una fuerte inhibición del desarrollo de los brotes de la plántula. En las plántulas tratadas con E4, las hojas se volvieron amarillas e incluso formaron hojas albinas, lo que sugiere una reducción de la clorofila. Además, había una reducción general del desarrollo. E6 daba como resultado una inhibición del tamaño de las hojas comparable a la de pirabactina. El compuesto E2 estimulaba el desarrollo de las hojas en

comparación con el control. Los compuestos E4 y E6 no inhibían la germinación, pero podían ser fitotóxicos para las plántulas de *Arabidopsis*, porque cuando se aplicaban en dosis altas, las hojas se volvían blancas y el desarrollo posterior se retrasaba. Los otros compuestos no tenían ningún efecto significativo sobre el desarrollo de los brotes de las plántulas (**Fig. 6 D**).

5 El efecto de los análogos con fosfonamida sobre el cierre de los estomas

Ensayo de deshidratación de las hojas

El tratamiento previo con ABA daba como resultado un cierre de los estomas y por lo tanto protegía las hojas de un exceso de evaporación de agua a través de los poros de los estomas durante la sequía. Esta característica anti-transpirante de ABA es importante porque la sequía y las limitaciones hídricas son los factores más importantes que limitan la productividad de un cultivo, dando como resultado pérdidas de rendimiento de hasta un 50% a nivel mundial (Jones & Corlett, 1992; Skirycz y Inzé, 2010). En hojas sin tratar, el potencial hídrico disminuye rápidamente cuando las hojas están expuestas a una sequía. Un acondicionamiento previo de estas hojas con ABA impide el déficit hídrico mediante el cierre de los estomas y la fuga a través de membranas (Clifford et al., 1998; Islam et al., 2003). La pérdida de agua se puede vigilar mediante una medición del peso de la hoja. Las muestras tratadas previamente con ABA mostraban significativamente menos pérdida de peso debido a la reducción de la evaporación de agua. El contenido relativo en agua se puede determinar mediante el peso fresco, el peso turgente (= masa después de una rehidratación) y el peso seco (Clifford et al., 1998). El ensayo de deshidratación fue diseñado siguiendo este principio. Las hojas de *Nicotiana benthamiana* se retiraron de plantas de 8 semanas de edad *ex vitro*. Las hojas desprendidas se mantuvieron turgentes mediante una inmersión de los peciolo en agua durante 1 hora. De esta manera, se producía una alimentación óptima dentro del xilema. A continuación, las hojas se retiraron de las soluciones y los extremos del peciolo se sellaron con silicona y se cubrieron con Parafilm para evitar una pérdida de agua a través del sistema de nervadura. Las hojas totalmente turgentes se expusieron posteriormente a un flujo de aire en una cabina de flujo laminar. La pérdida de agua se controló durante 6 horas mediante una medición periódica del peso de las hojas húmedas.

Usando este ensayo, se analizó la protección frente a la pérdida de agua mediante tratamientos previos con ABA 10 y 100 μM . El tratamiento con ABA daba como resultado una pérdida de peso menos significativa, lo que demostraba su capacidad para reducir la pérdida de agua (**Tabla 1**). Los tratamientos previos con análogos de pirabactina eran a una concentración 10 μM y se incubaron de cinco a diez hojas replicadas en soluciones acuáticas que contenían los compuestos respectivos. Su pérdida de peso promedio está representada en la **Fig. 7**. De manera similar a ABA, los compuestos E1, E9 y E10 daban como resultado una reducción de la transpiración. Los otros compuestos evaluados no eran significativamente diferentes de las hojas de control (**Fig. 7**).

Tabla 1: % de pérdida de peso de las hojas tratadas previamente con ABA. Los valores dados indican promedios de 5-10 hojas y el error estándar indica la significación entre los diferentes tratamientos.

Tratamiento	% de pérdida de peso (promedio)	Error estándar
Control	29,51%	2,28
ABA 10 μM	18,54%	3,94
ABA 100 μM	16,99%	1,87

35 Ensayo de cierre de los estomas

Un soporte adicional para la acción de tipo ABA de los análogos de pirabactina continúa con las mediciones de la apertura de los estomas. En los estomas, la acumulación de ABA da como resultados el cierre de los poros de las hojas. Las plantas pueden entonces gestionar de manera más eficiente los recursos hídricos disponibles. Como una medida de la respuesta a la sequía y la actividad de tipo ABA, el cierre de los estomas se estudió en el tabaco (*Nicotiana tabacum*) y *Arabidopsis thaliana* (Jones & Mansfield, 1970; Roelfsema y Prins, 1995; Thomas, 1970). Para este ensayo se utilizaron tiras epidérmicas de tabaco (tomadas en el lado abaxial de las hojas) fijadas sobre un portaobjetos de microscopio debajo un cubreobjetos. Las tiras epidérmicas se pusieron en contacto con un tampón (MES 10 mM, KCl 50 mM, CaCl₂ 10 μM y pH 6,5) y los portaobjetos se colocaron a la luz durante 2 h para asegurar una apertura óptima de los estomas. La apertura de los estomas se midió usando un microscopio de mesa automatizado (Olympus, programa informático CellM™). Se obtuvieron imágenes de los estomas en posiciones fijas cada 5 min durante 1 hora. Al comienzo del experimento, las tiras epidérmicas fueron tratadas con una solución que contenía compuestos y una gota de azul bromo-fenol para supervisar el proceso de perfusión (el intercambio de soluciones fue provocado mediante la absorción de la solución en un extremo con papel de filtro).

En ausencia de compuestos, se observó una reducción de la apertura de los estomas de aproximadamente el 10% después de 15 minutos, sin un cambio adicional hasta los 30 minutos (**Fig. 8**). Por lo tanto, un cierre de los estomas del 10% se consideró como no significativo.

ABA era muy eficaz en la reducción de la apertura de los estomas al cabo de 5 min, alcanzando una apertura relativa del 40% (**Fig. 9 B**). Del mismo modo en el guisante (Puli y Raghavendra, 2012), la pirabactina inducía un cierre de los estomas, de forma rápida, pero en un grado mucho menor que ABA (**Fig. 9 B**).

5 En experimentos posteriores, se evaluó la acción de los análogos de pirabactina de la presente invención. Se encontraron compuestos activos e inactivos (**Fig. 10**). El compuesto E1 no causaba el cierre de los estomas e incluso inducía la apertura cuando se incluía el cierre intrínseco del 10% en los estomas sin tratar (**véase más arriba, Fig. 10 A**). E2, por otro lado, inducía un cierre de los estomas del 50% a partir de la apertura inicial, pero la velocidad a la que los estomas se cierran es menor que con ABA: en presencia de ABA 10 μM , los estomas se cerraban al cabo de 10 minutos (50% de cierre), mientras que con E2, esto solo se conseguía después de 30 minutos (**Fig. 10 B**). También el análogo E6 inducía fuertemente el cierre de los estomas (**Fig. 10 F**). Otros compuestos también causaban un cierre intermedio de los estomas: E3, E4, E5, E8, E10 y D3 (**Fig. 10 C, D, E y H**). E7, E9, D1 y D2 por el contrario, no afectaban al tamaño de la apertura estomática (**Fig. 10 G**).

15 A diferencia de ABA y los agonistas de ABA, el compuesto E1 inducía la apertura de los estomas, lo que sugiere que esta molécula no induce el proceso típico de señalización de ABA en los estomas. Este efecto es intrigante, ya que no se había observado con otros agonistas de ABA referidos. Se sugiere que el modo de acción de E1 es diferente del de otros análogos de pirabactina y que puede influir en la señalización de ABA mediante la inactivación de la percepción de ABA o generando una regulación opuesta aguas abajo mediante una interacción alternativa con los receptores PYR/PYL. En general, los análogos de pirabactina ejercen respuestas de tipo ABA, lo que confirma que probablemente actúan como agonistas de ABA. Los resultados muestran además que la apertura de los estomas se puede regular por medio de una exposición a moléculas sintéticas ya sea para mejorar la evaporación del agua o para reducirla. Por lo tanto, estas moléculas son muy útiles en estudios moleculares para determinar los complejos de señalización y las rutas implicadas en la regulación de los estomas. Además, como los compuestos muestran un cierto nivel de especificidad, son útiles en la mejora de las aplicaciones agrícolas.

Aplicación agrícola de los análogos de pirabactina de la presente invención

25 Para mantener su rendimiento en condiciones subóptimas, las plantas, tales como organismos sésiles, dependen de señales endógenas para cambiar a las rutas protectoras (Raghavendra et al., 2010). Por lo tanto, las manipulaciones de estas rutas son una estrategia para asegurar la producción de las plantas y ABA es la molécula diana que se va a emplear. Un rociado tóxico de ABA da como resultado el cierre de los estomas y la protección contra el estrés por sequía, pero también afecta al crecimiento de la raíz primaria y al desarrollo de las hojas. Los análogos de pirabactina de la presente invención resuelven estas limitaciones.

35 **Tabla 2: Resumen de las respuestas biológicas de los distintos análogos de pirabactina. Todas las moléculas se aplican a una concentración 10 μM y se comparan con semillas, plántulas o tiras epidérmicas de control no tratadas. Los datos individuales están representados más arriba. 0 = no es significativamente diferente del control, +++ = acción muy fuerte (inhibición de las semillas, raíces y brotes o inducción del cierre de los estomas), ++ = acción fuerte, + = acción intermedia y - = acción opuesta (por ejemplo, estimulante de semillas, raíces y brotes o apertura de los estomas).**

Análogo	Germinación de la semilla	PR	LR	AR	Brote	Estomas
ABA	+++	+++	+++	0	+++	+++
Pirabactina	++	++	++	+++	++	+
E1	0	+	++	-	0	-
E2	0	0	+	-	-	+++
E3	0	0	+	-	0	++
E4	+	+++	+++	+++	+++	++
E5	+++	+	+	0	0	+
E6	0	++	+++	+++	++	+++
E7	0	+++	+++	+++	+++	0
E8	0	0	+-	0	0	++
E9	0	0	+	-	0	0
E10	0	+	+	-	0	+
D1	+	0	+-	0	0	+
D2	0	0	0	0	0	0

Análogo	Germinación de la semilla	PR	LR	AR	Brote	Estomas
D3	0	0	0	0	0	0

En los climas con humedad a finales de verano, la germinación de las semillas antes de la cosecha provoca pérdidas significativas (Gubler et al., 2005). El rociado de ABA, como inhibidor de la germinación de las semillas sobre los cultivos que son vulnerables a este problema, podría resolver los problemas de germinación. Sin embargo, ABA también induce otros efectos en las plantas. Dado que esto no se desea, la aplicación de moléculas más específicas es una solución para este último problema. Entre los análogos escrutados, una molécula E5 inhibe específicamente la germinación de las semillas, pero tiene un efecto limitado sobre las otras respuestas biológicas escrutadas (**Tabla 2**). Otro análogo interesante es E2, que afecta al cierre de los estomas y tiene efectos positivos sobre el desarrollo de los brotes y la formación de raíces adventicias. También E8 es un buen compuesto para rociar sobre los cultivos para mejorar la tolerancia de las plantas a la sequía sin afectar al crecimiento de las raíces. Al contrario de ABA, esto es positivo para el desarrollo de una planta en condiciones de estrés prolongado, debido a que el crecimiento de las raíces se mantendría lo que asegura el acceso a fuentes de agua más profundas. Por tanto, se llegó a la conclusión de que estos compuestos ofrecen nuevas posibilidades para aplicaciones de campo en la agricultura.

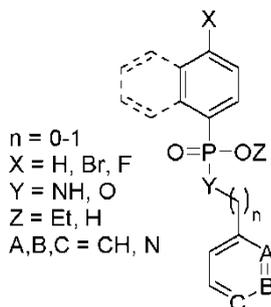
Referencias

- 15 Antoni R, Rodriguez L, Gonzalez-Guzman M, Pizzio GA, Rodriguez PL (2011) News on ABA transport, protein degradation, and ABFs/WRKYs in ABA signaling. *Curr Opin Plant Biol* **14**: 547-553
- Ashokan KV (2010) Docking studies on abscisic acid receptor pyrabactin receptor 1 (pyr1) and pyrabactin like receptor1 (pyl1). *International Journal of Environmental Sciences* **1**: 314-322
- 20 Audus L.J. y Quasterl J.H. (1948). The Growth-inhibitory Activity of the Sulphonamides and Plant Growth-substances, and the Effects thereon of p-Aminobenzoic acid. *Ann Bot* **12**: 27-34
- Clifford SC, Arndt SK, Corlett JE, Joshi S, Sankhla N, Popp M, Jones HG (1998) The role of solute accumulation, osmotic adjustment and changes in cell wall elasticity in drought tolerance in *Ziziphus mauritiana* (Lamk.). *J Exp Bot* **49**: 967-977
- 25 Crowdy S.H. y Jones D. R. (1956). Partition of Sulphonamides in Plant Roots: A Factor in their Translocation. *Nature* **178**, 1165 - 1167
- Cutler SR, Park SY, Defries A. (2010) Control of plant stress tolerance, water use efficiency and gene expression using novel ABA receptor proteins and synthetic agonists Regents of the University of California, USA.
- Daszkowska-Golec A, Szarejko I. (2013). Open or close the gate - stomata action under the control of phytohormones in drought stress conditions. *Front Plant Sci.* **4**:138
- 30 Finkelstein RR, Gampala SSL, Rock CD (2002) Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell* **14**: S15-S45
- Garcarrubio A, Legaria JP, Covarrubias AA (1997) Abscisic acid inhibits germination of mature *Arabidopsis* seeds by limiting the availability of energy and nutrients. *Planta* **203**: 182-187
- 35 Gubler F, Millar AA, Jacobsen JV (2005) Dormancy release, ABA and pre-harvest sprouting. *Curr Opin Plant Biol* **8**: 183-187
- Hao Q, Yin P, Yan C, Yuan X, Li W, Zhang Z, Liu L, Wang J, Yan N. (2010). Functional mechanism of the abscisic acid agonist pyrabactin. *J Biol Chem.* **285**:28946-52.
- Hubbard KE, Nishimura N, Hitomi K, Getzoff ED, Schroeder JI (2010) Early abscisic acid signal transduction mechanisms: newly discovered components and newly emerging questions. *Genes Dev* **24**: 1695-1708
- 40 Islam MA, Blake TJ, Kocacinar F, Lada R (2003) Ambiol, spermine, and aminoethoxyvinylglycine prevent water stress and protect membranes in *Pinus strobus* L under drought. *Journal of Experimental Botany* **17**: 278-284
- Jones HG, Corlett JE (1992) Current topics in drought physiology. *Journal of Agricultural Science* **119**: 291-296
- Jones RJ, Mansfiel.T (1970) Suppression of stomatal opening in leaves treated with abscisic acid. *J Exp Bot* **21**: 714-&
- 45 Joshi-Saha A, Valon C, Leung J. (2011) Abscisic acid signal off the STARting block. *Mol Plant.* 2011 Jul; **4**(4):562-80
- Kitahata N, Asami T. (2011) Chemical biology of abscisic acid. *J Plant Res.* **124**:549-57

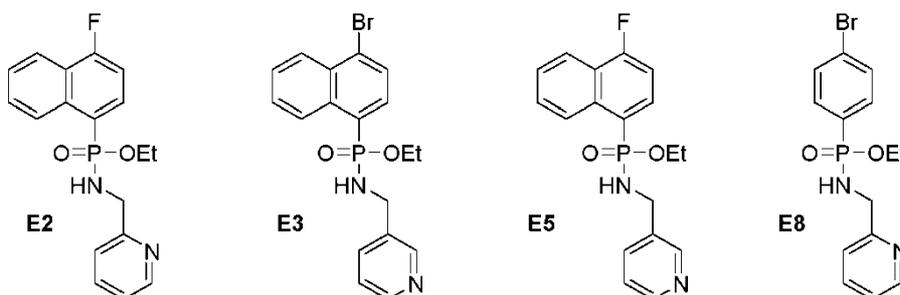
- Linkies A, Leubner-Metzger G (2012) Beyond gibberellins and abscisic acid: how ethylene and jasmonates control seed germination. *Plant Cell Reports* **31**: 253-270
- 5 Melcher K, Ng LM, Zhou XE, Soon FF, Xu Y, Suino-Powell KM, Park SY, Weiner JJ, Fujii H, Chinnusamy V, Kovach A, Li J, Wang YH, Li JY, Peterson FC, Jensen DR, Yong EL, Volkman BF, Cutler SR, Zhu JK, Xu HE (2009) A gate-latch-lock mechanism for hormone signalling by abscisic acid receptors. *Nature* **462**: 602-U672
- Melcher K, Zhou XE, Xu HE. (2010a) Thirsty plants and beyond: structural mechanisms of abscisic acid perception and signaling. *Curr Opin Struct Biol.* **20**:722-9.
- 10 Melcher K, Xu Y, Ng LM, Zhou XE, Soon FF, Chinnusamy V, Suino-Powell KM, Kovach A, Tham FS, Cutler SR, Li J, Yong EL, Zhu JK, Xu HE. (2010). Identification and mechanism of ABA receptor antagonism. *Nat Struct Mol Biol.* **17**:1102-8.
- Mosquna A, Peterson FC, Park SY, Lozano-Juste J, Volkman BF, Cutler SR. (2011). Potent and selective activation of abscisic acid receptors in vivo by mutational stabilization of their agonist-bound conformation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **108**:20838-43.
- 15 Nambara E, Okamoto M, Tatematsu K, Yano R, Seo M, Kamiya Y (2010) Abscisic acid and the control of seed dormancy and germination. *Seed Sci Res* **20**: 55-67
- Park SY, Fung P, Nishimura N, Jensen DR, Fujii H, Zhao Y, Lumba S, Santiago J, Rodrigues A, Chow TF, Alfred SE, Bonetta D, Finkelstein R, Provart NJ, Desveaux D, Rodriguez PL, McCourt P, Zhu JK, Schroeder JI, Volkman BF, Cutler SR (2009) Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science* **22**: 1068-1071
- 20 Peterson FC, Burgie ES, Park SY, Jensen DR, Weiner JJ, Bingman CA, Chang CA, Cutler SR, Phillips GNJ, Volkman BF (2010) Structural basis for selective activation of ABA receptors. *Nat Struct Mol Biol* **17**: 1109-1113
- Puli MR, Raghavendra AS (2012) Pyrabactin, an ABA agonist, induced stomatal closure and changes in signalling components of guard cells in abaxial epidermis of *Pisum sativum*. *J Exp Bot* **63**: 1349-1356
- 25 Roelfsema MRG, Prins HBA (1995) Effect of abscisic acid on stomatal opening in isolated epidermal strips of *abi* mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* **95**: 373-378
- Sreenivasulu, N., Harshavardhan, V.T., Govind, G., Seiler, C., Kohli, A. (2012), 'Contrapuntal role of ABA: Does it mediate stress tolerance or plant growth retardation under long-term drought stress?'. *Gene*, **506**:265 - 273.
- Skirycz A, Inzé D (2010) More or less: plant growth under limited water. *Current Opinion in Biotechnology* **21**: 197-203
- 30 Thomas DA (1970) The regulation of stomatal aperture in Tobacco leaf epidermal strips. *Australian Journal of Biological Sciences* **23**: 961-980
- Tilman D, Balzer C, Hill J, Befort BL.(2011) Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **108**:20260-4.
- 35 Mucha A, Kunert A, Grembecka J, Pawelczak M, Kafarski P (2006) A phosphoramidate containing aromatic N-terminal amino group as inhibitor of leucine aminopeptidase - design, synthesis and stability. *European Journal of Medicinal Chemistry* **41**: 768-772.
- Xie L, Ding Y, Wang Y, Ding Y (2009) Synthetic strategy of o-hydroxyphenyl(ethynyl)phosphinates. *Chinese Journal of Chemistry* **27**: 1387-1390.
- 40 Zhang, W. y Gusta, L.V. (2010). Germination response of black and yellow seed coated canola (*Brassica napus*) lines to chemical treatments under cold temperature conditions. *Plant Growth Regulation* **60**:105-114.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto, o una de sus sales, de fórmula:



2. Un compuesto de fórmula como la proporcionada para E2, E3, E5 o E8:



5

3. Un método para sintetizar un compuesto según las reivindicaciones 1-2, que comprende:

- fosfonilar un precursor de benceno o de naftaleno halogenado adecuado por medio de un intercambio de litio-halógeno y una desactivación posterior con clorofosfato de dietilo para obtener compuestos intermedios de fenilfosfonato o naftilfosfonato de dietilo,
- monodesalquilar dichos compuestos intermedios de fenilfosfonato o naftilfosfonato de dietilo por medio de condiciones de hidrólisis básica con el fin de obtener compuestos intermedios de ácido fosfónico,
- activar dichos compuestos intermedios de ácido fosfónico a sus clorofosfonatos correspondientes por medio de cloruro de tionilo, y realizar un desplazamiento nucleófilo de dicho cloruro en condiciones básicas por medio de un bencil- (n=1) o fenil- (n=0) amina (Y=NH) o alcohol (Y=O),
- intercambiar el grupo alcoxi del fosfonato restante por un grupo hidroxilo mediante hidrólisis básica, mediada por hidróxido de litio.

10

15

4. Uso del compuesto E2, E3 y E8 para inducir específicamente el cierre de los estomas sin afectar al crecimiento de las raíces o de los brotes.

5. Uso del compuesto E5 para inhibir específicamente la germinación de semillas.

20

6. Una formulación química agrícola formulada para poner en contacto con plantas, en donde la formulación comprende un compuesto según las reivindicaciones 1-2.

7. Una formulación según la reivindicación 6, que comprende además al menos uno entre un herbicida, un fungicida, un pesticida, un fertilizante o un tensioactivo.

25

8. Un método para modular el desarrollo de una planta, en donde el método comprende poner en contacto una planta con una cantidad suficiente de la formulación según las reivindicaciones 6-7 para modular el desarrollo de dicha planta en comparación con no poner en contacto la planta con dicha formulación.

9. Un método según la reivindicación 8, en el que dicha modulación es incrementar la tolerancia al estrés por sequía.

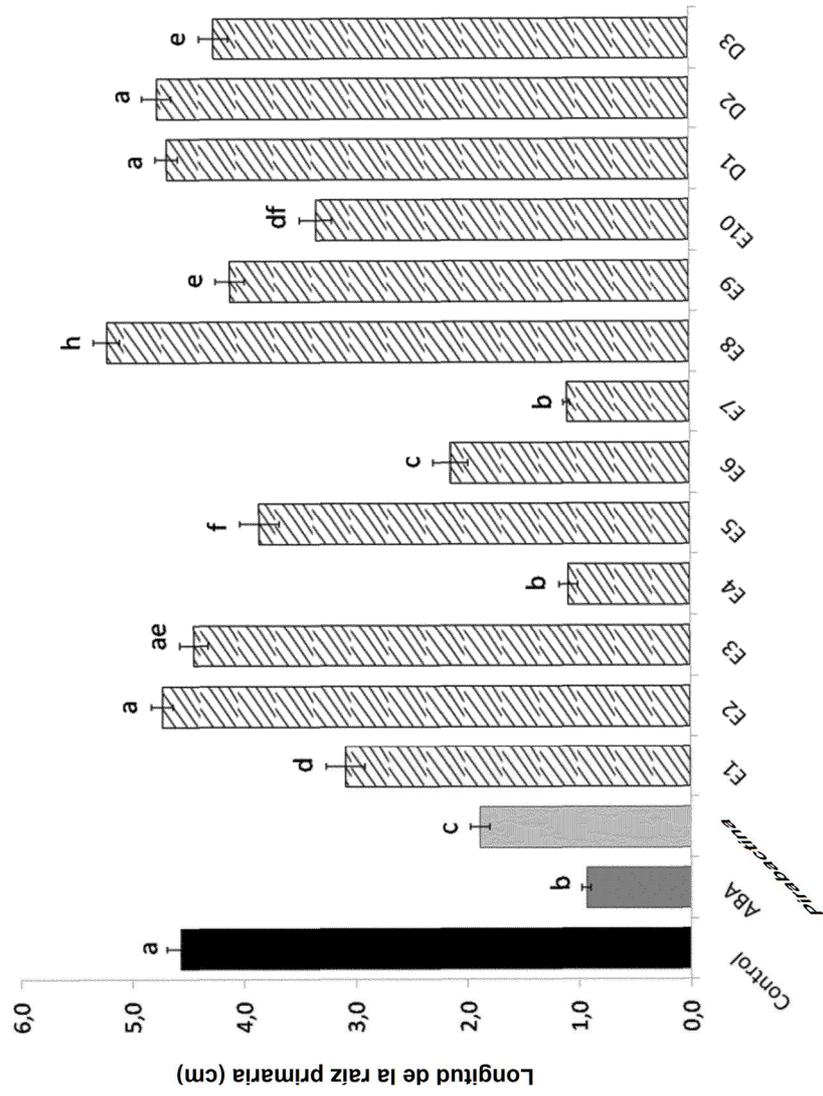


Fig.1

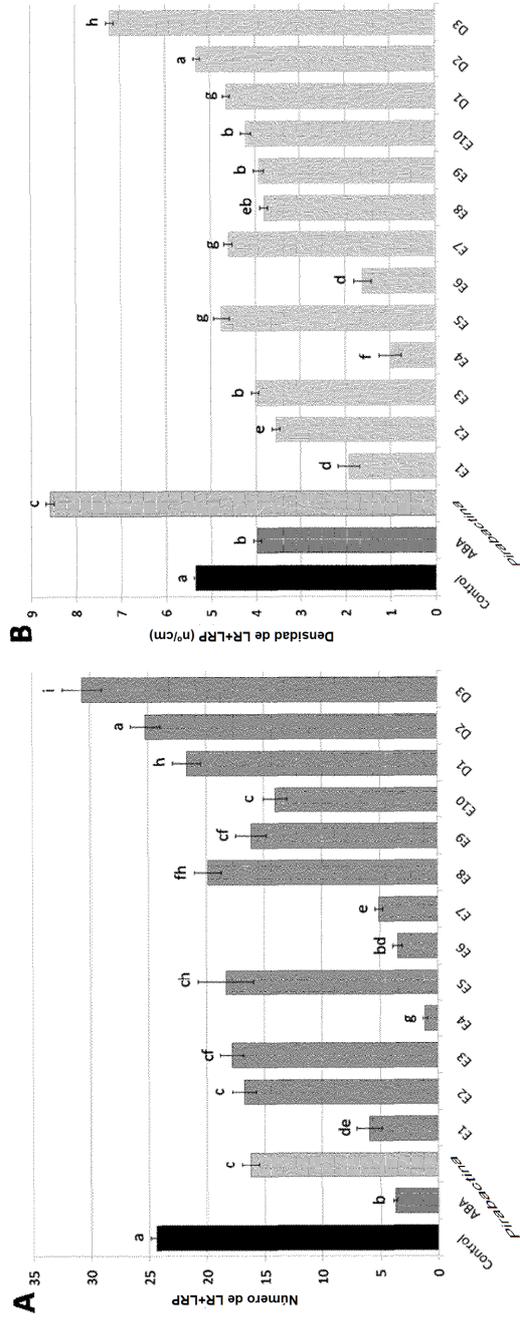


Fig.2

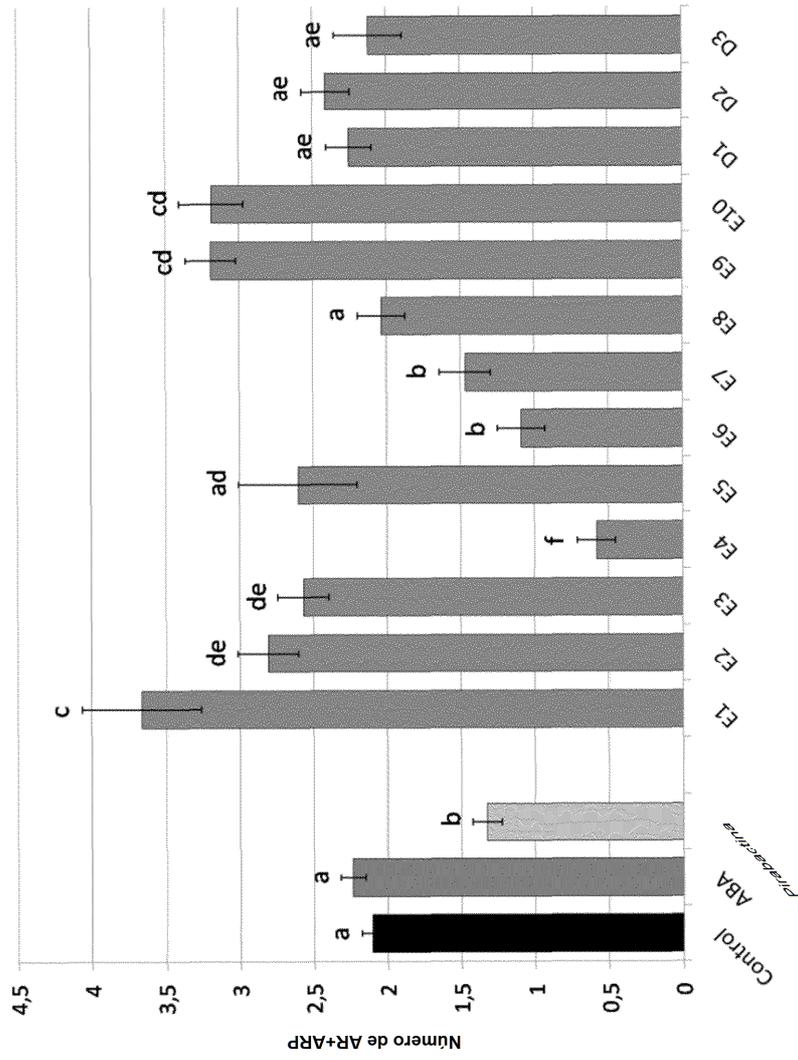


Fig.3



Fig.4

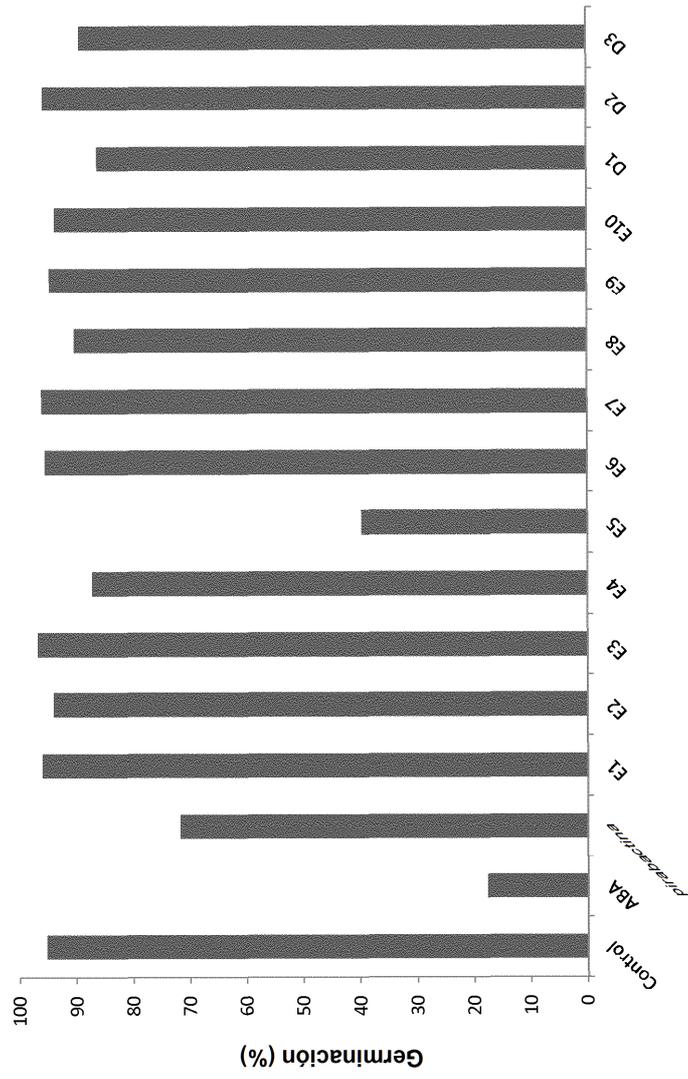


Fig.5

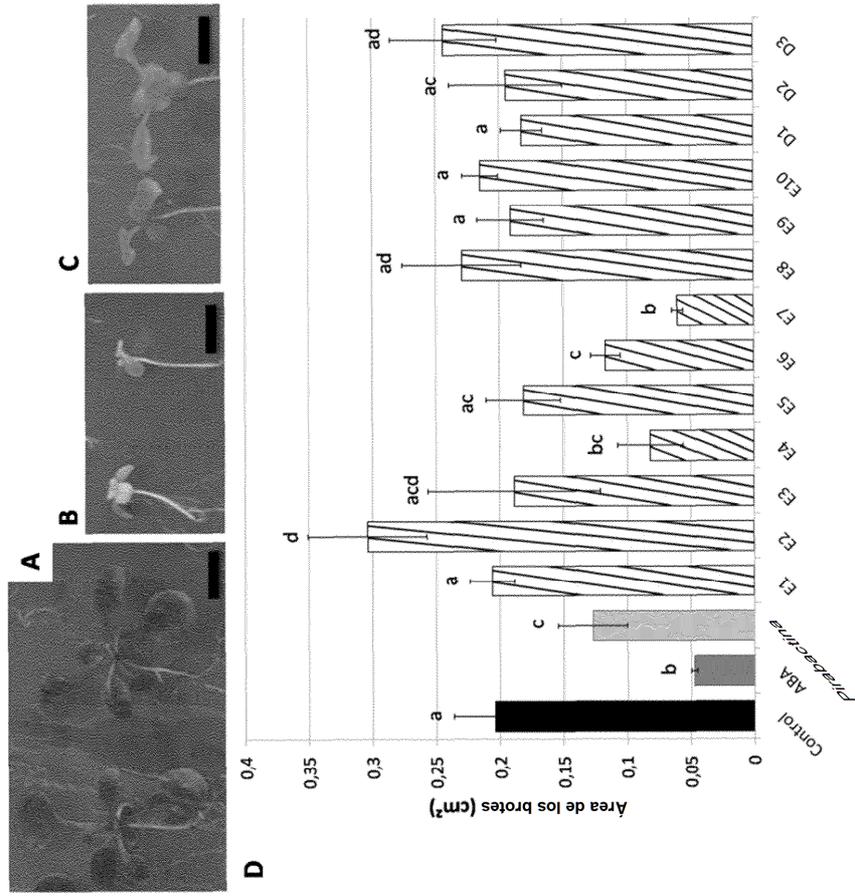


Fig.6

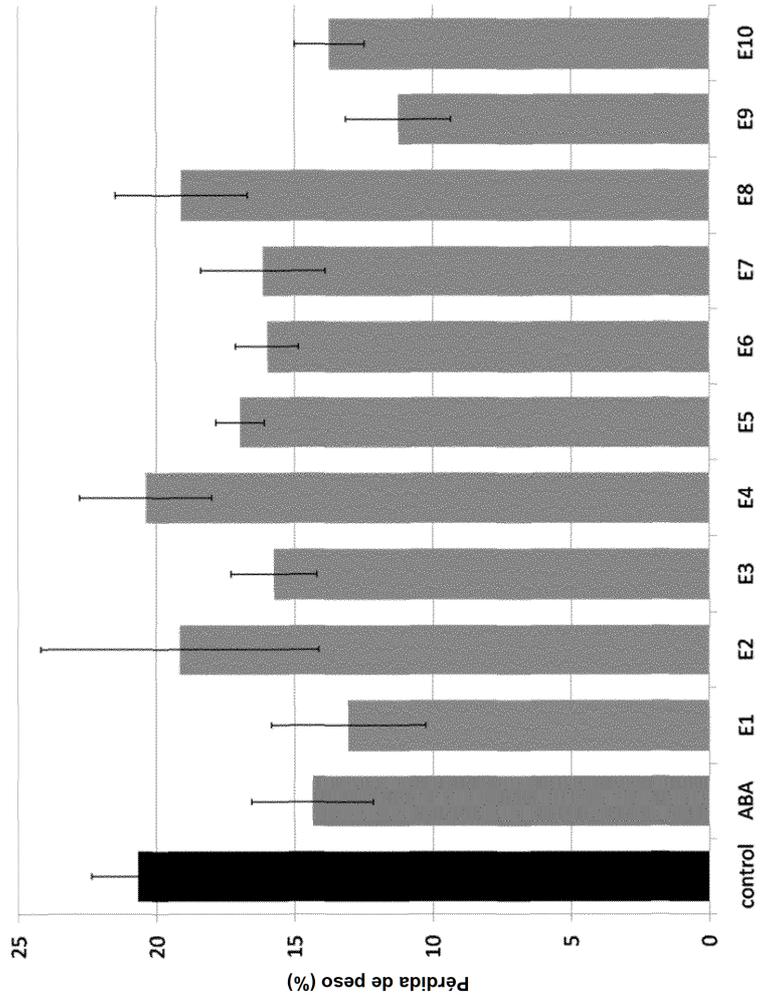


Fig. 7

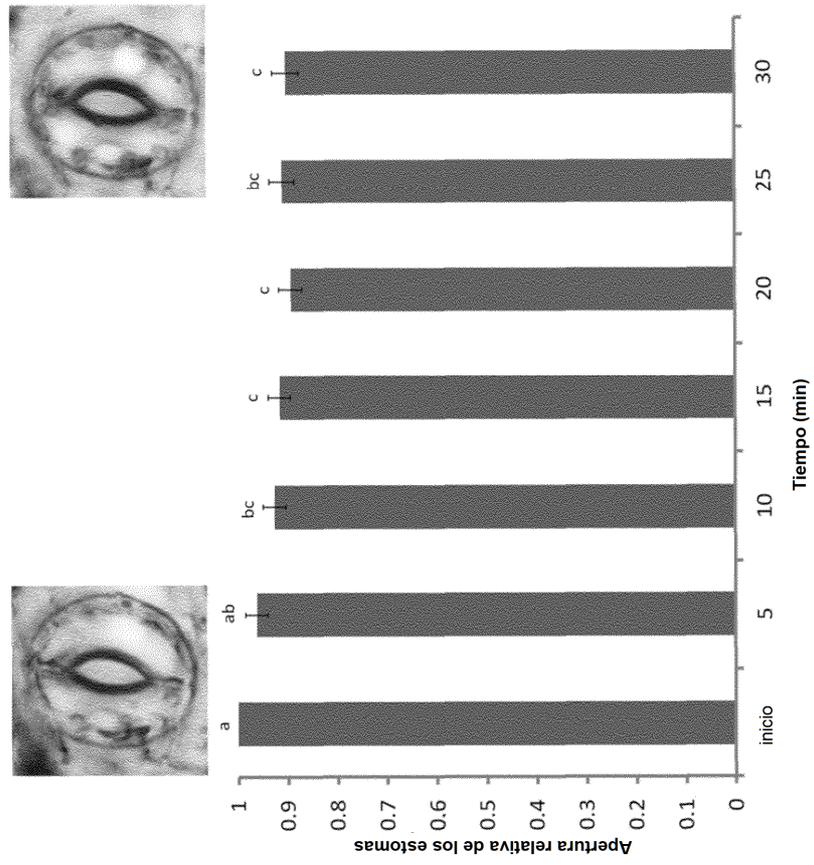


Fig.8

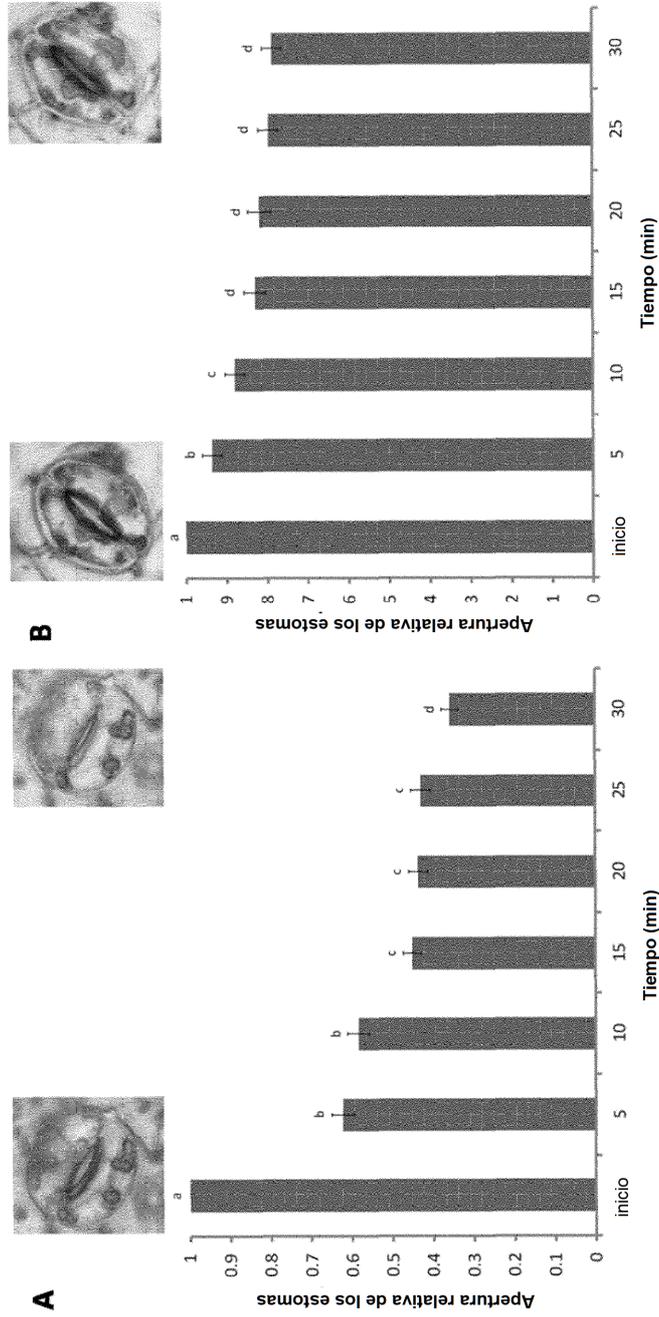


Fig. 9

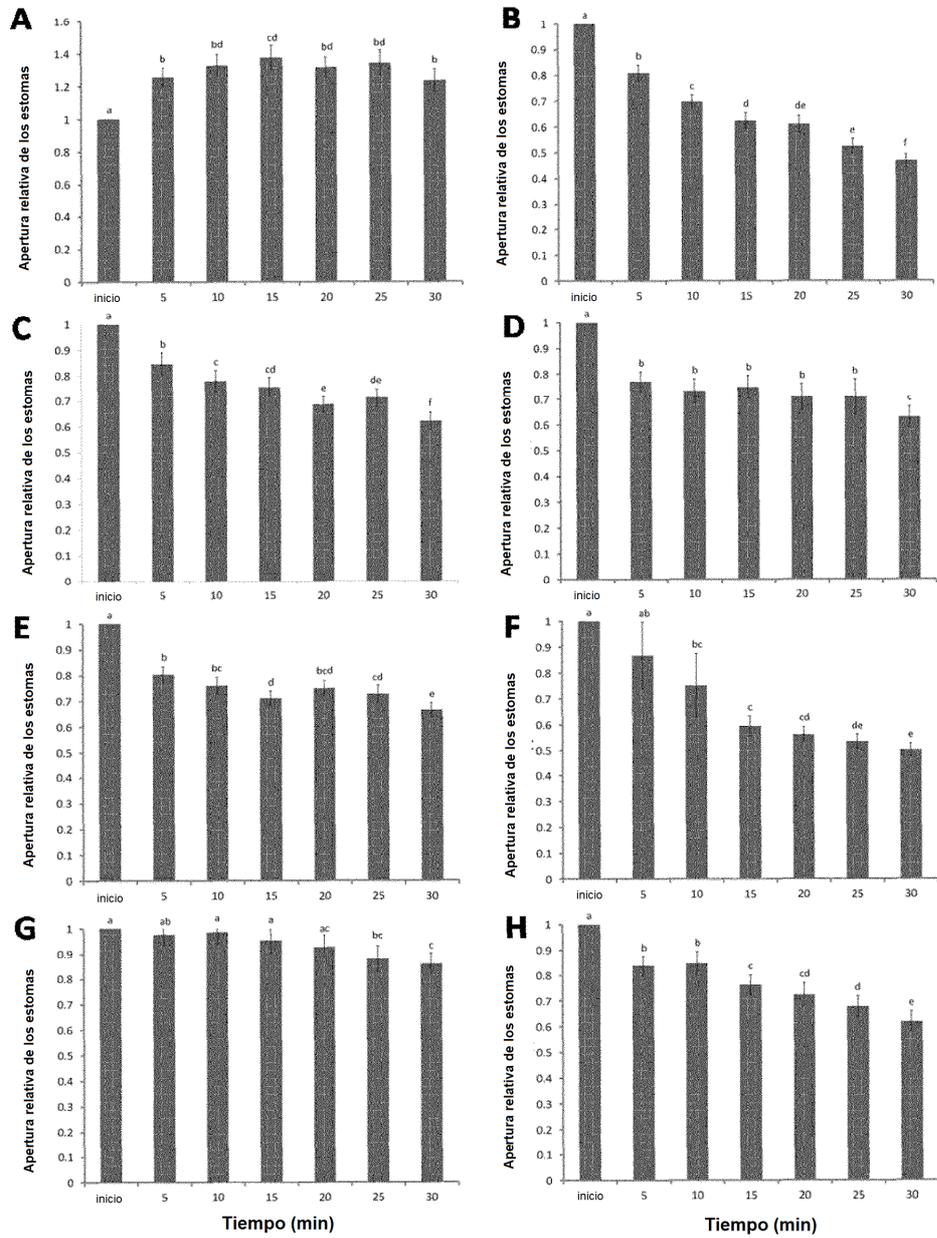


Fig 10