

Hidrazonas 2,4-dinitrofenilhidrazínicas: Síntesis, Caracterización Espectroscópica y Evaluación *in vitro* frente a *Escherichia coli*

2,4-Dinitrophenylhydrazone Derivatives: Synthesis, Spectroscopic Characterization, and *in vitro* Evaluation against *Escherichia coli*

Rodríguez, Fabio^{1*}; Vizcaya, Marietta¹; Pérez, Patricia¹; Chacón, Zarack²; Lugo, Claudio³

¹Laboratorio de Polímeros, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Venezuela.

²Laboratorio Microbiología Molecular y Biotecnología, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, ULA, Venezuela.

³Laboratorio de Cinética y Catálisis, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Venezuela.

*fabiorod95@gmail.com

Resumen

Se sintetizaron una serie de nuevos derivados de 2,4-dinitrofenilhidrazonas (P1–P4) mediante la reacción de condensación ácido-catalizada entre 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4-DNPH) y cuatro cetonas diferentes (R1–R4) en etanol bajo reflujo, utilizando proporciones estequiométricas equimolares. Las cetonas empleadas fueron 2-bromo-1-(4-fenilfenil) etanona (R1), 2-cloro-1-feniletanona (R2), 2-bromo-1-(4-clorofenil) etanona (R3) y 1-(4-metoxifenil) etanona (R4). Las hidrazonas correspondientes se obtuvieron con buenos rendimientos y se caracterizaron completamente mediante técnicas espectroscópicas. La elucidación estructural confirmó la formación exitosa de los compuestos esperados. Los espectros FT-IR mostraron la banda de absorción característica del grupo imino (C=N) junto con la desaparición de la vibración de tensión del carbonilo (C=O) de las cetonas de partida. En los espectros de RMN-¹H, desaparecieron las señales correspondientes a los protones de la amina primaria (–NH₃) de la 2,4-DNPH, mientras que se observó un desplazamiento a campo bajo característico del protón azometino (=N–NH–). La espectroscopia UV-Vis reveló un marcado efecto batocrómico en la banda de absorción asociada al sistema hidrazónico, consistente con una extensión significativa del sistema π -conjugado. Además, los datos de punto de fusión y solubilidad fueron consistentes con las estructuras propuestas. La actividad antibacteriana *in vitro* de las hidrazonas sintetizadas se evaluó frente a *Escherichia coli* mediante una modificación del método de difusión en disco de Kirby-Bauer. Ninguno de los compuestos (P1–P4) exhibió actividad bacteriostática en las condiciones ensayadas.

Palabras claves: Hidrazonas, 2,4-DNPH, Condensación, *Escherichia coli*.

Abstract

A series of novel 2,4-dinitrophenylhydrazone derivatives (P1–P4) were synthesized through an acid-catalyzed condensation reaction between 2,4-dinitrophenylhydrazine (2,4-DNPH) and four different ketones (R1–R4) in ethanol under reflux conditions, employing equimolar stoichiometric ratios. The ketones used were 2-bromo-1-(4-phenylphenyl)ethan-1-one (R1), 2-chloro-1-phenylethan-1-one (R2), 2-bromo-1-(4-chlorophenyl)ethan-1-one (R3), and 1-(4-methoxyphenyl)ethan-1-one (R4). The corresponding hydrazones were obtained in good yields and fully characterized by spectroscopic techniques. Structural elucidation confirmed the successful formation of the expected compounds. FT-IR spectra showed the characteristic absorption band of the imine group (C=N) along with the disappearance of the carbonyl (C=O) stretching vibration of the starting ketones. In the ¹H-NMR spectra, the signals of the primary amine protons (–NH₃) of 2,4-DNPH disappeared, while a characteristic downfield shift was observed for the azomethine proton (=N–NH–). UV-Vis spectroscopy revealed a significant bathochromic shift in the absorption band associated with the hydrazone moiety, consistent with an extended π -conjugated system. Additionally, melting point and solubility data were consistent with the proposed structures. The *in vitro* antibacterial activity of the synthesized hydrazones was evaluated against *Escherichia coli* using a modified Kirby-Bauer disk diffusion method. None of the compounds (P1–P4) exhibited bacteriostatic activity under the tested conditions.

Keywords: Hydrazones, 2,4-DNPH, Condensation, *Escherichia coli*.

1 Introducción

La síntesis orgánica ha constituido uno de los pilares fundamentales del progreso científico y tecnológico, evolucionando continuamente para satisfacer la demanda de nuevas moléculas con propiedades funcionales específicas (Bosch y Rosich, 2008). Este desarrollo se ha caracterizado por la implementación de metodologías cada vez más eficientes, selectivas y sostenibles, adaptadas a las necesidades de la sociedad moderna. Un hito trascendental en esta trayectoria fue el enfoque racional introducido por Paul Ehrlich, quien estableció un protocolo sistemático basado en la síntesis de una amplia serie de análogos estructurales a partir de una molécula base, seguido de su evaluación biológica *in vitro* e *in vivo*. Este método, que culminó con el descubrimiento del Salvarsán®, representó el nacimiento de la química medicinal moderna al sustituir el descubrimiento empírico por una estrategia deliberada de diseño, síntesis y optimización de propiedades farmacológicas (Bosch y Rosich, 2008).

Dentro de las diversas familias de compuestos nitrogenados, las hidrazonas ocupan un lugar destacado debido a su accesibilidad sintética y a la versatilidad estructural que ofrece el grupo funcional imino ($C=N$). Su preparación convencional, mediante condensación entre hidrazinas o hidrazidas y carbonilos en medio alcohólico acidificado bajo reflujo, suele proceder con buenos rendimientos y permite una fácil incorporación de diversos fragmentos moleculares (Popiołek, 2021; Barqi y col., 2023).

En el ámbito farmacéutico, varios medicamentos derivados de hidrazina han alcanzado relevancia clínica. Entre ellos destacan la procarbazona, utilizada en el tratamiento del linfoma de Hodgkin y tumores cerebrales; la fenelzina, un inhibidor de la monoaminoxidasa (MAO) con actividad antidepresiva; y la hidralazina, un vasodilatador empleado en el manejo de la hipertensión arterial (Guillou y col., 2024).

La 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4-DNPH), comúnmente conocida como reactivo de Brady, constituye uno de los derivados más importantes de la hidrazina en química orgánica analítica y sintética; se emplea ampliamente para la identificación y caracterización de aldehídos y cetonas, ya que reacciona con ellos formando 2,4-dinitrofenilhidrazonas cristalinas, estables y con puntos de fusión característicos que facilitan su aislamiento y purificación (Brady, 1931).

Estructuralmente, la 2,4-DNPH consiste en un anillo bencénico sustituido con un grupo hidrazino en posición 1 y dos grupos nitro en posiciones 2 y 4. Se trata de un sólido de color anaranjado, sensible a impactos y fricción, por lo que se comercializa habitualmente en forma hidratada para mejorar su estabilidad (Allen, 1930). Es un reactivo ideal para la obtención de hidrazonas cristalinas con buenos rendimientos, lo cual resulta particularmente útil tanto en la identificación cualitativa de carbonilos como en la preparación de derivados para estudios estructurales y

biológicos posteriores.

Por otra parte, la alta multifuncionalidad de compuestos como las hidrazonas, junto con la posibilidad de introducir diversos sustituyentes en ambos extremos de la molécula, explica la amplia variedad de actividades biológicas reportadas para esta familia de compuestos y el sostenido interés de la comunidad científica en su síntesis con fines farmacológicos (Vivas y col., 2017; De la Cruz Argüello y col., 2022). En el ámbito terapéutico, diversas hidrazonas han alcanzado uso clínico como agentes antibacterianos. Entre los ejemplos más relevantes se encuentran la nitrofurazona, la furazolidona y la nitrofurantoína, compuestos que continúan empleándose en el tratamiento de diversas infecciones (Celik y col., 2020).

En los últimos años, esta clase de compuestos ha sido objeto de intensa investigación, particularmente en el ámbito de la actividad antimicrobiana. Puskullu y colaboradores en el año 2020 reportaron la síntesis de hidrazonas derivadas de quinolina-2-carbaldehído que exhibieron actividad inhibitoria frente a varios microorganismos (Puskullu y col., 2020). De manera similar, en 2022 Sahib y colaboradores obtuvieron derivados que incorporaban fragmentos de sulfonamida y amida, demostrando actividad antimicrobiana moderada contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, con un compuesto que alcanzó un desempeño comparable al de la amoxicilina frente a *Staphylococcus epidermidis* (Sahib y col., 2022). Por otra parte, en 2020 Ade y colaboradores prepararon una serie de 2,4-dinitrofenilhidrazonas que mostró actividad débil a moderada contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. aureus* y *S. pneumoniae*, incluyendo efectos moduladores de resistencia antibiótica (Ade y col., 2020).

Estudios posteriores, como los de Babalola y colaboradores en 2022 (Babalola y col., 2022) y Popiołek y colaboradores en 2023 (Popiołek y col., 2023), han subrayado la influencia significativa de los sustituyentes aromáticos (particularmente halógenos y grupos metoxi), sobre la actividad antibacteriana y antifúngica de estas moléculas. Asimismo, en Venezuela recientemente se sintetizaron 2,4-dinitrofenilhidrazonas derivadas de naftoquinonas, destacando su potencial como plataformas para futuros estudios biológicos (Barrios y col., 2021). Sin embargo, el interés en las hidrazonas trasciende su potencial antimicrobiano. Diversos trabajos han explorado su aplicación en otras áreas terapéuticas relevantes. Recientemente se incorporaron núcleos de quinolina en el diseño de hidrazonas con el objetivo de evaluar su actividad citotóxica, inspirados en la eficacia demostrada de derivados quinólicos en terapias antitumorales (Katariya y col., 2020).

De igual manera se sintetizaron derivados de hidralazina que mostraron notables efectos antinociceptivos y antiinflamatorios en modelos *in vivo*. Por otra parte, en esta década de importantes avances de síntesis de hidrazonas se reportaron 2-tiazolilhidrazonas con prometedora capacidad antioxidante, alcanzando en algunos casos una neutralización

del radical DPPH• comparable a la de la curcumina. (Maltarollo y col., 2018). La notable versatilidad biológica de las hidrazonas se atribuye a la combinación de su relativa simplicidad sintética, la reactividad inherente del grupo imino y la facilidad para modular su estructura mediante la introducción de diferentes sustituyentes. Estos atributos las convierten en plataformas atractivas para el desarrollo de nuevas entidades químicas.

En el presente estudio, se sintetizaron cuatro nuevas hidrazonas derivadas de 2,4-dinitrofenilhidrazina mediante reacción de condensación ácido-catalizada con diferentes cetonas. Los productos obtenidos (P1–P4) fueron caracterizados en detalle mediante técnicas espectroscópicas (FT-IR, RMN-¹H y UV-Vis), confirmando la formación del grupo imino y la extensión del sistema π -conjugado. Adicionalmente, se evaluó su actividad bacteriostática *in vitro* frente a *Escherichia coli* mediante una modificación del método de difusión en disco de Kirby-Bauer. Este trabajo contribuye al conocimiento estructural y biológico de esta importante familia de compuestos, sentando las bases para futuras optimizaciones dirigidas al diseño de moléculas con mayor potencial terapéutico.

2 Procedimiento Experimental

2.1 Metodología y Materiales

2.1.1 Síntesis Química de hidrazonas

Las cetonas de partida (R1–R4) fueron seleccionadas con el propósito de evaluar el efecto de diferentes sustituyentes en el núcleo carbonílico sobre las propiedades estructurales y espectroscópicas de las hidrazonas resultantes. Las estructuras de los reactivos empleados y los productos obtenidos se muestran en la Figura 1.

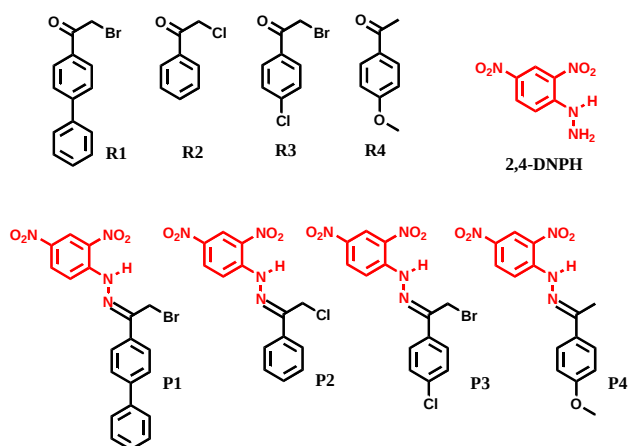


Fig. 1. Estructuras de las cetonas de partida (R1–R4), la 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4-DNPH) y las hidrazonas correspondientes (P1–P4).

La síntesis de las hidrazonas P1–P4 se llevó a cabo disolviendo cantidades equimolares (1 mmol) de 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4-DNPH) y la cetona correspondiente de Merck® sin purificación previa [2-bromo-1-(4-fenilfenil)etanona (R1), 2-cloro-1-feniletanona (R2), 2-bromo-1-(4-clorofenil)etanona (R3) o 1-(4-metoxifenil)etanona (R4)] en 15 mL de etanol de grado analítico. A la mezcla se añadió 0,05 mL de ácido sulfúrico concentrado como catalizador. La reacción se mantuvo bajo reflujo con agitación magnética constante durante unas 3 horas, hasta la aparición de un precipitado insoluble que indicaba la formación del producto. El progreso de la reacción se monitoreó mediante cromatografía de capa fina (TLC).

Una vez completada la reacción, los sólidos obtenidos fueron aislados por filtración al vacío y lavados sucesivamente con porciones de agua destilada y etanol frío para eliminar impurezas y reactivos no consumidos. La purificación final de las hidrazonas se realizó mediante recristalización en etanol. Los productos P1–P4 se obtuvieron como sólidos cristalinos de colores característicos y se secaron a temperatura ambiente.

2.2 Caracterización

2.2.1 Caracterización Espectroscópica

Los espectros de absorción electrónica se registraron en el rango 190–1100 nm en un espectrofotómetro UV-Vis Thermo Scientific Evolution 300, utilizando soluciones de las hidrazonas y reactivos de partida en diclorometano a concentraciones entre $1,0 \times 10^{-7}$ y $1,0 \times 10^{-6}$ molL⁻¹. Se efectuó un análisis comparativo de los espectros correspondientes a la triada cetona–hidrazina–hidrazona.

Los espectros infrarrojos con transformada de Fourier (FT-IR) se obtuvieron en el intervalo entre 4000–400 cm⁻¹ empleando un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 3 y pastillas de KBr al 1 % p/p (100 mg de KBr por muestra).

Los espectros de ¹H-NMR se adquirieron en un espectrómetro Bruker Avance de 300 MHz. Las muestras se prepararon en CDCl₃ o DMSO-d₆ a una concentración de 7 mM, utilizando tetrametilsilano (TMS) como referencia interna.

2.2.2 Evaluación de la actividad bacteriostática

La actividad antibacteriana de las hidrazonas sintetizadas (P1–P4) se evaluó cualitativamente mediante una modificación del método de difusión en agar (Kirby-Bauer), utilizando la cepa estándar *Escherichia coli* ATCC 25922; como control positivo se empleó Estreptomicina (Sigma-Aldrich®) y como control negativo dimetilsulfóxido (DMSO) grado analítico (Sigma-Aldrich®). El medio de cultivo utilizado fue agar Mueller-Hinton (Sigma-Aldrich®),

preparado según las especificaciones del método estándar (Bäuer y Kirby, 1966).

La cepa bacteriana se cultivó previamente durante 24 h a 37 °C en caldo Luria-Bertani. Las placas de Petri se esterilizaron por autoclave a 15 psi y 121 °C durante 15 min. Una vez enfriado el medio en ~ 60 °C, se vertió en placas de Petri hasta alcanzar un espesor uniforme. Tras solidificación, las placas se inocularon con 100 μ L de suspensión bacteriana ajustada, distribuyéndola homogéneamente con un esparcidor estéril. (Cavalieri y col., 2005).

Como modificación al método convencional, se aplicaron directamente 10 μ L de las soluciones de las hidrazonas (300 μ g/mL en DMSO) sobre puntos marcados en la superficie del agar. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Posteriormente, se midieron los diámetros de las zonas de inhibición alrededor de los puntos de aplicación. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

3 Discusión y Resultados

Los puntos de fusión de las hidrazonas P1–P4 se incrementaron notablemente respecto a las cetonas de partida (R1–R4), ver Tabla 1, lo que es consistente con la formación de estructuras planas y rígidas que favorecen un empaquetamiento cristalino más eficiente. La solubilidad también cambió de forma significativa: mientras las cetonas iniciales son más solubles en solventes polares, las hidrazonas muestran mayor afinidad por solventes de polaridad intermedia (Tabla 1), debido al aumento del carácter hidrofóbico tras la condensación con la 2,4-DNPH.

Tabla 1. Rendimiento, punto de fusión y solubilidad de las 2,4-dinitrofenilhidrazonas sintetizadas (P1–P4) y sus cetonas de partida (R1–R4).

Caracterización física de las Hidrazonas sintetizadas			
Compuesto	Rendimiento (%)	PF (°C)	(Solubilidad) 100mg/mL
P1	86	228	Acetona/CH ₂ C
P2	72	206	I ₂ / THF y
P3	69	212	CHCl ₃
P4	93	209	
R1	-	125	Etanol/Agua
R2	-	59	
R3	-	97	
R4	-	38	

3.1 Espectroscopia UV-visible

La comparación de los espectros UV-Vis de la 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4-DNPH), la cetona de partida y la hidrazona correspondiente permitió observar un desplazamiento batocrómico en la banda de mayor longitud de onda, atribuible a la extensión del sistema π conjugado generado por la formación del grupo hidrazona.

En la Figura 2 se muestra la triada representativa para

el compuesto P1 (2,4-dinitrofenilhidrazona de 2-bromo-1-(4-fenilfenil)etanova), junto con sus precursores 2,4-DNPH y R1. Se observa claramente el desplazamiento batocrómico de la banda de absorción de mayor longitud de onda (388 nm) en la hidrazona, ausente en los reactivos iniciales. Este comportamiento es consistente con la conjugación extendida mediada por el orbital sp^3 del nitrógeno, que permite la deslocalización del par electrónico no enlazante hacia el sistema π (Kamlet y col., 1971; Pavia y col., 2001).

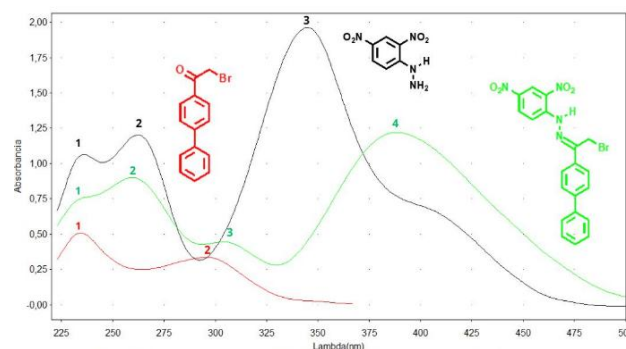


Fig. 2. Espectro UV-Vis de R1, 2,4-DNPH y P1

Los valores de $\lambda_{m\acute{a}x}$ de todos los productos sintetizados se encuentran resumidos en la Tabla 2. En esta tabla se aprecia que las hidrazonas P1–P4 presentan una banda característica entre 377 y 389 nm, resultado de la extensión de la conjugación π .

Tabla 2. Longitudes de onda de absorción máxima ($\lambda_{m\acute{a}x}$) de las bandas UV-Vis de la 2,4-DNPH, las cetonas de partida (R1–R4) y las hidrazonas sintetizadas (P1–P4).

Longitudes de onda de absorción máxima ($\lambda_{m\acute{a}x}$)				
Compuesto	1	2	3	4
2,4-DNPH	232	263	346	-
R1	232	295	-	-
R2	247	280	-	-
R3	268	-	-	-
R4	275	-	-	-
P1	232	261	305	388
P2	233	377	-	-
P3	233	380	-	-
P4	232	389	-	-

En la Figura 3 se comparan los espectros UV-Vis de las cuatro hidrazonas P1–P4. Se observa que todos los productos exhiben la misma banda característica alrededor de 380 nm, confirmando la formación exitosa de las 2,4-dinitrofenilhidrazonas. Esta banda es coherente con lo reportado en la literatura para compuestos análogos (Koivusalmi, 2001). Además, se mantiene en todos los casos la banda a ~232 nm correspondiente al núcleo 2,4-DNPH, lo que indica que este fragmento estructural se conserva intacto tras la reacción de condensación.

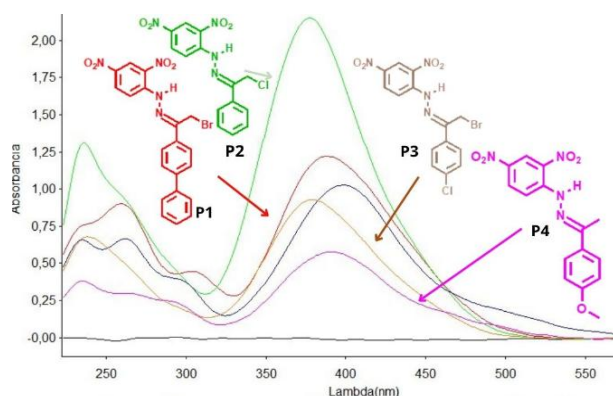


Fig. 3. Espectros UV-Vis superpuestos de las 2,4-dinitrofenilhidrazonas P1-P4.

La aparición sistemática del desplazamiento batocrómico y de la banda alrededor de 380 nm en todos los productos sintetizados demuestra la extensión del sistema cromóforo como fenómeno general en la formación de las 2,4-dinitrofenilhidrazonas.

3.2 Espectroscopia infrarroja, FT-IR

La espectroscopia infrarroja (FT-IR) confirmó la formación de las 2,4-dinitrofenilhidrazonas mediante la desaparición de las bandas características del grupo carbonilo (C=O) de las cetonas de partida y de la amina primaria (–NH₂) de la 2,4-DNPH, así como la aparición de la banda de tensión del enlace C=N y la persistencia de la amina secundaria.

La Figura 4 muestra los espectros FT-IR superpuestos de la triada representativa: 2,4-DNPH, cetona R1 y la hidrazona P1. En el espectro de R1 se observa la banda C=O a 1687,9 cm⁻¹ (desplazada hacia frecuencias más bajas por conjugación aromática). El espectro de la 2,4-DNPH muestra las bandas de tensión N-H primaria y secundaria. En P1 desaparecen las señales de amina primaria y carbonilo, apareciendo la banda característica C=N a 1615,3 cm⁻¹ junto con la amina secundaria. Todas las asignaciones se detallan en la Tabla 3.

Tabla 3. Correlación de bandas FT-IR características en los espectros de 2,4-DNPH, R1 y P1.

Bandas FT-IR. Espectros de 2,4-DNPH, R1 y P1 (cm ⁻¹)				
Asignación	Señal	2,4-DNPH	R1	P1
U N-H (1°)	A	3326	-	-
U N-H (2°)	B	3285,7	-	3278,3
U =C-H	C	3103,8	3050,6	3046,3
U C=O	E	-	1687,9	-
U C=N	F	-	-	1615,3
U C=C	G	1645	1601,7	1590
U NO ₂	H	1517,9	-	1496,1
U NO ₂	I	1319,4	-	1331,1

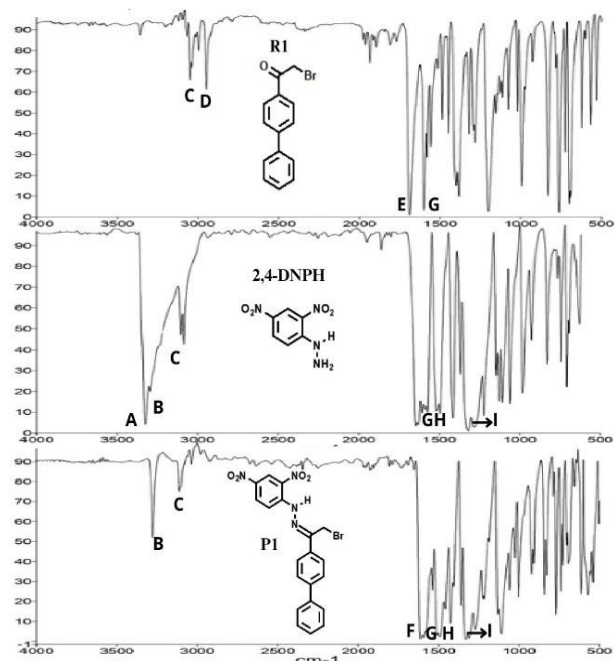


Fig. 4. Espectros FT-IR superpuestos de las 2,4-dinitrofenilhidrazonas P1 y R1.

De manera análoga, los espectros FT-IR de las hidrazonas P2, P3 y P4 presentaron un comportamiento espectral idéntico al de P1. Este patrón consistente se resume en la Tabla 4, donde se recopilan las bandas características de los cuatro productos.

Tabla 4. Correlación de bandas FT-IR características en los espectros de 2,4-DNPH, R1 y P1.

Bandas FT-IR de las 2,4-dinitrofenilhidrazonas sintetizadas (P1-P4) (cm ⁻¹)				
Asignación	P1	P2	P3	P4
U N-H (2°)	3278,3	3285,3	3292,3	3292,3
U C=N	1615,3	1615,5	1610,6	1610,6
U C=C	1590	1580	1590,1	1590,1
U NO ₂	1496,1	1517,2	1495	1495
U NO ₂	1331,1	1332	1336,6	1333,6
U C-O-C	-	-	-	1251,9
U C-O-C	-	-	-	1025

3.3 Espectroscopia RMN-¹H

La espectroscopia RMN-¹H confirmó de manera inequívoca la formación de las 2,4-dinitrofenilhidrazonas mediante la desaparición de la señal característica de la amina primaria (–NH₂) de la 2,4-DNPH, el notable desplazamiento hacia campos más bajos del protón –NH– y la retención de los patrones alifáticos y aromáticos de los precursores, todo ello consistente con la creación del sistema conjugado C=N–NH–.

En la Figura 5 se muestran los espectros RMN-¹H superpuestos de la triada representativa: 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4-DNPH), cetona R1 y la hidrazona P1. La Tabla 5 recopila las señales observadas.

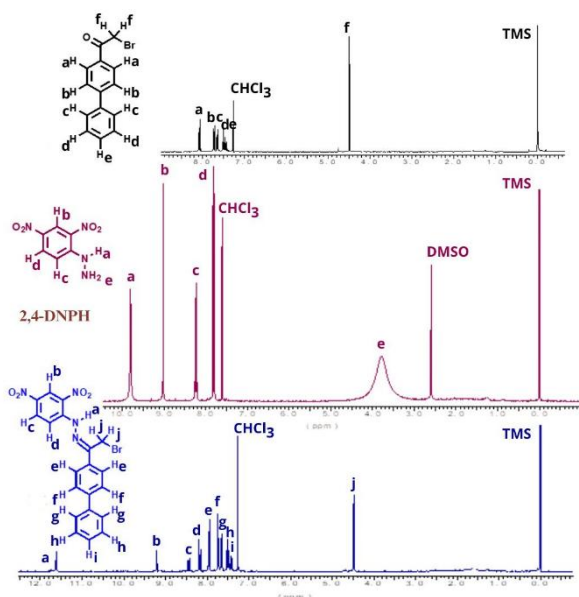


Fig. 5. Espectros RMN-¹H superpuestos de las 2,4-dinitrofenilhidrazonas P1 y R1.

Tabla 5. Señales RMN-¹H características de 2,4-DNPH, R1 y P1.

Compuesto	Señal	δ(ppm)	Multipl.	Integral
2,4-DNPH	a	9,801	s	1
2,4-DNPH	b	9,019	s	1
2,4-DNPH	c	8,231	d	1
2,4-DNPH	d	7,803	d	1
2,4-DNPH	a	3,800	s (ancha)	2
R1	-	8,090	d	2
R1	a, b, c, d, e	7,720-7,440	m	9
R1	f	4,491	s	2
P1	a	11,621	s	1
P1	b, c, d, e, f, g, h	9,204-7,425	m	12
P1	j	4,475	s	2

*s= singlete, d=doblete y m=multiplete

En el espectro de P1 desaparece por completo la señal ancha a 3.80 ppm (2H, -NH₂) de la 2,4-DNPH, mientras que el protón -NH- sufre un fuerte desplazamiento deshieldado hasta 11.621 ppm. Este efecto se debe al aumento del carácter s del nitrógeno sp² en el sistema conjugado C=N-NH-, al efecto anisotrópico del anillo dinitrofenílico y a la atracción electrónica de los grupos nitro, todo lo cual reduce la densidad electrónica sobre el protón. La señal -CH₂Br permanece prácticamente inalterada (4.476 ppm), y los protones aromáticos muestran los desplazamientos esperados por la extensión de la conjugación. Estos cambios

constituyen evidencia espectral directa y concluyente de la formación de la hidrazona.

Los espectros RMN-¹H de las hidrazonas P2, P3 y P4 presentaron un patrón idéntico al de P1, con las mismas asignaciones diagnósticas. Las señales clave de los cuatro productos se resumen de forma condensada a continuación (Tabla 6):

Tabla 6. Señales claves en RMN-¹H de los productos (P1-P4).

P1		P2	
δ(ppm)	Asignación	δ(ppm)	Asignación
11.621	(s, 1H, NH)	11.581	(s, 1H, NH)
9.204	(s, 1H, Ar-H)	9.056	(s, 1H, Ar-H)
8.432	(d, 1H, Ar-H)	8.448	(d, 1H, Ar-H)
8.173	(d, 1H, Ar-H)	8.173	(d, 1H, Ar-H)
7.943-7.425	(m, 9H, Ar-H)	7.953-7.497	(m, 4H, Ar-H)
4.476	(s, 2H, CH ₂ Br)	4.851	(s, 2H, CH ₂ Cl)
P3		P4	
δ(ppm)	Asignación	δ(ppm)	Asignación
11.579	(s, 1H, NH)	11.355	(s, 1H, NH)
9.193	(s, 1H, Ar-H)	9.167	(s, 1H, Ar-H)
8.426	(d, 1H, Ar-H)	8.350	(d, 1H, Ar-H)
8.118	(d, 1H, Ar-H)	8.110	(d, 1H, Ar-H)
7.803-7.477	(m, 4H, Ar-H)	7.832	(d, 2H, Ar-H)
---	---	6.974	(d, 2H, Ar-H)
4.409	(s, 2H, CH ₂ Br)	3.879	(s, 3H, OCH ₃)
---	---	2.440	(s, 3H, C=N-CH ₃)

La superposición de los espectros de las cuatro hidrazonas P1-P4 junto con la 2,4-DNPH se muestra en la Figura 6; se aprecia de forma clara el desplazamiento sistemático del protón -NH- y la ausencia de la señal -NH₂ en todos los productos.

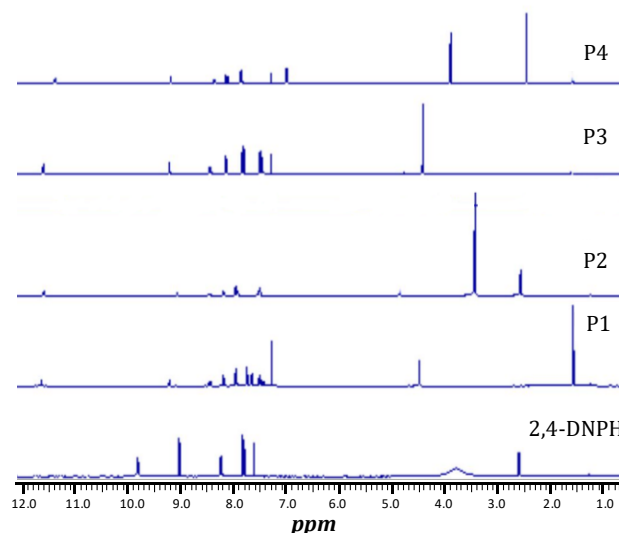


Fig. 6. Espectros RMN-¹H superpuestos de las 2,4-dinitrofenilhidrazonas P1-P4

Estos datos, combinados con la retención de los patrones alifáticos y aromáticos de cada cetona de partida,

validan por completo la estructura de las hidrazonas sintetizadas y la selectividad de la reacción de condensación.

3.4 Actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana de las hidrazonas sintetizadas (P1–P4) se evaluó mediante una modificación del método de difusión en agar frente a *Escherichia coli* ATCC 25922. Tras 24 h de incubación a 37 °C, ninguna de las hidrazonas produjo zona de inhibición visible alrededor del punto de aplicación (Figura 7). En contraste, el control positivo (estreptomicina) generó un claro halo de inhibición de 29 ± 1 mm, mientras que el control negativo (DMSO) no mostró efecto alguno (Tabla 7).

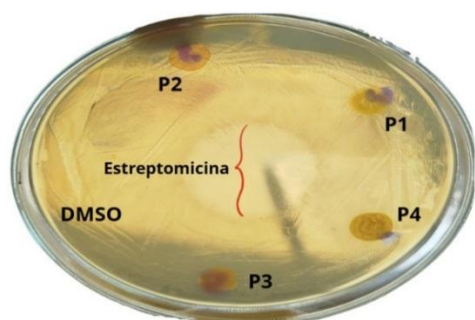


Fig. 7. Placa de Petri después de 24 h de incubación con las muestras a ensayar y los grupos controles

La ausencia de actividad bacteriostática observada puede atribuirse, al menos parcialmente, a la limitada difusión de los compuestos en el medio sólido Mueller-Hinton. Como se aprecia en la Figura 7, la coloración característica de las hidrazonas permaneció localizada en el sitio de aplicación, sin evidenciar una migración significativa a través del agar. Este comportamiento sugiere una posible adsorción de las moléculas sobre la superficie del medio de cultivo o una baja solubilidad en las condiciones ensayadas, lo que impediría alcanzar concentraciones efectivas en las proximidades de la bacteria (Celik y col., 2020).

Tabla 7. Zonas de inhibición (mm) de las hidrazonas (P1–P4) y controles frente a *E. coli* ATCC 25922.

Compuesto	Zona de Inhibición ± 1 mm
P1	---
P2	---
P3	---
P4	---
DMSO	---
Estreptomicina	29
(-) Ausencia de Halo de Inhibición	

Es importante destacar que la concentración empleada ($300 \mu\text{g/mL}$) fue comparable a la utilizada en estudios previos donde hidrazonas derivadas de aldehídos mostraron

actividad moderada contra *E. coli* (Sahib et al., 2022). Por lo tanto, la naturaleza del núcleo carbonílico (cetonas α -sustituidas versus aldehídos aromáticos) podría influir en las propiedades fisicoquímicas y, consecuentemente, en la bioactividad observada.

Estos resultados preliminares indican que, bajo las condiciones del método de difusión en agar, las hidrazonas P1–P4 no exhibieron actividad bacteriostática detectable frente a *E. coli* ATCC 25922. Se recomienda realizar ensayos complementarios mediante métodos de microdilución en caldo, los cuales permitirían determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI), superar posibles limitaciones de difusión y obtener una evaluación más precisa del potencial antimicrobiano de esta serie de compuestos.

4 Conclusiones

Se sintetizaron con éxito cuatro nuevas hidrazonas derivadas de 2,4-dinitrofenilhidrazina (P1–P4) mediante reacción de condensación ácido-catalizada entre 2,4-DNPH y las cetonas correspondientes (R1–R4) en etanol bajo reflujo. Los compuestos se obtuvieron con buenos rendimientos (69 y 93%) y presentaron las propiedades físicas esperadas, tales como color característico, valores de Rf y puntos de fusión definidos.

La elucidación estructural de los productos se realizó mediante técnicas espectroscópicas complementarias. Los espectros UV-Vis mostraron bandas de absorción en el rango de 346–398 nm, atribuibles a transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ del sistema conjugado extendido característico de las hidrazonas. Los espectros de FT-IR confirmaron la formación del grupo imino mediante la desaparición de la banda de tensión del carbonilo (C=O) de las cetonas precursoras y la aparición de la señal característica de tensión C=N alrededor de 1615 cm^{-1} . Por su parte, los espectros de ^1H NMR evidenciaron la desaparición de las señales correspondientes a los protones de la amina primaria de la 2,4-DNPH y el desplazamiento químico característico del protón azometino (=N–NH–), confirmando la estructura propuesta para las hidrazonas sintetizadas.

La evaluación de la actividad bacteriostática *in vitro* frente a *Escherichia coli* ATCC 25922, realizada mediante una modificación del método de difusión en agar (Kirby-Bauer) en medio Mueller-Hinton, reveló que ninguna de las hidrazonas sintetizadas (P1–P4) produjo zona de inhibición detectable bajo las condiciones ensayadas. El control positivo (estreptomicina) mostró un claro halo de inhibición, confirmando la sensibilidad de la cepa bacteriana. Estos resultados contribuyen al conocimiento estructural de hidrazonas 2,4-dinitrofenilhidrazínicas derivadas de cetonas y destacan la importancia de considerar las propiedades fisicoquímicas al evaluar el potencial biológico de esta clase de compuestos.

Agradecimientos

Los autores expresan su sincero agradecimiento al Dr. Carlos Ayala del Laboratorio de Espectroscopía Molecular de la Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, por permitir el acceso a su laboratorio y facilitar la realización de los espectros UV-Visible.

Asimismo, agradecen a la MSc. Marlin Villaroel del Laboratorio de Cinética y Catálisis de la Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, por su valiosa colaboración en el procesamiento y obtención de los espectros infrarrojo (FT-IR).

Finalmente, se agradece especialmente al Dr. Antxon Martínez de Ilarduya de la Universidad Politécnica de Cataluña por su generoso apoyo y asistencia en la adquisición y análisis de los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (^1H -NMR).

Referencias

- Ade A., Amengor C., Brobbey A., Ayensu I., Harley B., Boakye Y., (2020). Synthesis and Antimicrobial Resistant Modulatory Activity of 2, 4-Dinitrophenylhydrazones Derivatives as Agents against Some ESKAPE Human Pathogens, *Journal of Chemistry*, Vol. 2020(1), pp. 1-9.
- Allen C., (1930). The identification of carbonyl compounds by use of 2, 4-dinitrophenylhydrazine, *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 52(7), pp. 2955-2959.
- Babalola S., Igie N., Idris A., Hamza A., Sanni Y., Muhammad H., Erumiseli O., Bakare L., (2022). Antimicrobial activities of hydrazones with a 2, 4-dichloro moiety, *Drug Discovery*, Vol. 16(37), pp. 53-62.
- Barqi M., Ashar A., Bhutta Z., Javed M., Abdellah I., Eletmany M., (2023). Comprehensive Investigation of the Potential of Hydrazine and its Derivatives for the Synthesis of Various Molecules with Biological Activity, *International journal of chemical and biochemical sciences*, Vol. 24(4), pp. 369-385.
- Barrios J., Vizcaya M., Carrillo F., Delgado G., (2021). Síntesis y caracterización de hidrazonas obtenidas a partir de 1, 2 y 1, 4-naftoquinona con 2, 4-dinitrofenilhidracina, *Avances en Química*, Vol. 16(2), pp. 31-37.
- Bauer A.W., Kirby W.M., Sherris J.C., Turck M., (1966). Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method, *American Journal of Clinical Pathology*, Vol. 45(4), 493-496.
- Bosch F., Rosich L., (2008). The contributions of Paul Ehrlich to pharmacology: a tribute on the occasion of the centenary of his Nobel Prize, *Pharmacology*, Vol. 82(3), pp. 171-179.
- Brady O., (1931). The use of 2: 4-dinitrophenylhydrazine as a reagent for carbonyl compounds, *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, issue 0, 756-759.
- Cavalieri S., Rankin I., Harbeck R., Sautter R., McCarter Y., Sharp S., Orteiz, J., Spiegel C., (2005). Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, *American Society for Microbiology*, 1-248.
- Celik I., Erol M., Puskullu M., Uzunhisarcikli E., Ince U., Kuyucuklu G., Suzen S., (2022). In vitro and in silico studies of quinoline-2-carbaldehyde hydrazone derivatives as potent antimicrobial agents, *Polycyclic Aromatic Compounds*, Vol. 42(4), pp. 1942-1958.
- De la Cruz Argüello B., Gálvez B., Díaz G., Morán A., (2022). Síntesis y evaluación de la actividad antifúngica de hidrazonas aromáticas, *Revista Ingeniería Investigación y Desarrollo: I2+ D*, Vol. 22, pp.6-15.
- Guillou A., Peyrottes S., Vasseur J., Mathé C., Smietana M., (2024). The hydrazine moiety in the synthesis of modified nucleosides and nucleotides, *ChemMedChem*, Vol. 19(20), pp. 1-20.
- Kamlet M.J., Eastes J.W., Aldridge M.H., Minesinger R.R., (1971). Hybridization on amine nitrogens and pKa values of some N-(4-nitrophenyl) polymethylenimines, *The Journal of Organic Chemistry*, Vol. 36(25), 3847-3851.
- Katariya K., Shah S., Reddy D., (2020). Anticancer, antimicrobial activities of quinoline based hydrazone analogues: Synthesis, characterization and molecular docking, *Bioorganic chemistry*, Vol. 94, pp. 103406.
- Koivusalmi E., (2001). Characterisation and analysis of synthesis mixtures of hydroxy aldehydes, hydroxy carboxylic acids and polyols (Doctoral dissertation, Helsingin yliopisto).
- Maltarollo V., de Resende M., Kronenberger T., Lino C., Sampaio M., da Rocha Pitta M., de Melo Rego M., Labanca R., de Oliveira R., (2018). In vitro and in silico studies of antioxidant activity of 2-thiazolylhydrazone derivatives, *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, Vol. 86, pp. 106-112.
- Pavia D.L., Lampman G.M., Kriz G.S., Vyvyan J.R., (2001). Introduction to spectroscopy. Belmont, USA, 13.
- Popiołek Ł., (2021). Updated information on antimicrobial activity of hydrazide-hydrazones, *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 22 (17), pp. 9389.
- Popiołek Ł., Gawrońska-Grzywacz M., Dziduch A., Biernasiuk A., Piątkowska-Chmiel I., Herbet M., (2023). Design, Synthesis, and In Vitro and In Vivo Bioactivity Studies of Hydrazide-Hydrazones of 2, 4-Dihydroxybenzoic Acid, *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 24(24), pp. 17481.
- Puskullu M., Celik I., Erol M., Fatullayev H., Uzunhisarcikli E., Kuyucuklu G., (2020). Antimicrobial and antiproliferative activity studies of some new quinoline-

3-carbaldehyde hydrazone derivatives, *Bioorganic Chemistry*, Vol. 101, pp. 104014.

Sahib H., Hadi M., Abdulkadir M., (2022). Synthesis, and Antimicrobial Evaluation of New hydrazone Derivatives of (2, 4-dinitrophenyl) hydrazine, *Research Journal of Pharmacy and Technology*, Vol. 15(4), pp. 1743-1748.

Vivas B., Balbuena L., López I., (2017). Síntesis verde de una hidrazona aromática con estructura nueva / New structure aromatic hydrazone green synthesis. *CIBA, Revista Iberoamericana de las Ciencias Biológicas y Agropecuarias*, Vol. 6(12), pp. 17-32.

Facultad de Ciencias, ULA. Mérida, Venezuela. Correo electrónico: claudiolugo@ula.ve

 <https://orcid.org/0000-0001-8003-0354>

Recibido: 13 de mayo de 2026

Aceptado: 22 de julio de 2026

Rodríguez, Fabio: Licenciado en Química 2025, Departamento de Química (Laboratorio de Polímeros) Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

 <https://orcid.org/0009-0009-2108-629X>

Vizcaya, Marietta: PhD. en Química de Medicamentos, 2014, Instituto de Investigaciones Científicas, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes; Profesora del Departamento de Química (Laboratorio de Polímeros), Facultad de Ciencias, ULA. Mérida, Venezuela. Correo electrónico: marietta@ula.ve

 <https://orcid.org/0000-0002-2064-4175>

Pérez Dávila, Patricia: PhD. en Química de Medicamentos, 2017, Instituto de Investigaciones Científicas, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes; Profesora del Departamento de Química (Laboratorio de Polímeros), Facultad de Ciencias, ULA. Mérida, Venezuela. Correo electrónico: perezdpatricia@gmail.com

 <https://orcid.org/0000-0003-0591-2351>

Chacón, Zarack: MSc. en Biotecnología de Microorganismos (2002). Maestría en Biotecnología de Microorganismos, Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes; Profesor del Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología, Facultad de Ciencias, ULA. Mérida, Venezuela. Correo electrónico: zarack5272@gmail.com

 <https://orcid.org/0009-0008-0728-8824>

Lugo González, Claudio Antonio: PhD. en Química Aplicada, mención: Estudio de Materiales, PiQA, 2017, Universidad de Los Andes; MSc. en Química Aplicada, mención: Estudio de Materiales, PiQA, 2009, Universidad de Los Andes; Profesor Titular del Departamento de Química (adscrito al Laboratorio de Cinética y Catálisis),

