



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACIA



Tesis:

Síntesis, caracterización y actividad microbiológica de una hidrazona derivada de la benzofenona

Para obtener el título de:
Químico Farmacobiólogo

Presenta:
Daniela Lisseth Herrerías Martínez

Matrícula:
201812835

Directora:
MES. Teresa Pacheco Álvarez

Co directora:
D.C. Alma López García

Junio 2024

ÍNDICE

RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN	8
MARCO TEÓRICO	9
Química Orgánica	9
Grupo Carbonilo	10
Aldehídos	10
Cetonas	11
Hidrazonas	12
Actividad anticancerígena	14
Actividad anticonvulsivante	15
Actividad antiinflamatoria	15
Actividad antimicrobiana	16
Resistencia antimicrobiana	18
Agentes bacterianos	20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20
<i>Escherichia coli</i>	20
<i>Staphylococcus aureus</i>	21
Agentes fúngicos	21
<i>Candida albicans</i>	21
<i>Cryptococcus neoformans</i>	22
<i>Aspergillus niger</i>	22
<i>Penicillium digitatum</i>	23
MARCO DE REFERENCIA	24
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	26
JUSTIFICACIÓN	27
OBJETIVOS	28
HIPÓTESIS	28
MATERIALES Y METODOLOGÍA	29
Parte I. Síntesis y caracterización de benzofenona 2,4-dinitrofenilhidrazona	29

Parte II. Retos microbianos	34
Concentración mínima inhibitoria en placa	35
Concentración mínima inhibitoria en placa con hongos filamentosos	37
Concentración mínima inhibitoria microdiluciones en placa	39
Prueba de contacto directo	42
RESULTADOS	45
Parte I. Síntesis y caracterización de benzofenona 2,4-dinitrofenilhidrazona	45
Parte II. Retos microbianos	53
Concentración mínima inhibitoria en placa	53
Concentración mínima inhibitoria en placa con hongos filamentosos	54
Concentración mínima inhibitoria por microdilución en placa	55
Prueba por contacto directo	57
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	60
Parte I. Síntesis y caracterización de benzofenona 2,4-dinitrofenilhidrazona	60
Parte II. Retos microbianos	61
CONCLUSIONES	63
PERSPECTIVAS	64
REFERENCIAS	65

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

Quiero agradecer primeramente a la Maestra Tere por la confianza al brindarme la oportunidad de trabajar este proyecto de tesis y a la doctora Alma, de igual forma por poner su confianza en mí y la paciencia para dar los mejores resultados de este trabajo, además, agradecer todos los consejos brindados por ellas fuera y dentro del laboratorio, además de la inspiración y el ejemplo que son para tomar el rumbo de mi vida profesional.

Quiero dedicar este trabajo primeramente a mis papás, Daniel y Carmen y a mi segunda mamá, Zulma. Por todo el apoyo, cariño y ánimo brindado a lo largo de estos años en los que, a pesar de estar lejos de casa, nunca me hicieron falta. A mi hermano Kevin, por el que me esfuerzo para ser un gran ejemplo y que sepa que todo con dedicación es posible. Agradezco también a mis amigos de la carrera, por su apoyo incondicional y que, gracias a ellos y a ellas, pude también salir adelante y llegar hasta donde estoy. Agradezco también a mis amigas: Doris, Nancy, Mariana y Cori pues también gracias a ellas nunca me desanimé y me esforcé por dar lo mejor de mí siempre y vencer todos mis miedos. Por último, quiero agradecer y dedicar este trabajo, a Francisco, por apoyarme desde el día uno y ayudándome a nunca desistir y siempre buscar la mejor versión de mí, proponerme metas de las que no me creo capaz y cumplir cada una de ellas, gracias por ayudarme a buscar mi mejor versión.

ABREVIATURAS

ADS	Agar dextrosa sabouraud
AST	Agar soya tripticaseína
BLEE	β -lactamasas de espectro extendido
CBP _s	Carbapenemasas
CMH	Caldo Muller Hinton
CMI	Concentración mínima inhibitoria
DMSO	Dimetilsulfóxido
D	Doble
Dd	Doble de dobles
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatogénica
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigénica
FAE	Fármacos antiepilépticos
G	Gramos
H	Horas
HCl	Ácido clorhídrico
IE	Impacto electrónico
IR	Infrarrojo
IR-ATR	Infrarrojo de reflectancia total atenuada
μg	microgramos
μL	microlitros
M	Múltiple
MDR	Multidrogoresistencia
Mg	Miligramos
MH	Muller Hinton

MHz	Megahercios
mL	Mililitros
OMS	Organización Mundial de Salud
PDR	Pandrogoresistencia
Ppm	Partes por millón
RAM	Resistencia antimicrobiana
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
S	Simple
Sa	Señal ancha
SARM	<i>Staphylococcus</i> resistente a la meticilina
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
SSI	Solución Salina Isotónica
T	Triple
Td	Triple de dobles
THF	Tetrahidrofurano
TLC	Cromatografía en capa fina
TMS	Tetrametilsilano
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
XDR	Extremadamente resistente

RESUMEN

Se ha descubierto a lo largo de los años que, las hidrazonas son compuestos prometedores en las creaciones de fármacos innovadores, gracias a sus diversas propiedades farmacológicas lo cual, ha captado el interés de los químicos medicinales debido a su estructura y a las diversas y fascinantes propiedades biológicas que poseen. Entre algunas de estas se encuentra sus efectos cancerígenos, actividad antibacteriana, antifúngica, propiedades antituberculosas y actividad antiinflamatoria.

En el presente trabajo se sintetizó la benzofenona 2,4-dinitrofenilhidrazona con un rendimiento del 78%, se realizó la caracterización del compuesto por IR, RMN de ^1H y ^{13}C en una y dos dimensiones, así como por Espectrometría de Masas. En cuanto a la solubilidad de la hidrazona esta fue menor en acetonitrilo que en DMSO, sin embargo, el DMSO tuvo efecto sobre el crecimiento de algunas cepas microbianas.

Se seleccionaron cepas de interés clínico para probar la actividad microbiológica de la hidrazona respecto a la resistencia antimicrobiana utilizando metodologías experimentales como fueron concentración mínima inhibitoria y contacto directo.

Los resultados demostraron que, la hidrazona presentó una mejor actividad frente a hongos que a bacterias, por lo cual a este compuesto se le atribuye actividad antifúngica pero no antibacteriana.

INTRODUCCIÓN

Los primeros pasos en el desarrollo de la química y la síntesis orgánica se dieron en la Edad Media, mucho antes de que se conocieran las composiciones moleculares. De este modo, importantes cambios de paradigma fueron impulsados por científicos como Lavoisier, Chevreuil, Wöhler, Liebig, Kolbe y Berthelot (Wentrup, 2022). A medida que avanzaba esta disciplina científica, se lograron importantes descubrimientos médicos y farmacológicos que han sido fundamentales para salvar vidas. No obstante, a lo largo de los años, también se han enfrentado desafíos debido a mutaciones de agentes patógenos, malas prácticas de salud y otros factores. Esto ha llevado a la búsqueda de nuevas alternativas y metodologías para desarrollar diversos fármacos que tengan un impacto positivo en la salud de las personas e incluso, replantearse la síntesis de nuevos compuestos que puedan sustituir a los actuales ya que, algunos de ellos como los antibióticos, comienzan a ser poco efectivos contra microorganismos de interés clínico.

De manera que, la resistencia antimicrobiana es uno de los diversos problemas de salud pública que ha obligado a buscar nuevas moléculas biológicamente activas como precursores de fármacos que permitan erradicar enfermedades infecciosas causadas por diferentes microorganismos que van desde levaduras hasta bacterias. Es por ello que, surge un interés principal en las hidrazonas, debido al amplio abanico de posibilidades que poseen en diversos padecimientos entre los que destacan sus actividades anticancerígenas, antiparasitarias, antiinflamatorias, analgésicas, antimicrobianas, entre otras de acuerdo con lo reportado en la literatura.

Este trabajo de tesis se enfocó en realizar la síntesis y caracterización de la benzofenona 2,4-dinitrofenilhidrazona con la finalidad de realizar retos microbianos y observar su respuesta frente a diversas cepas de microorganismos de interés clínico.

MARCO TEÓRICO

Química Orgánica

El término “orgánico” significa “derivado de los organismos vivos”, por lo que en un principio la ciencia denominada como química orgánica se encargaba específicamente de los compuestos extraídos de organismos vivos y de sus productos naturales, como el azúcar, urea, almidón ceras y aceites vegetales, los cuales eran considerados como “orgánicos”, y la gente aceptaba el Vitalismo, creencia dada por que los productos naturales necesitaban una “fuerza vital” para producirlos (Wade, 2011). Lo que hoy se conoce como la rama de química se ubica desde la demostración de Lavoisier (1784), de que los productos derivados de animales y vegetales están compuestos por carbono, hidrógeno y cantidades menores de oxígeno, nitrógeno, azufre y fósforo. Posteriormente en 1807, Berzelius clasificó los compuestos en “orgánicos” (los que se forman en seres vivos) e “inorgánicos” (que están en los minerales). Pero el suceso realmente significativo fue el experimento de Wöhler (1828) quien obtuvo urea, compuesto presente en la orina de muchas especies animales, a partir de la sal inorgánica cianato de amonio. Este descubrimiento debilitó y finalmente destruyó la creencia arraigada por entonces respecto al vitalismo (Autino *et al*, 2013).

La Química Orgánica por lo tanto se ha definido como “la química de los compuestos de carbono” (Autino *et al*, 2013). Las moléculas orgánicas son conjuntos de átomos ordenados y unidos entre sí mediante uniones predominantemente covalentes presentando un “esqueleto” de átomos de C enlazados entre sí que forman lo que se llama “cadena carbonada”; existen muchos compuestos orgánicos, o mezcla de ellos, que representan una gran importancia en la vida cotidiana, por ejemplo: el azúcar y otros edulcorantes, café, té o el alcohol desinfectante; pesticidas, como los destinados a controlar los mosquitos, u otros insecticidas, los fungicidas, etc.; los antibióticos, y todos los principios activos de los medicamentos; las proteínas de la leche, huevos y carnes; el aceite, la manteca, el almidón. Además de materiales “plásticos” poliméricos y otros de uso tecnológico, como por ejemplo el polipropileno de la cubierta transparente; el poliéster de ácido láctico (ácido poliláctico) con que están parcialmente hechas las bolsas degradables; los colorantes de las prendas de vestir, etc (Autino *et al*, 2013).

Grupo Carbonilo

El grupo carbonilo representa uno de los grupos funcionales más importantes para la Química Orgánica (Cazorla, s/f). Se denomina por carbonilo todas aquellas funciones en las que está presente el grupo $C=O$; presentan una gran relevancia de aplicación tanto a la industria como reactivos, disolventes, así como preparación de medicamentos, entre otros, así como en el medio natural formando parte de la estructura de los glúcidos, proteínas, hormonas, etc (Cazorla, s/f).

Existen varios grupos con una función carbonilo: aldehídos, cetonas, ácidos y derivados de ácidos

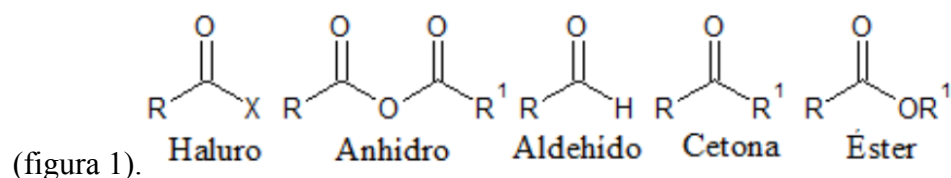


Figura 1. Ejemplos de grupos funcionales con carbonilo (Cazorla, s/f).

Aldehídos

Los aldehídos representan una clase de productos químicos altamente reactivos cuyo uso en el sector industrial es variado. Son compuestos orgánicos que constan de un solo átomo de carbono, un doble enlace con un átomo de oxígeno, un enlace simple con un átomo de hidrógeno y un enlace simple con el grupo R de la cadena lateral (Aljaafari *et al*, 2022) (figura 2). Hay varias formas de sintetizar aldehídos, como el proceso de oxidación de alcoholes primarios para formar aldehídos y el proceso de hidratación de un alquino para formar aldehídos mediante oxidación de metilbenceno o derivados de hidrocarburos y reducción de ésteres; el aldehído más simple es el formaldehído, en el que el grupo carbonilo se une a dos hidrógenos (Aljaafari *et al*, 2022).

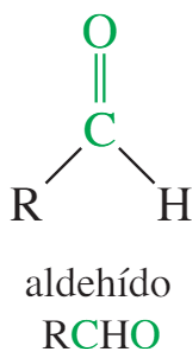


Figura 2. Estructura química del aldehído (Wade, 2012).

Cetonas

Son uno de los compuestos carbonílicos más sencillos. Su estructura consiste en dos grupos alquilo (o arilo) unidos al átomo de carbono del grupo carbonilo (figura 3) (Wade, 2012).

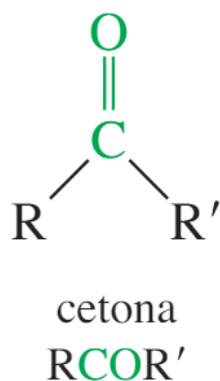
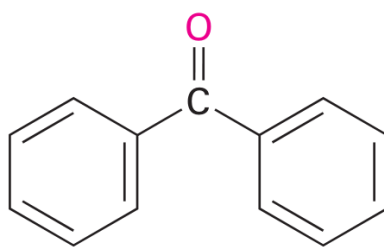


Figura.

Figura 3. Estructura general de una cetona (Wade, 2012).

En general, los métodos para la síntesis de cetonas son similares a los que se utilizan para los aldehídos. Los alcoholes secundarios son oxidados por medio de diversos reactivos para dar cetonas o la ozonólisis de alquenos en la que uno de los átomos de carbono insaturados está sustituido y la acilación de Friedel-Crafts de un anillo aromático con un cloruro de ácido en presencia de AlCl_3 como catalizador, también, las cetonas también pueden prepararse a partir de ciertos derivados de ácidos carboxílicos, de la misma manera como pueden hacerlo los aldehídos (McMurry, 2012).



Benzofenona

Figura 4. Ejemplo de un compuesto tipo cetona (McMurry, 2012).

Un compuesto orgánico como la benzofenona desempeña papeles cruciales en diferentes clases de reacciones. Sirve como reactivo en química orgánica y tiene aplicaciones como ingrediente de sabor, potenciador de sabor, además de fijador de perfumes en la industria de la perfumería, se emplea como aditivo en formulación de plásticos, recubrimientos y adhesivos, entre otras funciones. Pero también se ha descubierto que la benzofenona posee una amplia gama de bioactividades, como antimicrobianas, antifúngicas, anticancerígenas, antiVIH, e incluso actividades inhibitoras de la ureasa (Khan et al, 2024).

Hidrazonas

A lo largo de los años, las hidrazonas son compuestos prometedores en las creaciones de fármacos innovadores, gracias a sus diversas propiedades biológicas. Los compuestos de hidrazona, de fórmula general $RR'C=N-NHR''$ (R = Grupos alquilo) son buenos candidatos para el desarrollo de nuevos fármacos. Estos compuestos son obtenidos generalmente calentando la hidrazina o hidrazida sustituida apropiada con cetonas o aldehídos en diferentes solventes como etanol, metanol, THF, butanol o ácido acético glacial (Gil, 2020).

La versatilidad química de las hidrazonas se atribuye principalmente a la diversidad funcional del grupo funcional imina ($C=N-N-$) que tiene nitrógenos con carácter nucleofílico, un carbono imínico con carácter electrofílico y nucleofílico e isomería configuracional alrededor del =doble enlace CN. Estas características estructurales del grupo imina son la principal responsable de las propiedades físicas y químicas de los derivados de hidrazonas (Gil, 2020).

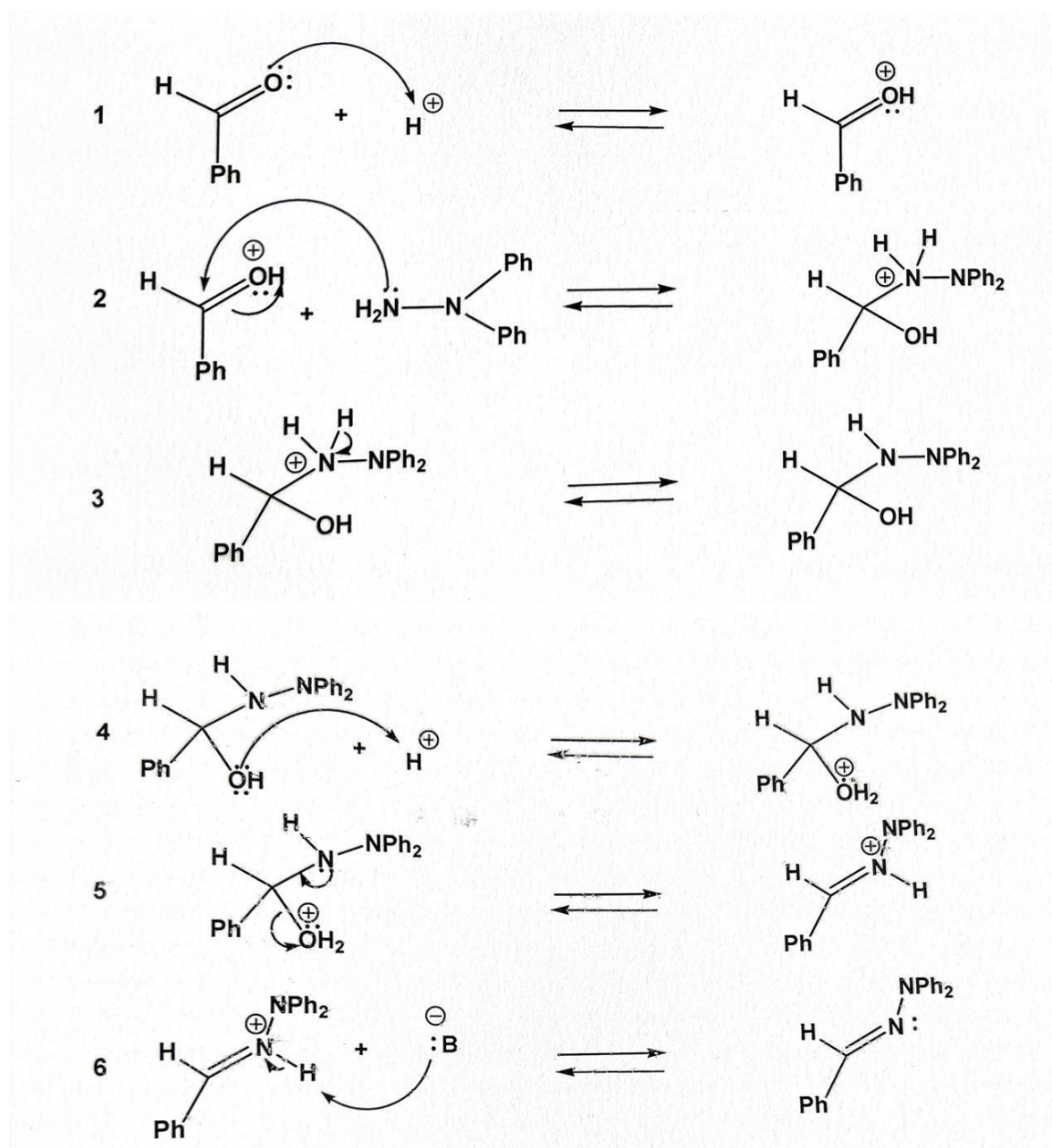


Figura 5. Mecanismo de reacción para la formación de hidrazonas (Pacheco, 2012).

Al introducir grupos funcionales en las moléculas de hidrazonas, se amplía enormemente el alcance de la síntesis orgánica. Así mismo, la fusión de hidrazonas con otros grupos funcionales resulta en la formación de compuestos con determinados atributos físicos y químicos.

Un compuesto ampliamente conocido y utilizado como reactivo de derivación para compuestos carbonílicos. Este compuesto tiene la capacidad de formar rápidamente y de manera eficiente la

respectiva hidrazona en un entorno catalizado por ácido. La reacción de los compuestos carbonílicos con la 2,4-dinitrofenilhidrazona en presencia de un ácido, que tiene un papel en la protonación del grupo carbonilo, genera la correspondiente 2,4-dinitrofenilhidrazona (Ho). Este método se utiliza ampliamente en análisis orgánicos y analíticos, tanto cuantitativos como cualitativos (Pandele *et al*, 2020).

Además, son compuestos de gran relevancia que han captado el interés de los químicos medicinales debido a su estructura y a las diversas y fascinantes propiedades biológicas que poseen. Entre estas están su potencial antitumoral, efectos cancerígenos, actividad antibacteriana y antifúngica, sus propiedades antituberculosas y actividad antiinflamatoria. Estudiar las estructuras de las hidrazonas resulta crucial para comprender y aprovechar plenamente su potencial terapéutico en la búsqueda de nuevos compuestos con propiedades biomédicas (De La Cruz *et al*, 2022).

Actividad anticancerígena

Por otra parte, una gran variedad de hidrazonas han sido parte de fármacos anticancerígenos, por mencionar algunos, están la zorubicina y el bisantreno, miembros altamente representativos utilizados para el tratamiento contra el cáncer (Şenkardeş *et al*, 2022) (figura 6).

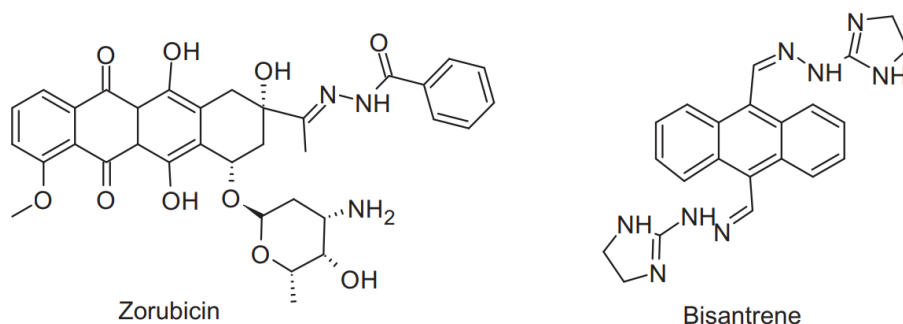


Figura 6. Ejemplo de estructuras químicas de fármacos anticáncer derivados de enlaces hidrazona (Şenkardeş *et al*. 2022).

Otro ejemplo de compuestos con enlace hidrazona y actividad anticancerígena, son las hidrazida-hidrazonas cuya actividad está dada por diferentes mecanismos que incluyen la inducción de apoptosis, prevención de polimerización de microtúbulos, inhibición de quinasas dependientes de ciclina, bloqueo de histonas desacetilasas y las fosfatidilinositol 3-quiases (Koopaei *et al*, 2022).

Las tiosemicarbazonas son conocidas como grupos funcionales coordinativos e importantes en la quimioterapia, y se han incorporado en diversos motivos químicos de valor. Estos compuestos exhiben un amplio espectro de actividad antitumoral, demostrando su eficacia en varias células tumorales debido al tautomerismo tion-tiol (Angelova *et al*, 2016).

Actividad anticonvulsivante

La principal opción terapéutica para el control sintomático de la epilepsia es la terapia con fármacos antiepilépticos (FAE). De hecho, los objetivos principales del tratamiento con FAE son lograr la ausencia de convulsiones, reducir morbilidad y mortalidad, así como mejorar la calidad de vida en pacientes epilépticos (Dehestani *et al*, 2018). La actividad de las hidrazidas/hidrazonas en las enzimas cerebrales puede variar considerablemente. Por lo tanto, la síntesis selectiva de derivados de hidrazida puede permitir cambios específicos en su acción anticonvulsiva sin interferir con otras respuestas celulares que puedan tener efectos tóxicos. Un marco estructural complejo de hidrazida/hidrazona (figura 7) podría ser una herramienta prometedora para el desarrollo de posibles fármacos antiepilépticos (Angelova *et al*, 2016).

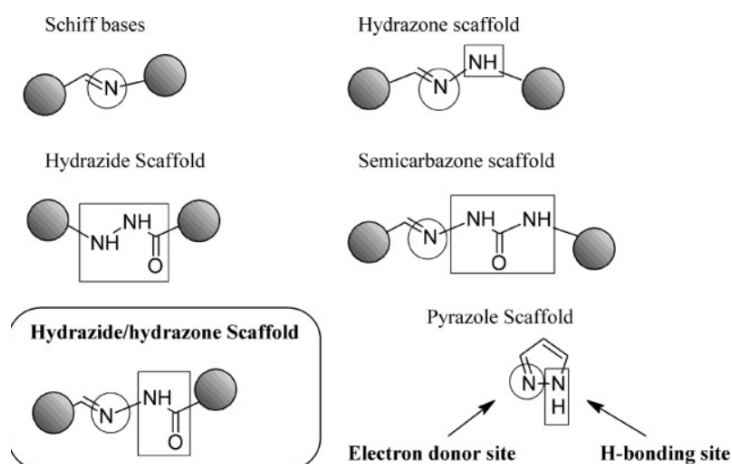


Figura 7. Ejemplos de derivados de Aza, armazón prometedor para nuevos fármacos basados en estructuras (Angelova *et al*. 2016).

Actividad antiinflamatoria

Se denomina el término inflamación a una reacción fisiológica que lleva a cabo ciertas respuestas celulares y bioquímicas, que no solo es considerado un síntoma de enfermedades comunes, sino que también se considera como una fase temprana de enfermedades graves como el Alzheimer, cáncer y enfermedades vasculares del corazón (Kajal *et al*, 2014).

Se realizó un diseño de una serie de benzotiazina N-acilhidrazonas **1** (a - h) (figura 8) mediante una modificación estructural de piroxicam, realizando una síntesis y una evaluación para determinar sus actividades antiinflamatorias y anticonceptivas; esto reveló que los compuestos han mostrado una mejor actividad que el fármaco como referencia piroxicam. Los compuestos **1f** y **1g** (figura 8) fueron identificados como nuevos agentes inflamatorios y anticonceptivos que eran capaz de inhibir el reclutamiento celular en un 0% y 80% respectivamente, en dosis de 100 μmol /kg vía oral en peritonitis inducida por zimosano y carragenina (Kajal *et al*, 2014).

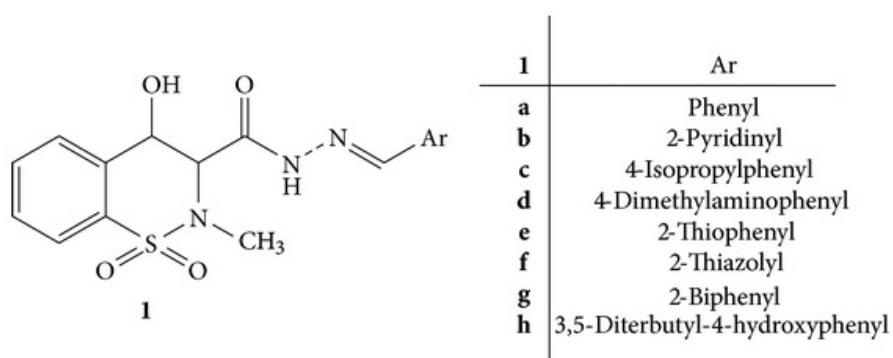


Figura 8. Serie de benzotiazina N-acilhidrazonas sintetizadas (Kajal *et al*, 2014).

Actividad antimicrobiana

Las clases más frecuentes de este tipo de compuesto orgánico que cuentan con actividad antibacteriana son las hidrazonas. Se ha reportado que sus derivados son altamente activos incluso contra cepas bacterianas resistentes (Popiołek, 2021b).

Noshiranzadeh y colaboradores llevaron a cabo la síntesis de una serie de nuevas hidrazonas de ácido láctico y evaluaron su actividad antibacteriana contra cuatro cepas (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*) mediante el método de microdilución en caldo. Resultando los compuestos **1** y **2** (figura 9) con mayor actividad antibacteriana concentración inhibitoria mínima (CMI = 64–128 $\mu\text{g/mL}$) respecto a otros compuestos sintetizados pero siendo mejor que la gentamicina (Noshiranzadeh *et al*, 2017).

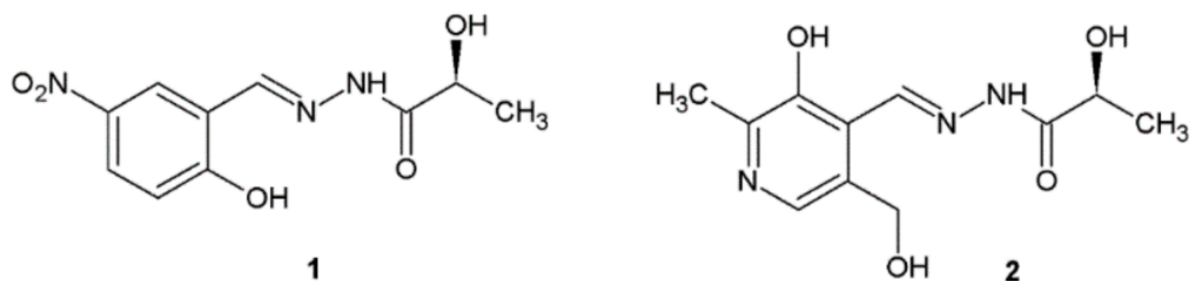


Figura 9. Hidrazinas-hidrazonas obtenidas con actividad antibacteriana (Popiolek, 2021b).

Gao y colaboradores sintetizaron compuestos bencenosulfonil hidrazonas unidas a un anillo heterocíclico. Estos, (figura 10) se probaron contra diferentes cepas de hongos como *Alternaria solani*, *Valsa mali*, *Fusarium solani*, *Fusarium graminearum*, *Glomerella cingulata*, *Botrytis cinerea* y *Phytophthora capsici* y teniendo a himexazol como compuesto de control. Estos compuestos probados inhibieron el crecimiento de los hongos en diferentes grados, pero la mayor actividad antifúngica fue a una concentración de 100 µg/mL (Gao *et al*, 2015).

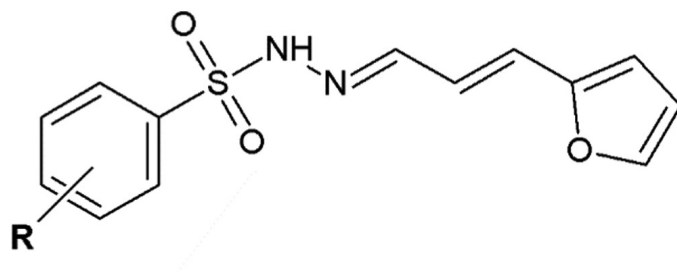


Figura 10. Compuesto bencenosulfonilhidrazona que inhibió el crecimiento de cepas fúngicas (Popiolek, 2021a).

Zhou y colaboradores estudiaron sobre las propiedades de las hidrazonas obtenidas específicamente del ácido deshidroabiético, demostraron que tienen propiedades antimicrobianas conocidas. Se comprobó la actividad antimicrobiana contra cepas como *S. aureus*, *E. coli* y *B. subtilis* y tomando al cloranfenicol como sustancia de referencia, obteniendo un derivado con propiedades antibacterianas más fuertes (figura 11) (Zhou *et al*, 2019).

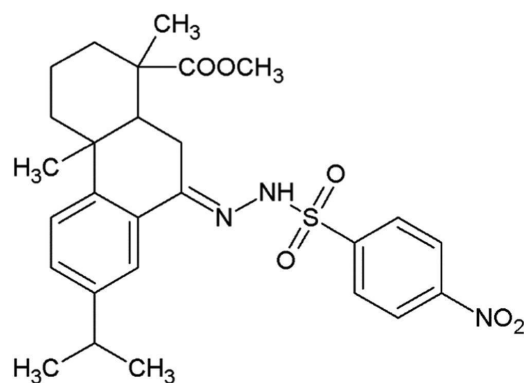


Figura 11. Derivado de hidrazona con propiedades antibacterianas fuertes (Popiolek, 2021a).

Resistencia antimicrobiana

Se le llama resistencia antimicrobiana a la capacidad de un microorganismo para evadir los efectos dados por los antimicrobianos. Se da este fenómeno ya sea por una característica inherente el mismo microorganismo o ya sea una capacidad adquirida durante el proceso infeccioso. Según datos dados por la Organización de las Naciones Unidas (ONU), esta problemática es una de las principales amenazas de la salud, debido que, pone en peligro prioridades a nivel global como lo es el desarrollo humano (Giono *et al*, 2020). Los principales factores que contribuyen a la aparición de resistencia a los antimicrobianos en microorganismos incluyen la exposición a estos medicamentos, la falta de acceso a agua potable, saneamiento e higiene adecuada, la insuficiente prevención y control de infecciones en los centros de atención médica, el acceso limitado a medicamentos, vacunas y pruebas diagnósticas de calidad garantizada (incluyendo nuevos y existentes antimicrobianos esenciales), la falta de conciencia y conocimiento y la falta de aplicación de legislación en ese ámbito (Hamers *et al*, 2023).

Actualmente, el problema de la resistencia a los antimicrobianos ha empeorado considerablemente, especialmente entre las bacterias gramnegativas, manejando mecanismos como la resistencia a las cefalosporinas de amplio espectro causada por las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y las plasmídicas de tipo AmpC, la resistencia a las fluoroquinolonas causadas por mutaciones en las topoisomerasas o genes plasmídicos tipo *qnr*, y la resistencia a los aminoglucósidos por enzimas modificantes, se ha observado un aumento de aislamientos productores de carbapenemasas y resistencia mediada por plásmidos a antibióticos clásicos como fosfomicina o colistina (Cantón, 2017).

Otra dificultad de alto riesgo es la multiresistencia microbiana (MDR). Ésta, se ha definido como la pérdida de sensibilidad clínica a al menos 3 o más grupos antimicrobianos, que son de elección en el tratamiento de las infecciones producidas por el microorganismo (Cantón, 2017). Cuando existe una pérdida de sensibilidad a todos los antimicrobianos de al menos 2 grupos se define como extremadamente resistente (XDR) y la ausencia de opciones entre las comercializadas, se define como la pandrogoresistencia (PDR). Microbiológicamente, el incremento del aislamiento de bacterias MDR, XDR y PDR sigue un modelo definido como de “capitalismo genético”, mediante el cual las bacterias resistentes tienen mayor probabilidad de adquirir y acumular mecanismos de resistencia (Cantón, 2017).

En el caso de los antifúngicos, la resistencia puede presentarse de dos maneras distintas: intrínsecamente, cuando ciertas especies poseen una alta resistencia en sus genotipos y fenotipos salvajes; y adquirida, a menudo observada en pacientes sometidos a tratamientos prolongados con antifúngicos (Galán *et al*, 2017).

La amplia utilización de antibióticos ha llevado a la aparición de diversos microorganismos patógenos que muestran resistencia a los antimicrobianos. Durante el periodo de 2000 a 2015, hubo un aumento del 65% pasando de 21,100 millones a 34,800 millones junto con un incremento del 39% en el consumo per cápita a nivel global (Heidary *et al*, 2024). En el año 2017, la Organización Mundial de la Salud comunicó casos de la resistencia a los antibióticos, específicamente a las cefalosporinas de tercera generación, los carbapenémicos, la clindamicina e incluso al antibiótico de último recurso, la vancomicina; el aumento de la resistencia microbiana a estos antibióticos de último recurso ha llevado a la OMS a promover investigaciones adicionales para el desarrollo de nuevas moléculas antimicrobianas efectivas contra los patógenos prioritarios (Samreen *et al*, 2021). En este mismo año, también la OMS dio a conocer ciertos patógenos de mayor preocupación, siendo la resistencia a los antimicrobianos la más preocupante. Uno de estos grupos son los patógenos ESKAPE (*Enterococcus faecium* , *S. aureus* , *Klebsiella pneumoniae* , *Acinetobacter baumannii* , *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter*), que tienen resistencia documentada a oxazolidinonas , lipopéptidos , macrólidos, fluoroquinolonas, tetraciclinas , β -lactámicos, incluidos carbapenémicos , glicopéptidos y polimixinas clínicamente menos favorables (Janotto *et al*, 2023), dando pauta a una preocupación muy grande respecto al futuro de los antibióticos ya existentes.

En la actualidad la resistencia a los antibióticos se está convirtiendo en la principal causa de muerte a nivel mundial, superando otras causas de mortalidad bien conocidas (Heidary *et al*, 2024).

Agentes bacterianos

Pseudomonas aeruginosa

Bacilo gramnegativo móvil miembro de la familia *Pseudomonadaceae*, caracterizada por producir un número variable de pigmentos en medio de cultivo, siendo la más destacada, la piocianina. Cuyo compuesto de fenazina verde azulado se conoce actualmente por su actividad antimicrobiana y propiedades antitoxinas; descrita en 1882 por el químico y bacteriólogo francés Carle Gessard. Debido a su naturaleza ubicua se puede encontrar en varios tipos de ambiente, desde agua, suelo, plantas y epidermis de animales. Es considerada esta especie como bacteria aerobia facultativa debido a su capacidad para crecer en medios anaerobios (Riojas Hernández *et al*, 2021).

También caracterizado por ser parte del grupo de no fermentadores por su incapacidad para fermentar lactosa y una habilidad para utilizar las fuentes de carbono y nitrógeno para obtener energía. Debido a esta capacidad para resistir los cambios de condiciones micro ambientales diversas, así como sus mecanismos de patogenicidad propios, este microorganismo es altamente relacionado a infecciones asociadas a la atención a la salud (Riojas Hernández *et al*, 2021).

Al ser una bacteria que es encontrada comúnmente en todas partes, puede causar infecciones en entorno hospitalario, especialmente en personas con sistema inmunológico debilitados, como pacientes con cáncer, pacientes postoperatorios, quemaduras graves o aquellos infectados con el virus de la Inmunodeficiencia humana (VIH) (Thi *et al*, 2020). Los antibióticos y otros tipos de agentes antimicrobianos comunes a menudo tienen un efecto limitado debido a la capacidad de adaptación a la resistencia intrínseca a los antibióticos de *P. aeruginosa*, lo que hace un aumento en el riesgo de mortalidad (Thi *et al*, 2020).

Escherichia coli

Bacteria gramnegativa, forma parte de la familia *Enterobacteriaceae* y se encuentra en la flora intestinal de los mamíferos. La mayoría de las cepas de *E. coli* son comensales; sin embargo, algunas cepas tienen la capacidad de generar infecciones graves tanto en el intestino como en diferentes partes del cuerpo, representando un riesgo potencial para la vida tanto en humanos como animales

(Buranasinsup *et al*, 2023). Es la bacteria responsable de causar diarreas agudas en países en desarrollo, donde la falta de higiene y el acceso limitado a servicios de salud básica son comunes. Esta enfermedad afecta principalmente a niños y se estima que es responsable de aproximadamente el 10% de las muertes en menores de 5 años (Contreras *et al*, 2021).

Han sido identificados diversos tipos de *E. coli*, siendo los más frecuentes *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) y *E. coli* enteropatógena (EPEC). ETEC es responsable de una forma de diarrea acuosa y se adhiere al revestimiento del intestino delgado, produciendo toxinas que afectan los procesos de absorción y secreción intestinal. Por otro lado, EPEC causa lesiones características en el revestimiento intestinal, incluyendo la adhesión y eliminación de células, lo que conduce a la destrucción de las microvellosidades y también aparición de diarrea acuosa (Contreras *et al*, 2021).

La OMS catalogó a *E. coli* como una de las 12 bacterias que generan una creciente resistencia a los antibióticos y representan una crisis para la salud humana (Buranasinsup *et al*, 2023).

Staphylococcus aureus

Bacteria grampositiva, muestra una gran capacidad de adaptación en diferentes entornos, incluyendo la piel humana, alimentos, plantas de tratamiento residual, espacios públicos y hogares (Fang *et al*, 2024). *S. aureus*, es uno de los patógenos más graves y reconocidos en los seres humanos. Aunque algunas cepas pueden vivir en forma de comensales, otras son responsables de infecciones tanto en entornos hospitalarios como en la comunidad (Heidary *et al*, 2024)

La morbilidad asociada a las bacteriemias causadas por *S. aureus* es significativamente elevada, con tasas de mortalidad que oscilan entre el 20% y 25% (Zhang *et al*, 2023). Este microorganismo se ha convertido en un importante agente asociado con la resistencia de antibióticos y la producción de múltiples factores de virulencia. El uso indiscriminado y cada vez más frecuente de antimicrobianos ha acelerado principalmente la propagación de la resistencia (Heidary *et al*, 2024).

Agentes fúngicos

Candida albicans

Las especies de *Candida* son las responsables de grandes infecciones humanas causadas por hongos patógenos. Entre todas las especies más frecuentes de infecciones oportunistas se encuentra la

especie *Candida albicans*. Esta levadura representa un organismo fúngico ubicuo que reside en la mucosa de los seres humanos y también perteneciente a ciertos reservorios ambientales; La presencia de *C. albicans* en humanos es casi siempre asintomático, cuya enfermedad suele surgir cuando existe algún cambio brusco de la homeostasis del huésped y/o de la microbiota de tipo endógena (Lopes & Lionakis, 2022).

Las infecciones dadas por hongos causan alrededor de 1,7 millones de muerte al año en todo el mundo, afectando principalmente a personas inmunocomprometidas o con dos o más afecciones patológicas, la misma incidencia de estas afecciones causadas por *C. albicans* han aumentado de manera constante desde la década de 1970, esto debido posiblemente a el mayor riesgo de infecciones oportunistas, además de la mejora en los procedimientos clínicos que identifican hongos que causan infecciones nosocomiales, así como el desarrollo de resistencia a los antifúngicos debido a una exposición prolongada al tratamiento (Macias *et al*, 2023).

Cryptococcus neoformans

Cryptococcus es un tipo de levadura con cápsula que se caracteriza por su reproducción mediante gemación de base estrecha. Esta levadura suele afectar principalmente a personas con sistemas inmunológicos debilitados, como aquellos que tienen Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH)/ Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), personas que han recibido trasplantes de órganos sólidos, pacientes con enfermedad renal crónica, cirrosis descompensada, diabetes, utilizan esteroides de manera prolongada u otras formas de inmunodeficiencia. Las infecciones por *Cryptococcus* son fúngicas y suelen ser agresivas en estos pacientes vulnerables (Kim *et al*, 2023).

La meningitis criptocócica es una enfermedad potencialmente mortal en ausencia de un tratamiento efectivo. El tratamiento estándar implica utilizar anfotericina B en combinación con flucitosina durante un ciclo breve, seguido de una monoterapia de consolidación con fluconazol. Sin embargo, se ha observado que hasta el 60% de los pacientes experimentan recaídas en los casos de meningitis. Además, en estos casos, es común la detección de resistencia al fluconazol, marcando un problema a la salud comunitaria por la presencia de resistencia a antimicrobianos (Zafar *et al*, 2019).

Aspergillus niger

El género *Aspergillus* es conformado por un grupo grande de especies ordenados de forma ubicua; a pesar de ser microorganismos saprófitos, estos hongos causan infecciones tanto en pacientes

inmunocomprometidos e inmunocompetentes con un amplio espectro de localizaciones que van desde infecciones pulmonares hasta oculares, diseminadas o sistémicas (Galán *et al*, 2017).

A. niger es un microorganismo patógeno humano oportunista causante de infecciones que provocan una importante morbilidad y mortalidad, incluso alcanzando una tasa de mortalidad del 75 %; además, es asociado con otomicosis, infecciones cutáneas, infecciones invasivas en recién nacidos y fungemia nosocomial (Brito *et al*, 2023).

Penicillium digitatum

El género *Penicillium* es un grupo muy amplio y diverso, se encuentran distribuidos de manera ubicua en la tierra de amplios hábitats, incluyendo plantas, suelo, aire, alimentos y varios entornos extremos (Mingshuang *et al*, 2021).

P. digitatum, es un hongo saprófito común en el suelo, materiales vegetales de los huertos y materia orgánica empacadora de los cítricos, además, puede producir una gran cantidad de esporas asexuales para prosperar (Mingshuang *et al*, 2021). Este hongo, es causante del moho verde y de hasta el 90% de la pérdida poscosecha de cítricos (Mingshuang *et al*, 2021)

MARCO DE REFERENCIA

Heidary y colaboradores, se enfocaron en la detección de quórum, el encargado en la regulación de los factores de virulencia en *P. aeruginosa* y la coordinación de la patogenicidad bacteriana; determinaron la concentración mínima inhibitoria de lactohidrazona a *Pseudomonas aeruginosa* mediante la prueba de microdilución en caldo y se determinó el efecto de las concentraciones subinhibitorias de este compuesto sobre los factores de virulencia. Estos cultivos tratados en presencia del compuesto orgánico en concentraciones subinhibitorias mostraron una inhibición significativa de los factores de virulencia, incluida la mortalidad, formación de biopelículas, producción de alginato y piocianina y susceptibilidad de H₂O₂. Dando como resultados que el sistema de detección de quórum en *Pseudomonas aeruginosa* puede ser un objetivo importante para la intervención farmacológica. (Heridary *et al*, 2017).

Popiolek Lukasz y colaboradores publicaron la síntesis y evaluación antimicrobiana *in vitro* de una nueva serie de hidrazonas obtenidas del ácido 5-nitrofurano-2-carboxílico en donde identificaron y caracterizaron nuevos compuestos mediante métodos espectrales (¹H NMR y ¹³C NMR). Teniendo como resultado que, todas sus hidrazonas probaron ser agentes antimicrobianos prometedores mediante concentración mínima inhibitoria (CMI). Esta actividad antimicrobiana de los nuevos derivados del ácido 5-nitrofurano-2-carboxílico resultaron en muchos casos con una actividad superior a las sustancias de referencia nitrofurantoína, cefuroxima y ampicilina. Se concluyó que estos compuestos pueden considerarse como agentes antimicrobianos prometedores, aplicando específicamente a las hidrazonas del ácido 5-nitrofurano-2-carboxílico con cadenas alquílicas cortas y fenilo sustituido con halógeno en la posición *orto*, especialmente con átomo de yodo (Popiolek *et al*, 2020).

Por su parte, Polović y colaboradores, analizaron las aroilhidrazonas para detectar actividades antimicrobianas y antibiopelículas *in vitro*. En donde, algunos de sus compuestos mostraron valores significativos de CMI frente a algunos agentes bacterianos, como *Escherichia coli*, con valores de CMI (en $\mu\text{mol mL}^{-1}$) de 0,18-0,23, 0,11-0,20, 0,16-0,17 y 0,35-0,37; en otros casos, mostraron actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, con los valores de CMI más bajos de 0,005-0,2, 0,05-0,12, 0,06-0,48 y 0,17-0,99 $\mu\text{mol mL}^{-1}$ (Polović *et al*, 2019).

Por otro lado, Dascalu y colaboradores evaluaron la actividad inhibidora de 28 compuestos nuevos que eran producto de la mezcla de una hidrazona con un anillo pirrolidona, cuya investigación fue frente a un gran panel de cepas de hongos y analizaron las relaciones estructura-actividad, obteniendo resultados como que las piroglutamilaril hidrazonas, en especial las aromáticas, exhibieron una buena actividad y unas adecuadas propiedades “similares a fungicidas” libres de citotoxicidad; además que, el conector -NH-NH- demostró ser esencial para mantener el potencial antifúngico (Dascalu *et al*, 2020).

De la cruz y colaboradores, obtuvieron seis derivados de hidrazonas empleando la 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4-DNPH) y algunas cetonas como: fluorenona, benzofenona y benzofenonas sustituidas. En el desarrollo de la síntesis aplicaron los principios número dos y cinco de química verde. Las benzofenonas sustituidas fueron obtenidas mediante la oxidación de los respectivos alcoholes para la obtención de las benzofenonas y fluorenonas. Las moléculas se caracterizaron por Resonancia Magnética Nuclear de protón (RMN-1H) y espectroscopía de infrarrojo de reflectancia total atenuada (IR-ATR) entre otras técnicas. Realizaron la evaluación de la actividad antimicrobiana mediante el método Kirby-Bauer. Los resultados mostraron que algunas de sus hidrazonas sustituidas presentaron una actividad inhibitoria mayor frente *Candida albicans* y *Aspergillus niger* en comparación con cicloheximida al 1%, pero considerablemente son menos efectivos que ketoconazoles utilizados como control (De La Cruz *et al*, 2022). Cabe mencionar que, en este trabajo de tesis se realizó una metodología diferente a la empleada por estos últimos autores.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad, es bien conocido que una de las principales amenazas para la salud mundial es la resistencia a los antimicrobianos por lo cual, se han incrementado las infecciones en las personas lo que involucra un desafío cada vez mayor en la población mundial. La efectividad de los antimicrobianos se está reduciendo, lo que dificulta su validez; prolongando así estancias hospitalarias, incremento de costos médicos y por ende incremento en la mortalidad de las personas. De este modo, se vuelve necesario cambiar la forma de prescribir y utilizar estos fármacos en la población, ya que, llegará el día en el que no se puedan combatir las enfermedades originadas por organismos de importancia clínica.

Por lo tanto, mediante este trabajo se pretende abrir nuevas líneas de investigación para el desarrollo y evaluación de moléculas biológicamente activas como potenciales fármacos que eviten que esta amenaza prevalezca, por ello surge la interrogante si ¿será posible que un compuesto como la benzofenona 2,4-dinitrofenilhidrazona sirva como agente antimicrobiano frente a agentes bacterianos y fúngicos?

JUSTIFICACIÓN

De acuerdo con datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Resistencia de los Antimicrobianos (RAM) es una amenaza mundial para la salud pública y el desarrollo, además, se estima que la RAM bacteriana fue directamente responsable de 1,27 millones de muertes mundialmente en 2019 y fue partícipe de 4,95 millones de muertes (OMS, 2023). Actualmente, el ritmo de desarrollo y propagación de resistencia a los antibióticos ha aumentado, provocando así la aparición de las ahora denominadas “superbacterias”; las cuales son difíciles o imposibles de tratar con los medicamentos ya existentes como en el caso de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) o las enterobacterias productoras de carbapenemasas (CBPs) (Laiglesia *et al*, 2022). Por otro lado, los patógenos fúngicos también constituyen una amenaza importante para la salud pública, ya que son cada vez más comunes y resistentes a tratamientos. Actualmente solo se dispone de cuatro medicamentos antimicóticos y pocos candidatos en fase de desarrollo clínico, para la mayoría de los patógenos fúngicos, no se dispone de pruebas diagnósticas rápidas y sensibles, además, las que existen no están disponibles de forma generalizada o no son asequibles a nivel mundial (OMS, 2022). Debido a esto, la resistencia microbiana va en aumento y no se están generando nuevos fármacos para combatir a los microorganismos de importancia clínica, representa una gran crisis y emergencia para la salud a nivel mundial, por esto, se plantea la evaluación en retos microbianos de la benzofenona 2,4- dinitrofenilhidrazona con la finalidad de establecer su actividad antimicrobiana y antifúngica frente a bacterias, hongos y levaduras.

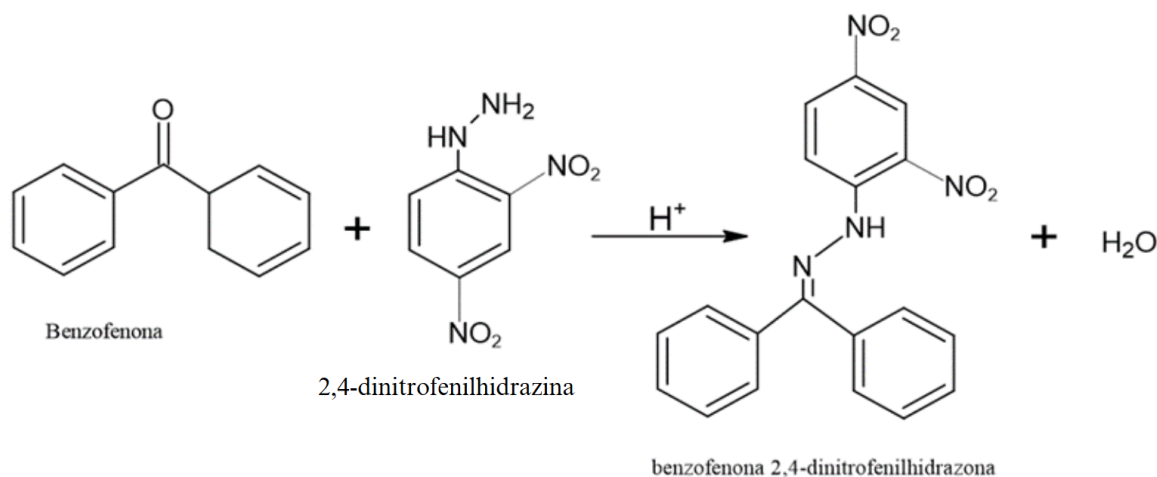
OBJETIVOS

General

Sintetizar, caracterizar y determinar la actividad antimicrobiana de la benzofenona 2,4-dinitrofenilhidrazona frente a bacterias, levaduras y hongos filamentosos.

Específicos

1. Realizar la síntesis de la benzofenona 2,4-dinitrofenilhidrazona utilizando los recursos y metodologías propuestas por Ponce Yarce (2022) y García Hernández *et al.* (2023).



2. Caracterizar el compuesto obtenido por técnicas espectroscópicas como IR, RMN de 1H y ^{13}C . Además de espectrometría de masas.
3. Determinar la actividad antimicrobiana frente a bacterias, levaduras y hongos filamentosos.

HIPÓTESIS

La benzofenona posee una amplia gama de bioactividades como antimicrobianas, antifúngicas y anticancerígenas (Khan et al, 2024). Así como se ha obtenido evidencia y resultados que los compuestos tipo hidrazona experimentaron ser agentes microbianos prometedores mediante la

prueba de concentración mínima inhibitoria (Popiolek *et al*, 2020). Por lo que la hidrazona obtenida presenta actividad antimicrobiana frente a bacterias, hongos y levaduras inhibiendo su crecimiento.

MATERIALES Y METODOLOGÍA

Parte I. Síntesis y caracterización de benzofenona 2,4-dinitrofenilhidrazona

El material y equipo que se utilizó, así como los reactivos y disolventes se encuentran especificados en el contenido de la tabla 1.

Tabla 1. Material y equipo utilizado para la síntesis y caracterización del compuesto tipo hidrazona.

Reactivos, disolventes y otros insumos	Material de vidrio	Equipo
Benzofenona al 99% 2,4-dinitrofenilhidrazina al 97% HCl fumante al 37% Etanol Placas de TLC	Matraz esférico de 100 mL Vasos de precipitado de 50 mL Matraz erlenmeyer de 125 mL Embudo provisto con papel filtro	Manta de calentamiento Sistema de reflujo Campana de extracción Lámpara de luz UV Fusiómetro Espectrómetro de masas Espectro de infrarrojo Varian de 300 MHz y Bruker de 500 MHz. (RMN ^{13}C y ^1H)

A continuación, se observa la reacción para la obtención de la benzofenona 2,4-dinitrofenilhidrazona (compuesto 1).

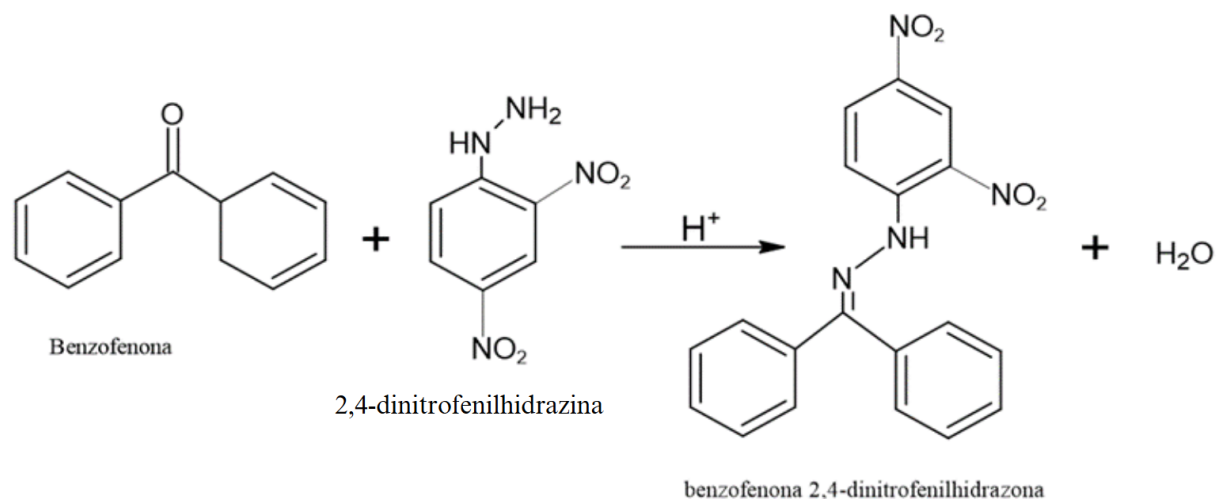


Figura 12. Mecanismo de reacción para la obtención de benzofenona 2,4-dinitrofenilhidrazona.

Síntesis de la hidrazona

La síntesis del compuesto 1 se llevó a cabo en medio ácido en un matraz esférico provisto de una barra magnética al cual se le agregaron 0.5439 g de 2,4-dinitrofenilhidrazina y 65 ml de etanol como disolvente de reacción. Posteriormente se adicionó gota a gota 0.5009 g benzofenona previamente disuelta en 10 ml de etanol (figura 13). La reacción se dejó con ligero calentamiento a reflujo por 24 horas y se monitoreó por cromatografía en capa fina (figura 14).



Figura 13. Adición de la benzofenona a la 2,4-dinitrofenilhidrazina con etanol.

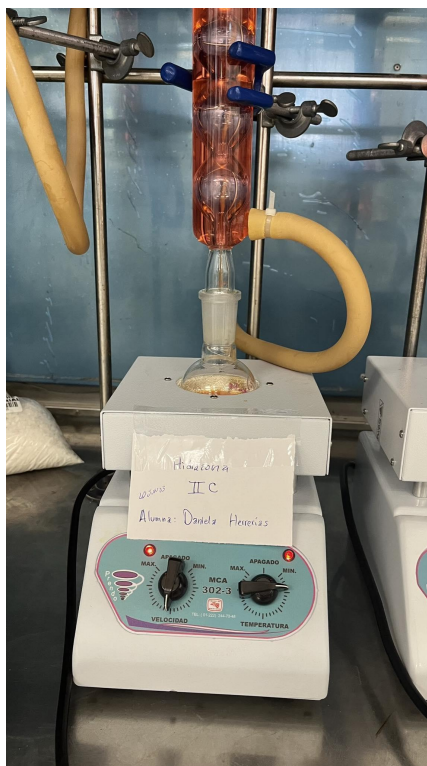


Figura 14. Reacción a reflujo por 24 horas.

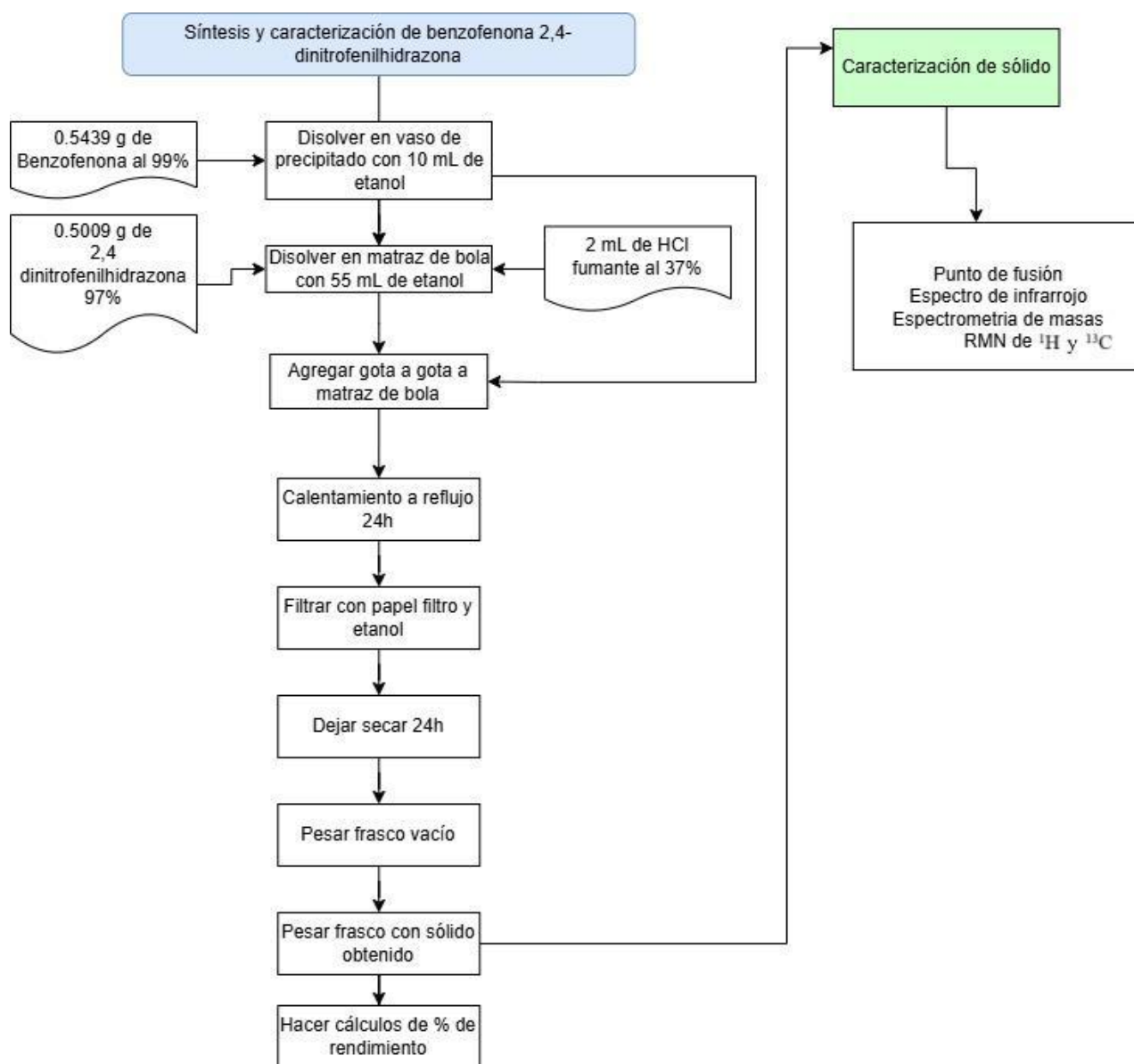
Transcurridas las 24 horas, con ayuda de etanol y un papel filtro, se obtuvo todo el sólido resultante de la reacción, se dejó secar por 24 h (figura 15).



Figura 15. Proceso de filtración de sólido obtenido.

Al tener el sólido perfectamente seco, se recolectó en el frasco con ayuda de una espátula teniendo, cuidado de que no se perdiera producto. Posteriormente se realizaron los cálculos de rendimiento.

En cuanto a la caracterización del producto obtenido se hicieron las pruebas mencionadas en el siguiente diagrama de trabajo (esquema 1).



Esquema 1. Diagrama de trabajo de síntesis y caracterización del compuesto 1.

Caracterización de la hidrazona

La reacción se monitoreó por medio de cromatografía en capa fina (TLC) en una mezcla 9:1 hexano/acetato de etilo, empleando cromatoplasmas analíticas TLC Silica Gel 60 F254 Aluminium sheets 20x20 de la marca Merck, aplicando para su revelado una lámpara de luz UV de 254 nm.

Los puntos de fusión fueron determinados con un aparato para punto de fusión Fisher-Johns en grados celsius, sin corregir.

Se llevó a cabo la caracterización mediante espectrometría de masas utilizando el método de ionización de impacto electrónico (IE), en un rango de lectura m/z de 0 a 800, utilizando un espectrómetro de masas de marca JEOL modelo JMS-700. Los espectros de masa fueron obtenidos con una energía de ionización de 70 eV a una temperatura de 250 ° C en la cámara de ionización.

Los espectros de infrarrojo se realizaron con equipo ATR Perkin Elmer de 450 a 4000 cm^{-1} .

Los espectros de RMN de ^1H y de ^{13}C se obtuvieron en equipos Varian de 300 MHz y Bruker de 500 MHz. Todos los experimentos se realizaron usando tetrametilsilano (TMS) como referencia interna y acetonitrilo (CD_3CN) como disolvente. Los desplazamientos químicos se expresan en ppm (δ), las constantes de acoplamiento en Hz (J) y la multiplicidad de las señales de ^1H es indicada con las siguientes abreviaturas: s=simple, d=doble, dd=doble de dobles, t-triple, td-triple dobleteada, m=múltiple y sa=señal ancha.

Parte II. Retos microbianos

Cepas microbianas

Se seleccionaron las siguientes cepas microbianas para probar la actividad antimicrobiana de la hidrazona por su relevancia clínica respecto a la resistencia antimicrobiana.

- *Candida albicans*
- *Candida glabrata*
- *Cryptococcus neoformans*
- *Penicillium digitatum*
- *Aspergillus niger*
- *Escherichia coli*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Staphylococcus aureus*

El material, equipo y reactivos utilizados, así como los reactivos y solventes se encuentran en la tabla 2.

Tabla 2. Material y equipo utilizado para las pruebas de concentración mínima inhibitoria de las cepas microbiológicas.

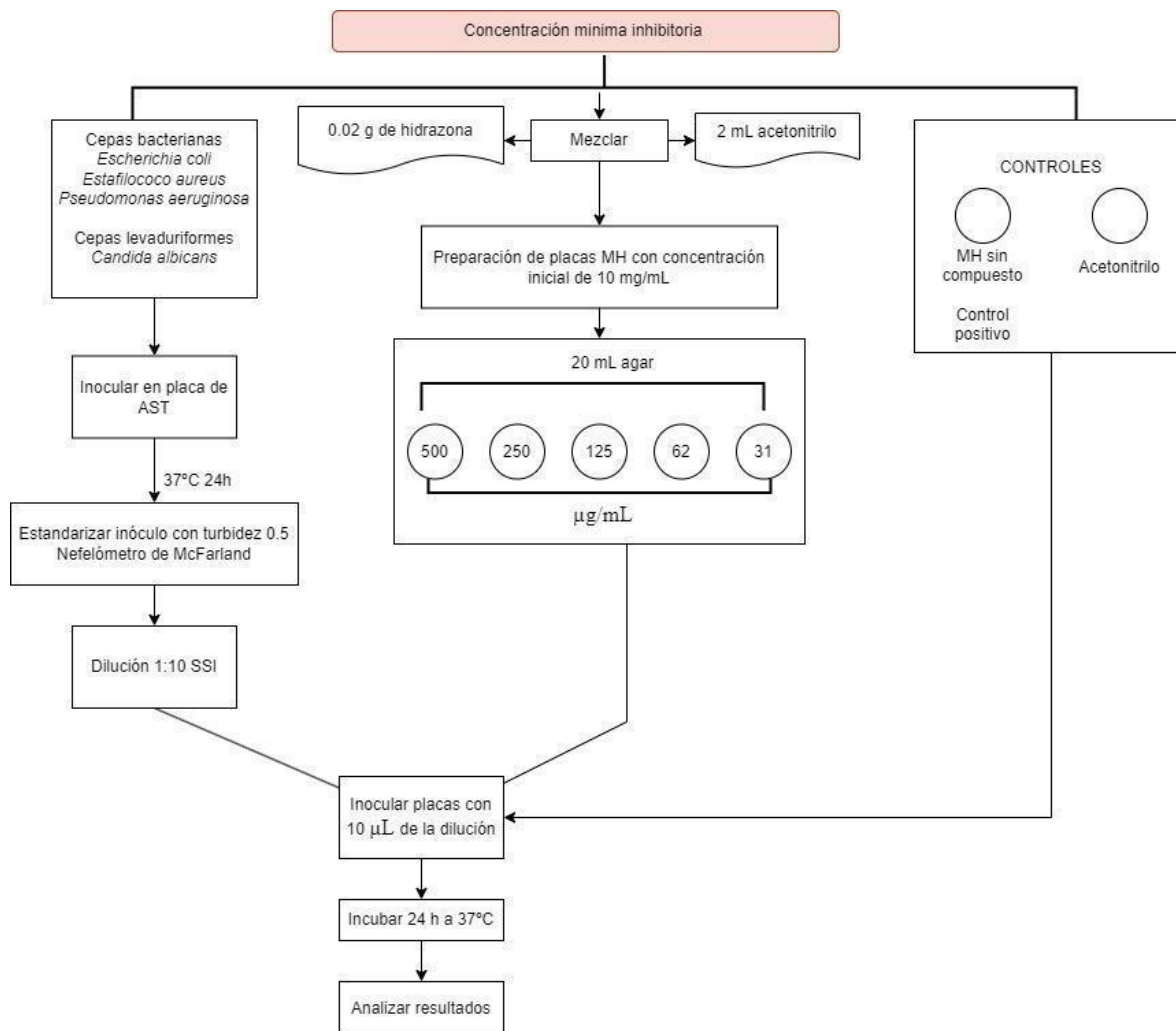
Reactivos y disolventes	Material de laboratorio	Equipo
Acetonitrilo Dimetilsulfóxido (DMSO) Benzofenona 99% 2,4-dinitrofenilhidrazina 97% Agar soya tripticaseina (AST) Agar dextrosa sabouraud (ADS) Agar Mueller Hinton (MH) Caldo Mueller Hinton (CMH) Solución Salina Isotónica (SSI)	Puntas para micropipetas Gradilla Tubos de ensayo Tubos eppendorf Matraz de vidrio Cajas petri estériles (100 x 15 mm y 60 x 15 mm) Tubo cónico (20 mL y 10 mL) Asa bacteriológica Asa micológica Placa con pozos Puntas de 10-100 µL cortadas por un poco más de la mitad	Autoclave Estándares de turbidez de McFarland Incubadora Mechero Bunsen Vortex

Concentración mínima inhibitoria en placa

Se utilizaron las cepas *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Candida albicans*, de 24 h de crecimiento a 37°C en agar soya tripticaseína. Se pesó 0.02 g del compuesto 1 y se agregaron 2 mL de diluyente acetonitrilo para tener una concentración de 10 mg/mL de la hidrazona de estudio. Se tomó 1 mL de esa primera concentración y se colocó en la placa Petri estéril, se agregaron 20 mL de agar MH, se mezclaron realizando 6 movimientos circulares en sentido horario y 6 contra horario, así como 6 movimientos verticales y 6 horizontales cuidando que el agar no tocara la tapa obteniendo una concentración de 500 µg/mL y se dejó en una superficie plana y limpia para gelificar; posteriormente, se tomó 1 mL de acetonitrilo y se agregó a la concentración de 10 mg/mL del compuesto 1 con el fin de diluir 1:2, de esta última se tomó 1 mL, se colocó en una placa petri estéril y se le agregaron 20 mL de agar MH para tener una concentración en la placa de 250 µg/mL. Este procedimiento se realizó tres veces más para tener placas de Muller Hinton con concentraciones de 125 µg/mL, 62 µg/mL y 31 µg/mL. Se realizaron dos controles, uno positivo que consistió en una placa con 20 mL de agar MH que se inoculó con las bacterias y la levadura de estudio para ver su viabilidad, y otra placa con 20 mL de agar y 1 mL de diluyente, para evaluar la actividad del diluyente sobre el crecimiento de los microorganismos.

Para preparar los inóculos microbianos se hicieron suspensiones de cada cepa en SSI al 0.5 del Nefelómetro de Mac Farland, posteriormente se hizo una dilución 1:10 de cada suspensión y de ésta se tomaron 10 µL para colocarlos en la placa, se realizó por triplicado. Las placas se incubaron 24 h a 37°C.

En el caso de *Candida albicans* se repitió la misma metodología anterior, comenzando con una concentración de hidrazona de 50 mg/mL (esquema 2).



Esquema 2. Diagrama de trabajo para prueba de concentración mínima inhibitoria en cepas bacterianas.

Concentración mínima inhibitoria en placa con hongos filamentosos

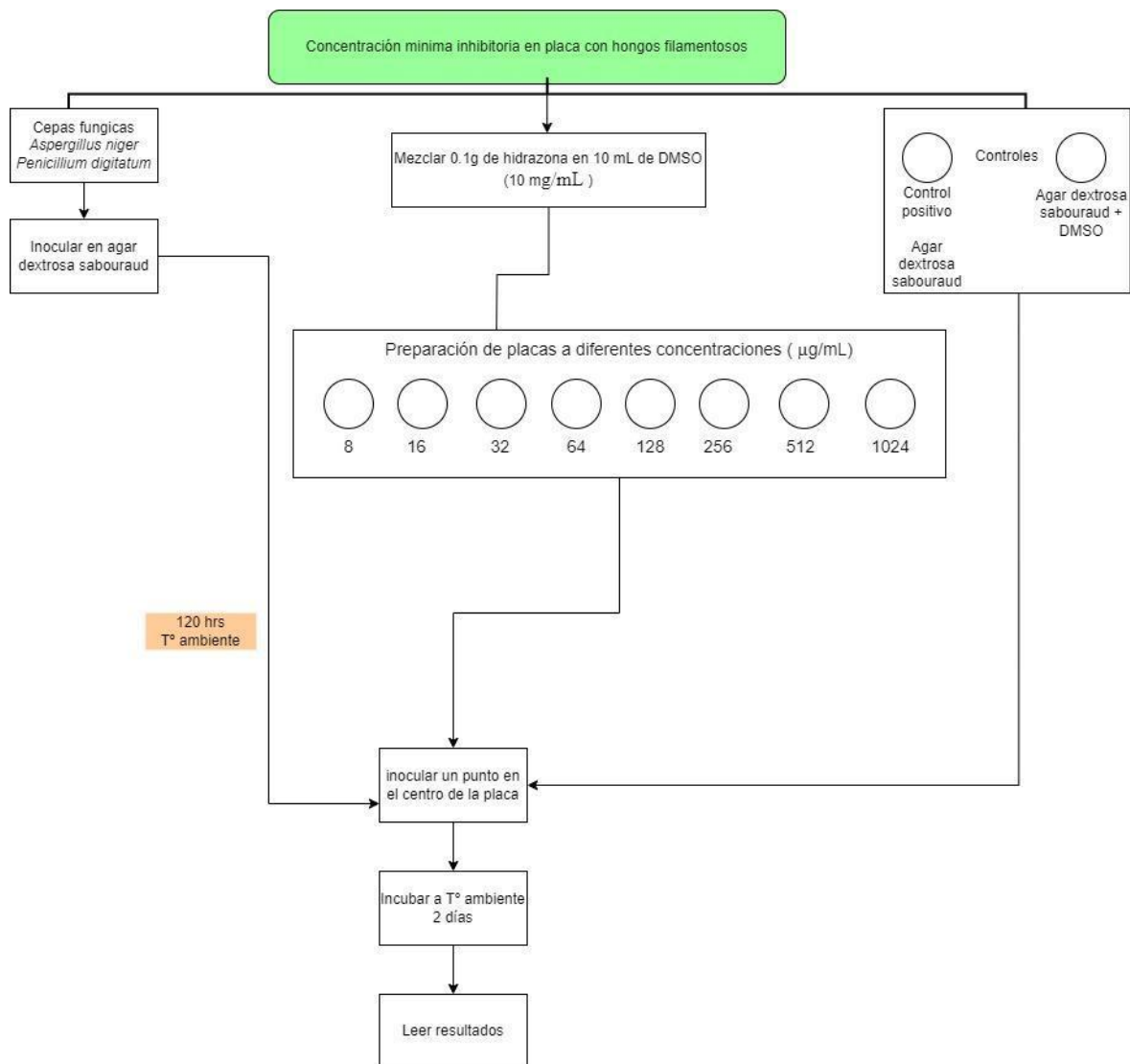
En zona de esterilidad se sembraron las cepas de *Aspergillus niger* y *Penicillium digitatum* en tubos de rosca con agar dextrosa sabouraud por la técnica de puntos y se incubaron por 5 días a temperatura ambiente.

Se pesó 0.1 g del compuesto 1 en 10 mL de diluyente DMSO para tener una concentración inicial de 10 mg/mL, se mezcló con ayuda del vortex hasta conseguir una mezcla lo más homogénea posible. En una primera placa se colocaron 16 µL de esta mezcla de hidrazona con DMSO y se adicionaron 20 mL de agar soya tripticaseína, para conseguir una primera concentración de 8 µg/mL en la siguiente placa se tomaron 32 µL para duplicar la concentración y así sucesivamente (tabla 3).

Tabla 3. Concentraciones obtenidas de hidrazona con DMSO en placas de agar dextrosa Sabouraud.

Mezcla de compuesto 1 y DMSO con concentración inicial de 10 mg/mL	Agar (mL)	Concentración final de compuesto 1 en el medio de cultivo (µg/mL)
16 µL	19.984	8
32 µL	19.968	16
64 µL	19.936	32
128 µL	19.872	64
256 µL	19.744	128
512 µL	19.488	256
1024 µL	18.976	512
2048 µL	17.952	1024

Se anexaron dos placas más, la primera solo con agar dextrosa sabouraud que representó el control positivo y una segunda placa con 1 mL de DMSO y agar dextrosa sabouraud con el fin de saber si el diluyente presentaba algún efecto sobre el hongo. Al gelificar, se inocularon los hongos de estudio con la técnica de punto. Se monitoreó el crecimiento de los hongos dos días a temperatura ambiente (esquema 3).



Esquema 3. Diagrama de trabajo para prueba de concentración mínima inhibitoria en hongos filamentosos.

Concentración mínima inhibitoria microdiluciones en placa

Para la realización de esta prueba, se enfrentaron cepas bacterianas: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. Y cepas levaduriformes: *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*. Los inóculos se estandarizaron a 0.5 de acuerdo con el nefelómetro de MacFarland y se hizo una dilución 1:10 de cada suspensión. Se pesaron 0.01 g de compuesto 1 y se mezcló con 1 mL de DMSO, obteniendo una concentración de 10 mg/mL.

La distribución para la realización de las diluciones seriadas y la inoculación bacteriana se realizó de la siguiente manera:

En la **fila A** de la placa, se colocaron 4 controles que demostraron la ausencia de contaminación correspondientes a:

Pozo A1. Caldo MH

Pozo A2. Caldo MH y DMSO

Pozo A3. DMSO

pozo A4. Compuesto 1 con DMSO

Las filas **C, D, F, G y H** correspondieron a las cepas probadas:

Fila C: *C. albicans*

Fila D: *C. neoformans*

Fila F: *P. aeruginosa*

Fila G: *E. coli*

Fila H: *S. aureus*

Se colocó en el **pozo 1** de la fila **C1**, 300 μ L de caldo MH correspondiente al control positivo de crecimiento. En el **pozo 2** de la fila **C2** se colocaron 150 μ L de caldo y 150 μ L de DMSO con el fin de saber el efecto del diluyente sobre el crecimiento microbiano. En el **pozo 3** de la fila **C3**, se agregaron 270 μ L de caldo y en los siguientes pozos 150 μ L de caldo. Posteriormente, en el pozo **C3** se anexaron 30 μ L de la mezcla del compuesto 1 (10 mg/mL), para tener una concentración de 1024 μ g/ μ L. De este pozo se tomaron 150 μ L y se colocaron en el pozo **C4** para obtener una concentración de 512 μ g/ μ L, y así sucesivamente hasta llegar a una concentración de 2 μ g/ μ L (figura 16). Se repitió el procedimiento para todas las filas.

Al tener las diluciones, se inoculó cada pozo con 10 μ L de la suspensión microbiana en cada fila correspondiente.

La placa se incubó a 37°C/24 h. Posterior a la incubación se tomó una asada de cada pozo y se inoculó en AST para corroborar el crecimiento microbiano (esquema 4).

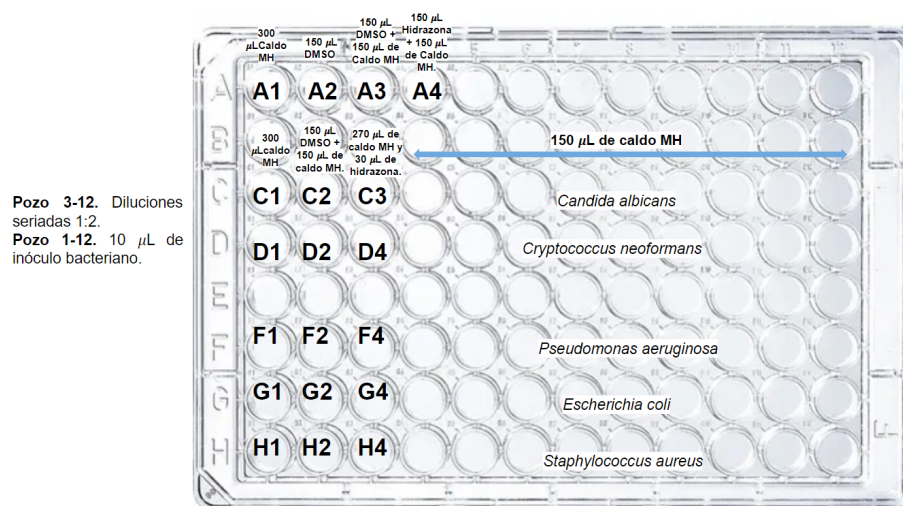
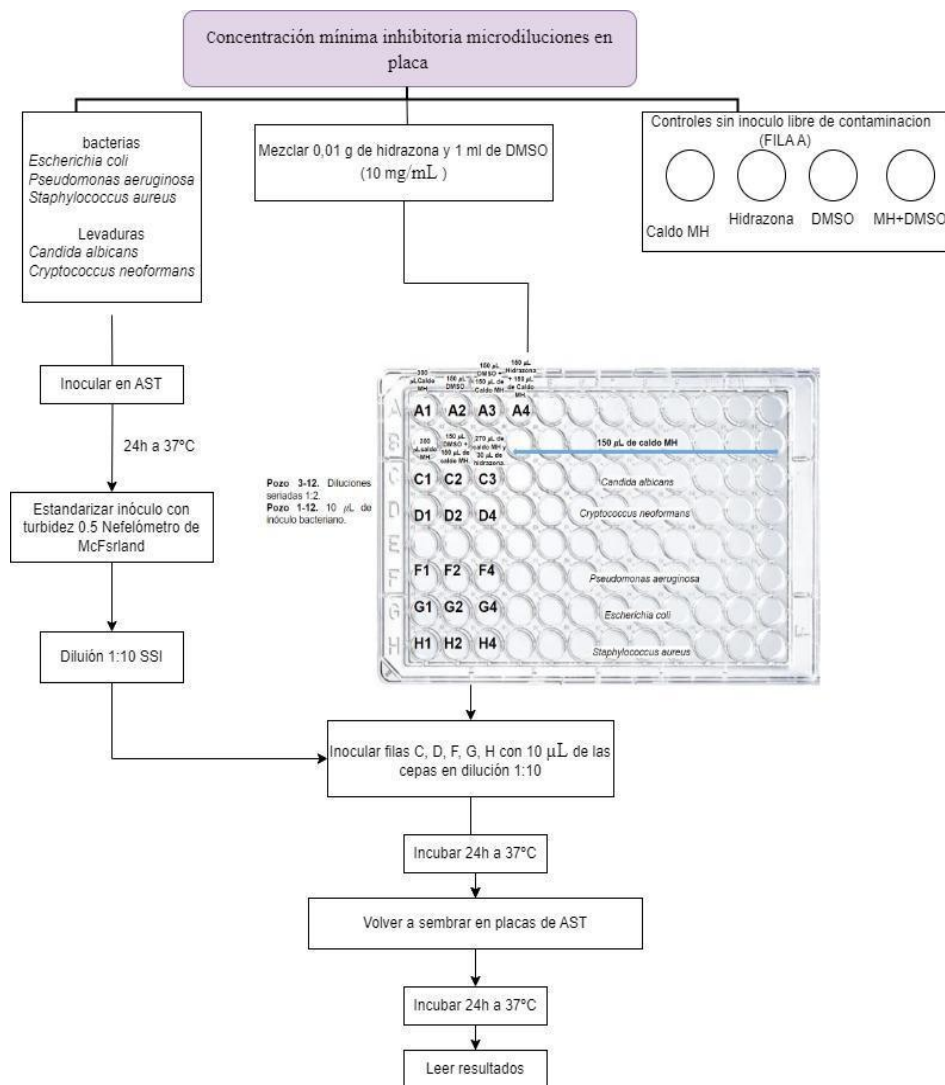


Figura 16. Representación esquemática del procedimiento de micro diluciones en microplaca.



Esquema 4. Diagrama de trabajo para prueba de concentración mínima inhibitoria en microdiluciones.

Prueba de contacto directo

Se prepararon placas de agar MH con pozos, para esto se colocó en una placa de petri estéril una primera capa de agar en zona de esterilidad y se dejó gelificar. De igual forma en zona de esterilidad, con ayuda de una pinza previamente flameada en el mechero se colocaron 4 puntas de 10-100 μ L cortadas por un poco más de la mitad con la parte del soporte de la punta tocando ligeramente el agar evitando que se entierre en él, manteniendo una separación considerable entre cada punta (figura 17). Al tener las puntas en las cajas petri, se colocó la segunda capa de agar y se dejaron gelificar, para posteriormente con las mismas pinzas retirar cada una de las puntas evitando romper los pozos (figura 18).

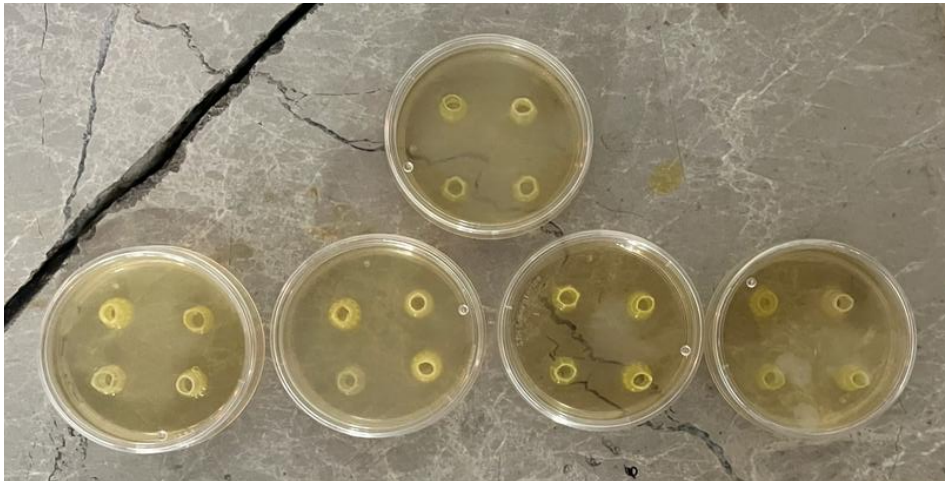


Figura 17. Muestra de la colocación de puntas en espera de gelificación en agar para la creación de pozos.

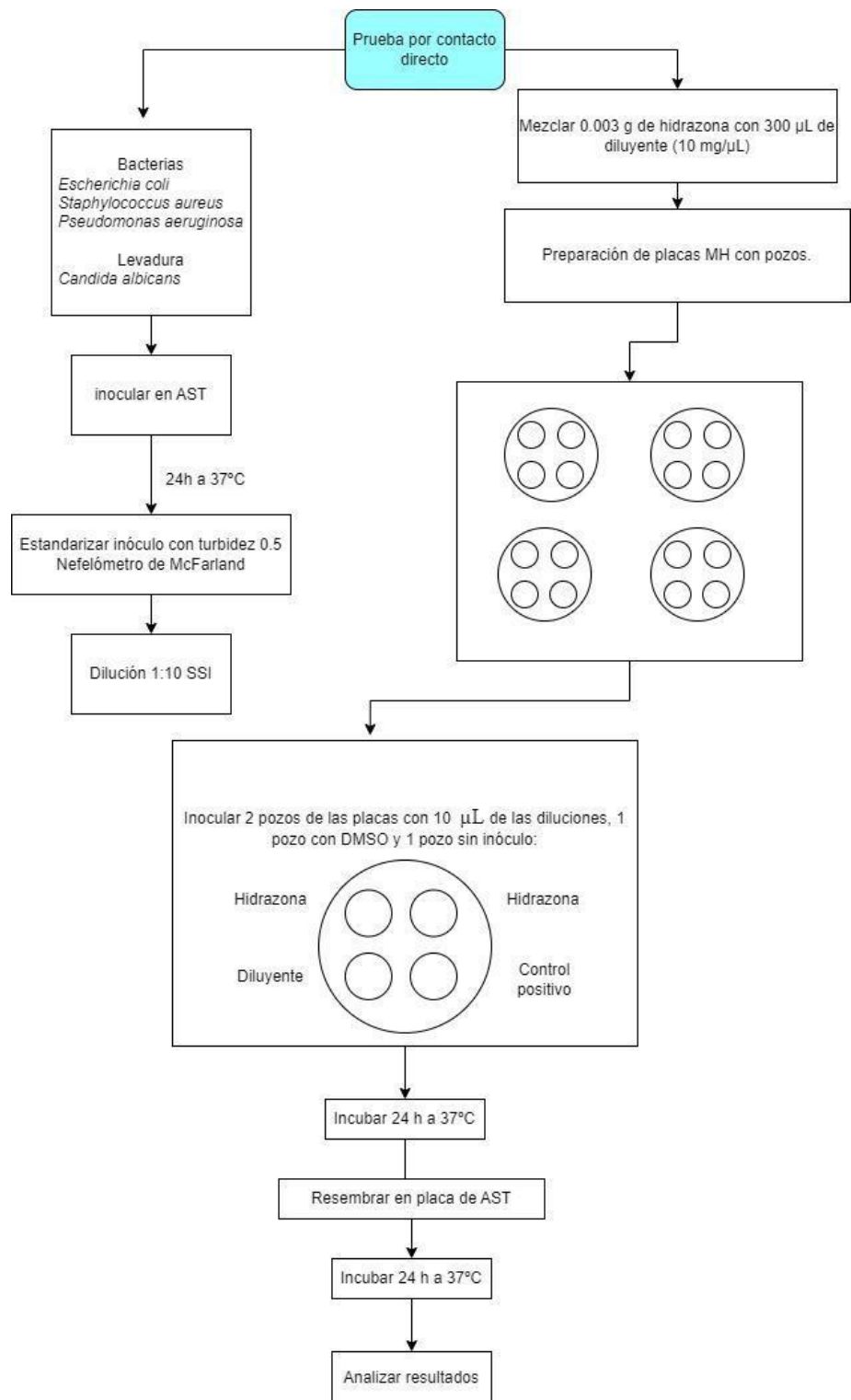


Figura 18. Pozos obtenidos en agar Mueller Hinton y agar nutritivo.

Se estandarizaron los inóculos de las cepas a 0.5 de turbidez con ayuda del nefelómetro de McFarland; con hisopos estériles se tomaron muestras del inóculo y se realizaron las siembras masivas correspondientes para cada cepa en las placas de MH en tres direcciones diferentes y girando el hisopo dentro de cada uno de los pozos en las placas.

Se pesó 3 mg de compuesto 1 y se mezclaron con 300 μ L de diluyente DMSO para tener una concentración de 10 mg/mL y se colocaron 10 μ L en dos de los cuatro pozos presentes en cada caja petri (concentración de hidrazona por pozo de 100 μ g/mL) con medio de cultivo inoculado previamente con cada una de las cepas. En uno de los pozos restantes se colocaron 10 μ L de diluyente y en el último pozo no se agregó nada representando el control positivo. Se dejó secar el compuesto 1 en cada pozo y se incubaron por 24 h a 37 °C.

Para corroborar el crecimiento en cada pozo, se tomó una asada del centro del pozo y se inoculó en una placa de AST, se incubaron por 24 h a 37°C y se leyeron resultados (esquema 5).



Esquema 5. Diagrama de trabajo para la prueba de contacto directo.

RESULTADOS

Parte I. Síntesis y caracterización de benzofenona 2,4-dinitrofenilhidrazona

Se obtuvo el producto como un sólido cristalino de color naranja (figura 19).

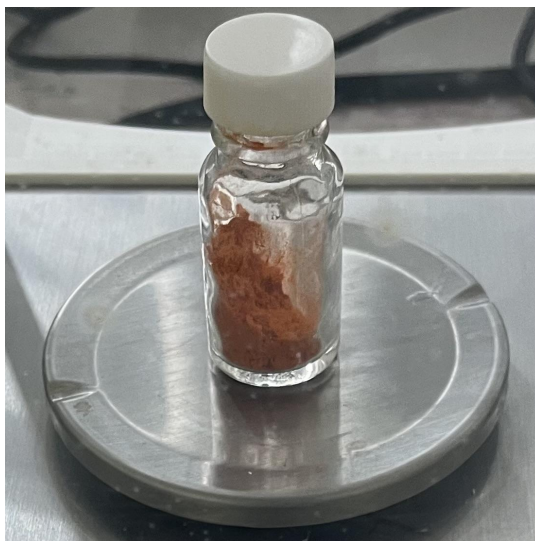


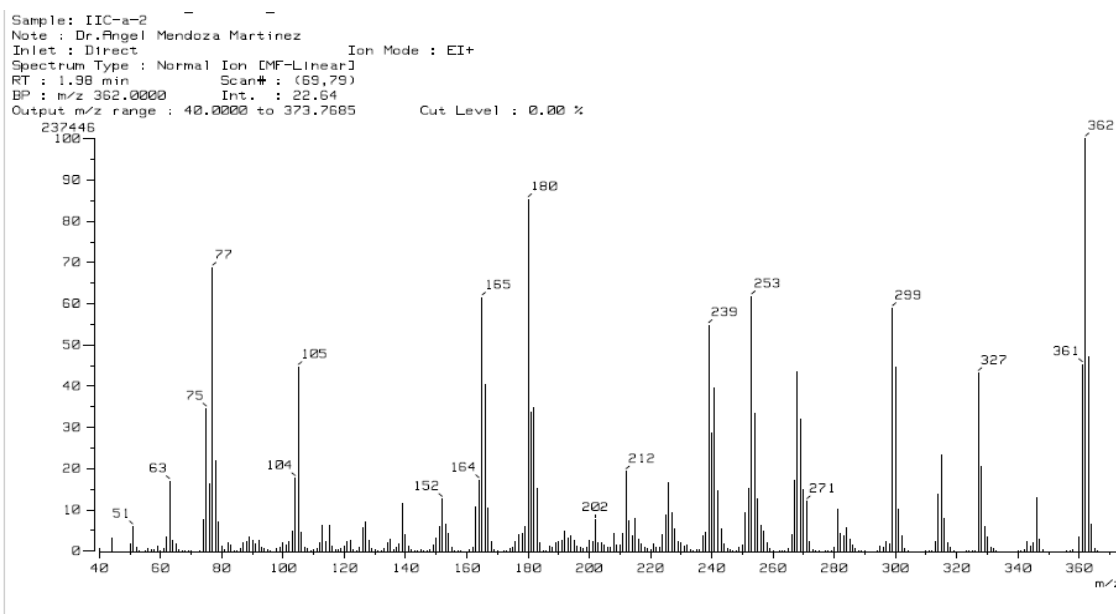
Figura 19. Sólido obtenido de la síntesis.

Algunos de los resultados de la caracterización del compuesto 1, se muestran en la siguiente tabla (tabla 4).

Tabla 4. Resultados obtenidos de algunas pruebas de caracterización del compuesto 1.

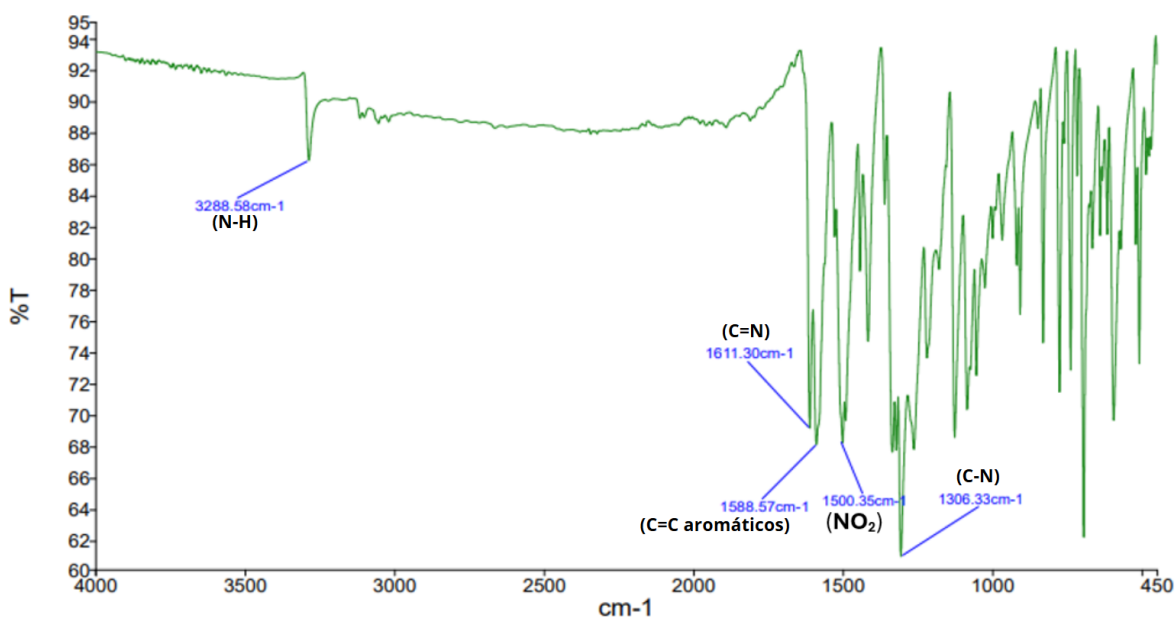
Aspecto físico	Sólido cristalino naranja-rojizo
Rendimiento (%)	78%
M.S.-E.I. (m/z)	362 M ⁺ (espectro 1)
p.f. (°C)	248-250
IR (KBr, cm⁻¹)	3288.58 cm ⁻¹ (N-H), en 1611.30 cm ⁻¹ (C=N), 1588.57 cm ⁻¹ (C=C aromáticos), 1528.13 cm ⁻¹ (NO ₂) y 1306.33 cm ⁻¹ (C-N)

El espectro de masas mostró el valor de 362 g/mol, lo cual corresponde al peso molecular teórico esperado (ver espectro 1).



Espectro 1. Espectro de masas utilizando el método de ionización de Impacto Electrónico (IE), en un rango de lectura m/z de 0 a 800.

Los resultados de IR se presentan a continuación (espectro 2).



Espectro 2. Espectro de resultados de prueba IR.

A continuación, se observa la numeración del compuesto en cuanto a la prueba de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ^1H y ^{13}C .

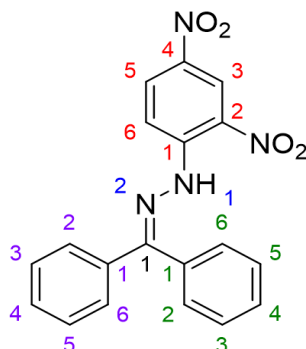


Figura 20. Molécula del compuesto obtenido respecto a la RMN para ^1H y ^{13}C .

En cuanto a los desplazamientos de ^1H y ^{13}C , estos se encuentran asignados en la siguiente tabla, mismos que fueron corroborados por el espectro de RMN de una y dos dimensiones.

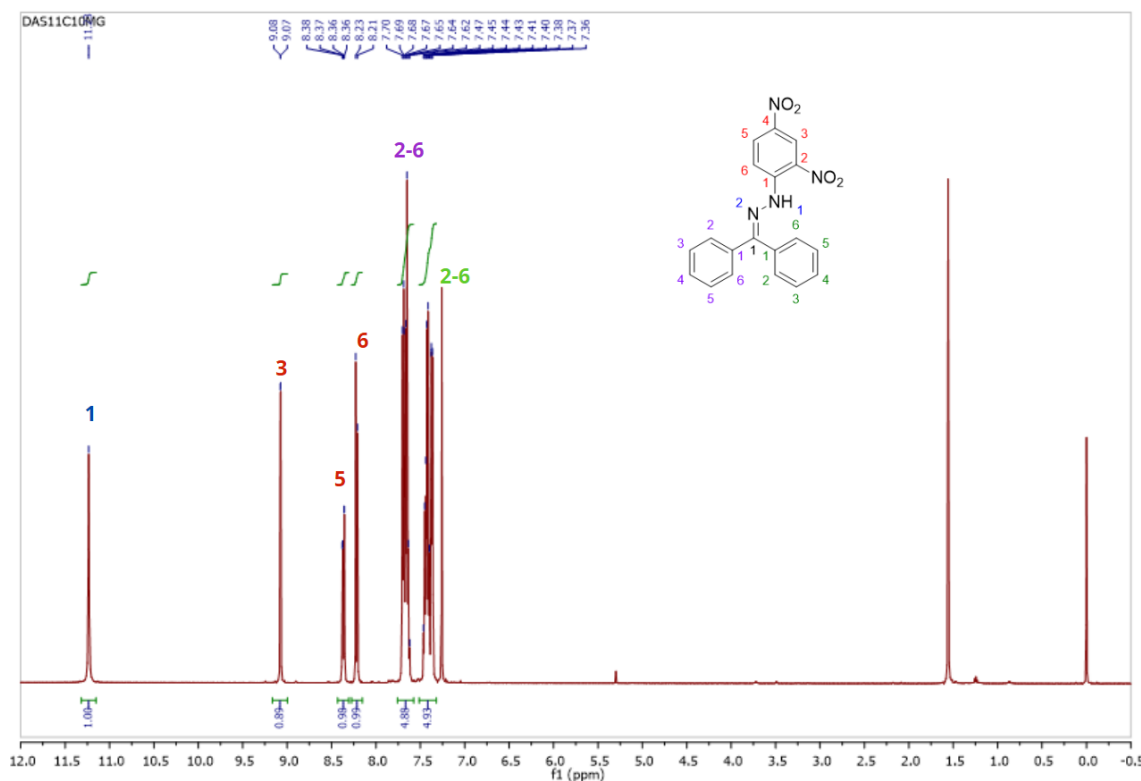
Tabla 5. Resultados de RMN para ^1H y ^{13}C . Los valores en paréntesis están en Hz.

Posición	δ_{H}	δ_{C}	COSY
1		SD,C	
1	11.23, s., 1H		
1		SD, C	
2		SD, C	
3	9.07, d (2.5), 1H	123.5, CH	
4		SD, C	
5	8.37, dd (9.6, 2.4) 1H	130.1, CH	H-6
6	8.22, d (9.6), 1H	116.6, CH	
1		SD, C	
2-6	7.73-7.60, m, 5H	130.5, CH 130.4, CH 127.9, CH	H-3, H-4, H-5
1		SD, C	

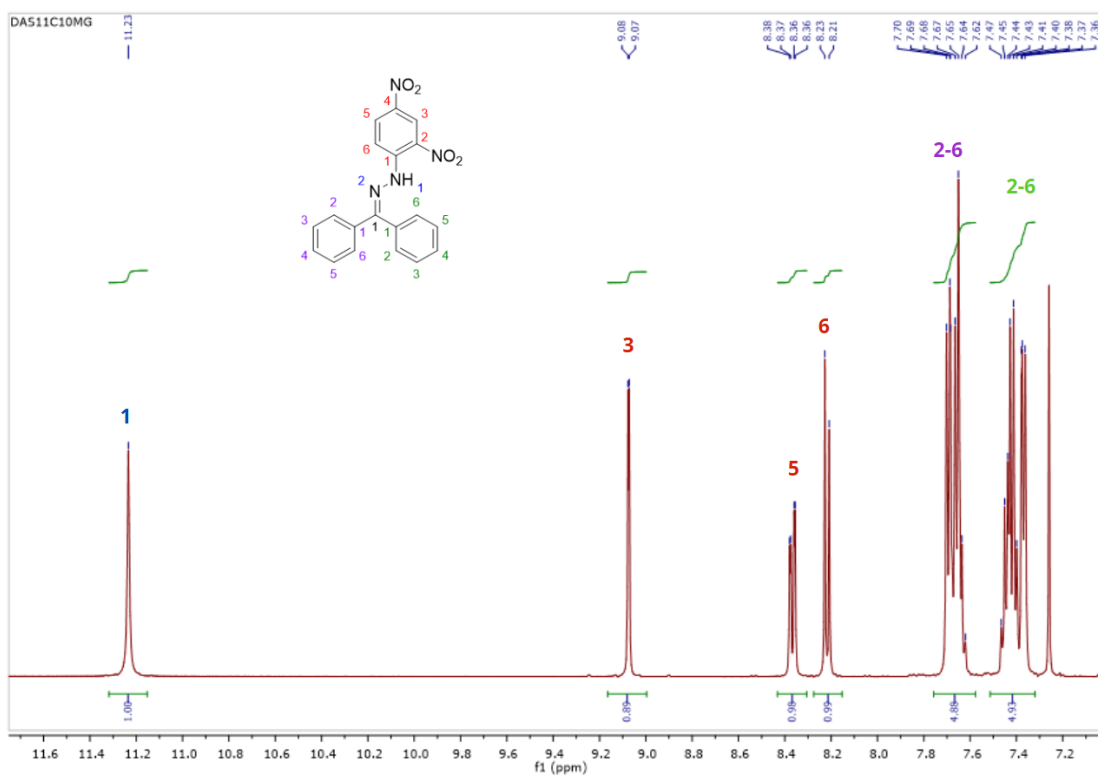
2-6	7.48-7.34, m, 5H	130.0, CH 128.6, CH 128.1, CH	H-3, H-4, H-5
-----	------------------	-------------------------------------	---------------

*SD = Sin Determinar (Se requieren estudios más especializados para asignar los carbonos cuaternarios).

En el espectro RMN de ^1H del compuesto se observa una señal simple a 11.23 ppm que se asigna al H perteneciente a la imina. En 9.07 ppm hay una señal doble con una $J = 2.5$ Hz integrando a un H de la posición **3** del compuesto aromático. A 8.37 ppm hay una señal doble de dobles con una $J = 9.6$ Hz y $J = 2.4$ Hz integrando al hidrógeno de la posición **5** correspondiente al mismo compuesto aromático. En 8.22 ppm hay una señal doble con una $J = 9.6$ Hz integrando al H en la posición **6**. A 7.73 ppm y 7.60 ppm hay una señal múltiple que integra a 5 hidrógenos correspondiente a las posiciones **2,3,4,5,6** del compuesto aromático correspondiente a ese color. Por último, en 7.48 ppm y 7.34 ppm también hay una señal múltiple integrando a 5 hidrógenos en la posición **2,3,4,5,6** del siguiente compuesto aromático de la molécula. En el espectro 3 y 4 se observan las señales que se obtuvieron.

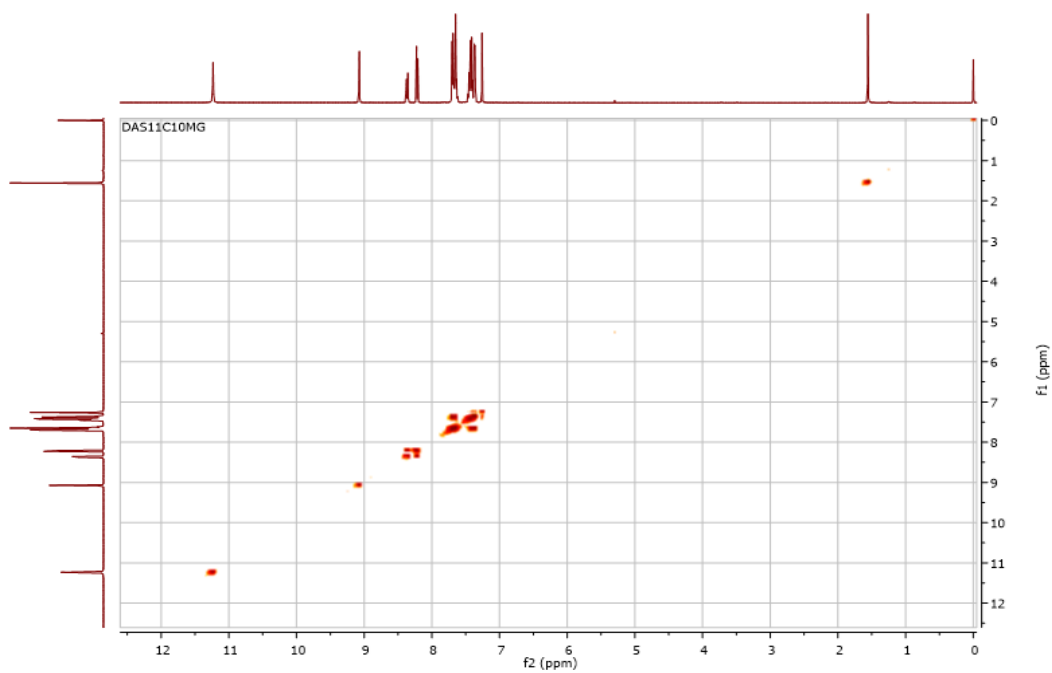


Espectro 3. Espectro RMN ^1H , 500 MHz, CDCl_3

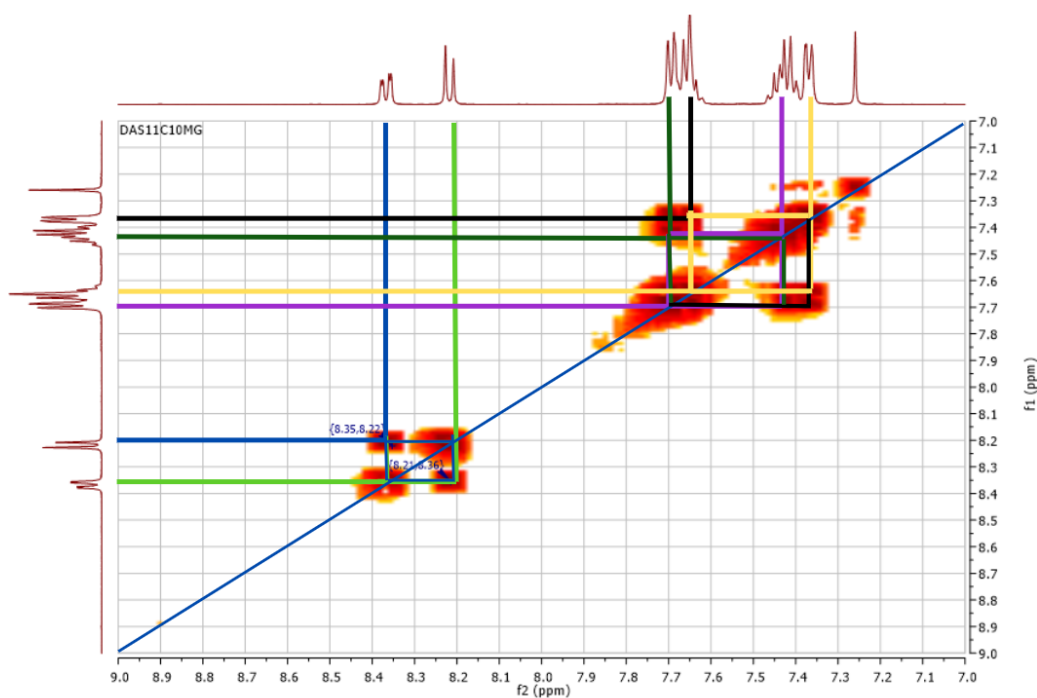


Espectro 4. Espectro RMN^1H , 500 MHz, CDCl_3 .

Las señales obtenidas de hidrógeno fueron corroboradas en espectros de dos dimensiones como COSY. (espectro 4 y 5).

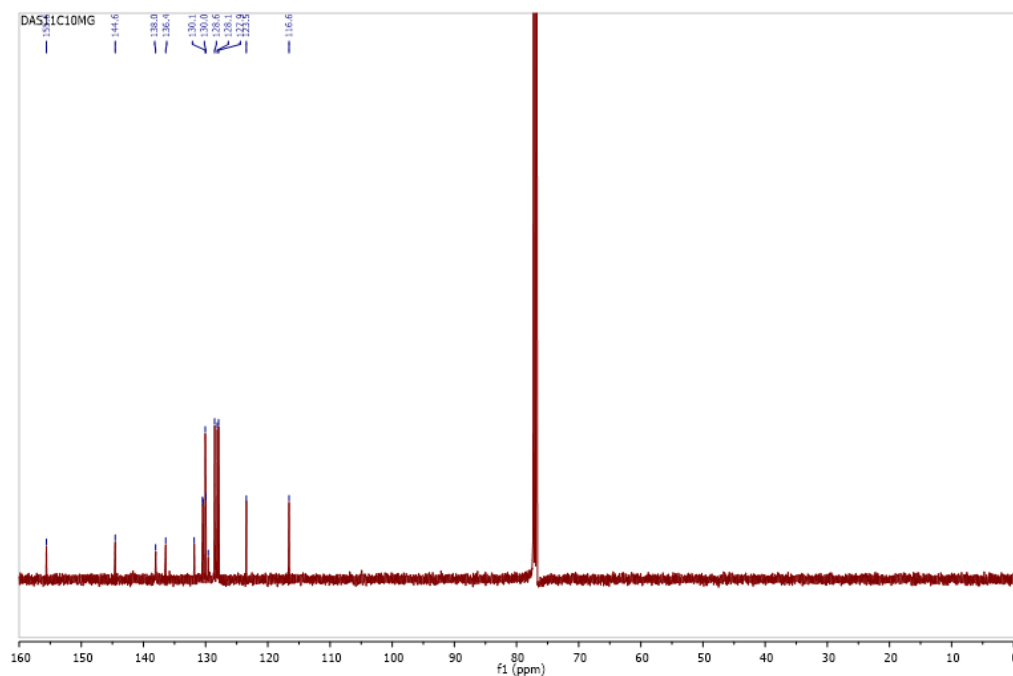


Espectro 4. Espectro COSY.

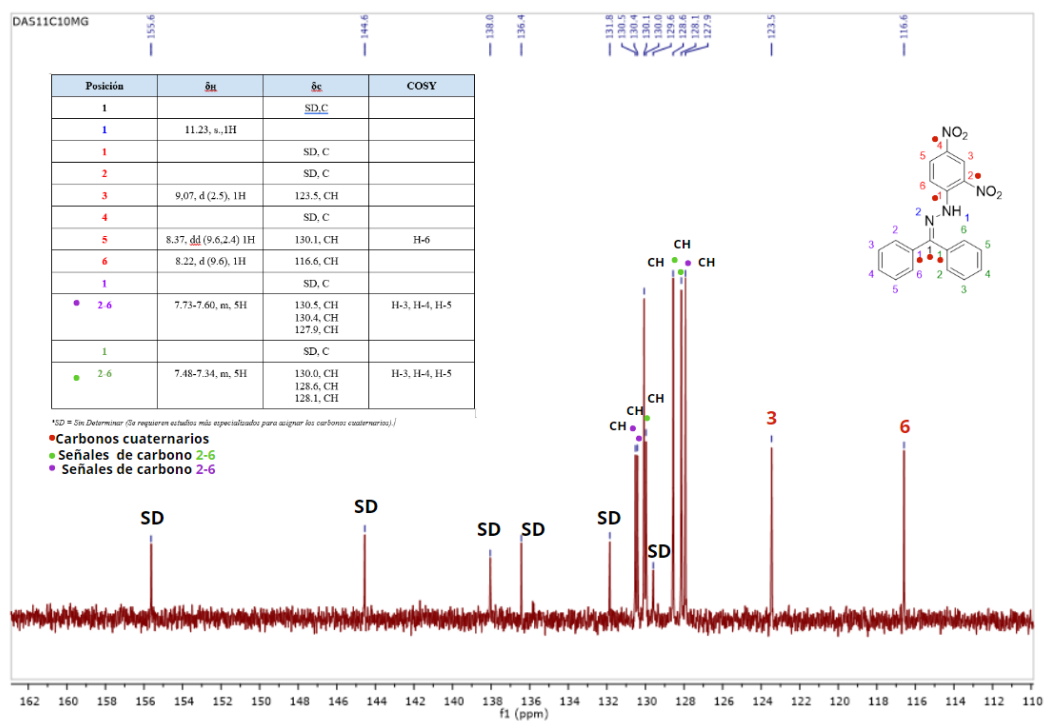


Espectro 5. Espectro COSY.

Se obtuvieron espectros de RMN correspondientes a ^{13}C , obteniendo señales simples y valores dados en la tabla SD, cuyo significado es sin determinar, debido a que se desconoce a qué señal pertenece ese carbono (espectro 6 y 7).

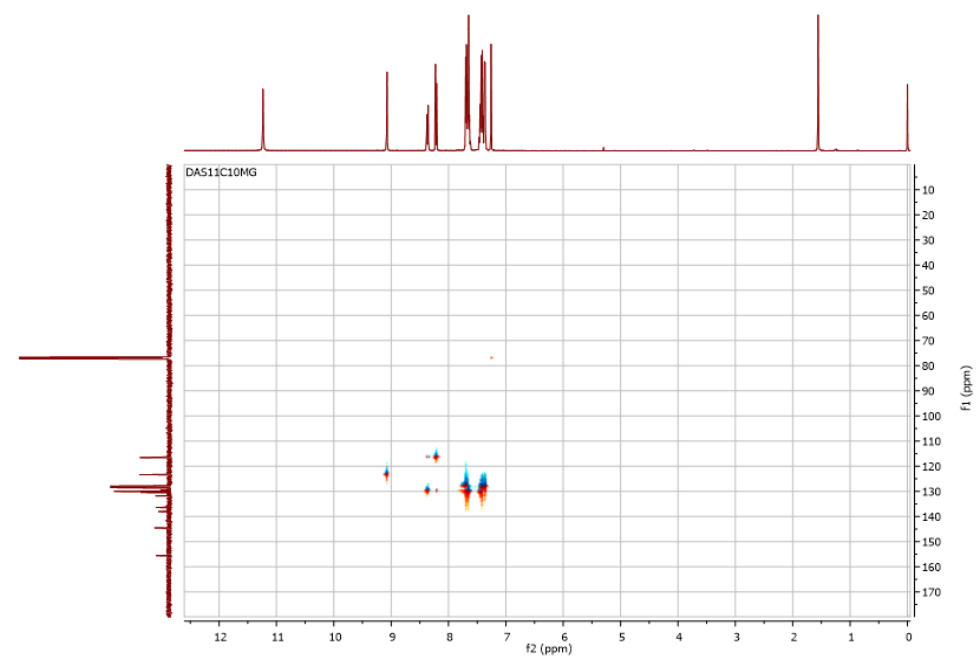


Espectro 6. Espectro RMN ^{13}C , 125 MHz, CDCl_3

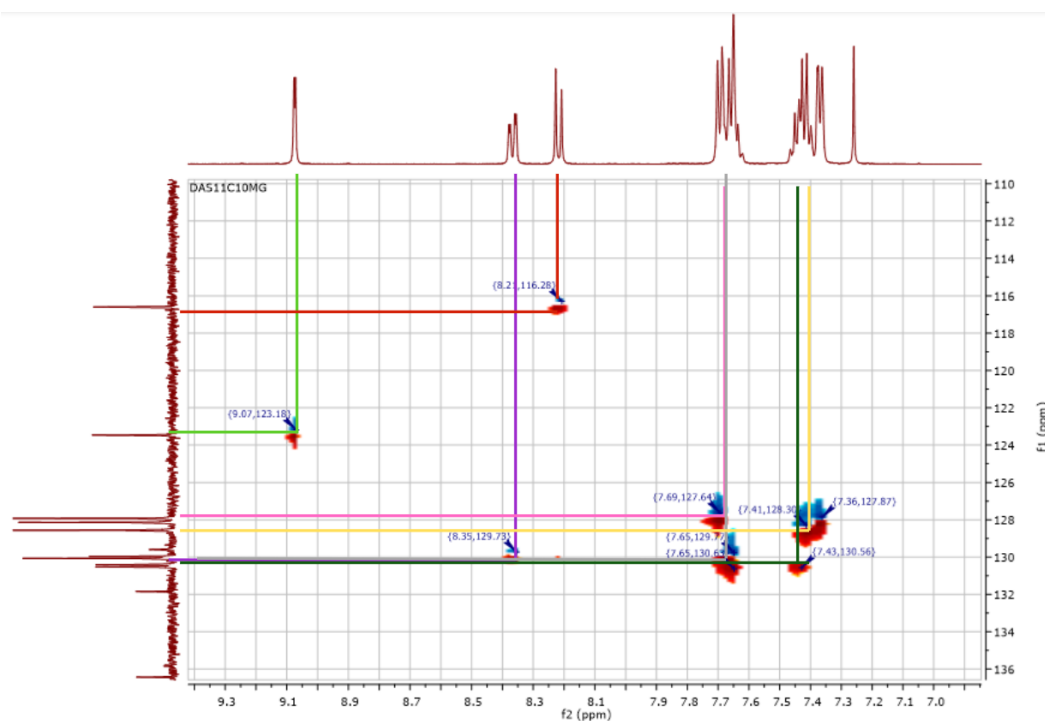


Espectro 7. Espectro RMN ^{13}C , 125 MHz, CDCl_3

Los espectros HSQC representan el acoplamiento entre cada ^1H señalando a qué ^{13}C es perteneciente de acuerdo con lo obtenido en ambos espectros (espectro 8 y 9).



Espectro 8. Espectro HSQC.



Espectro 9. Espectro HSQC.

Parte II. Retos microbianos

Concentración mínima inhibitoria en placa

En la placa del control positivo (medio de cultivo e inóculo), se observó crecimiento de cada una de las cepas, mostrando la viabilidad de todas ellas, por otro lado, en la placa control con diluyente (medio de cultivo con acetonitrilo e inóculo) se observó un crecimiento ligeramente inhibido para *C. albicans*. Sin embargo, *C. albicans* también mostró una disminución evidente de crecimiento en todas las concentraciones probadas comparado con la placa control (figura 21).

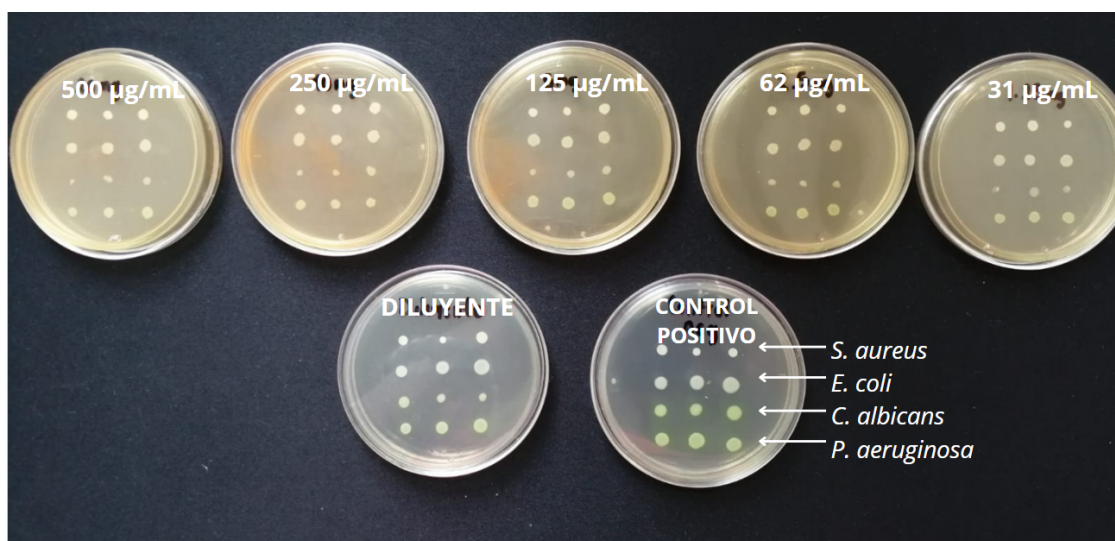


Figura 21. Resultados en prueba de CMI en placa.

En el caso de la segunda prueba solo con *C. albicans*, en donde se aumentó la concentración de hidrazona, en la concentración correspondiente a 1250 µg/mL se logró observar la disminución de crecimiento y una inhibición completa en 625 µg/mL (figura 22).

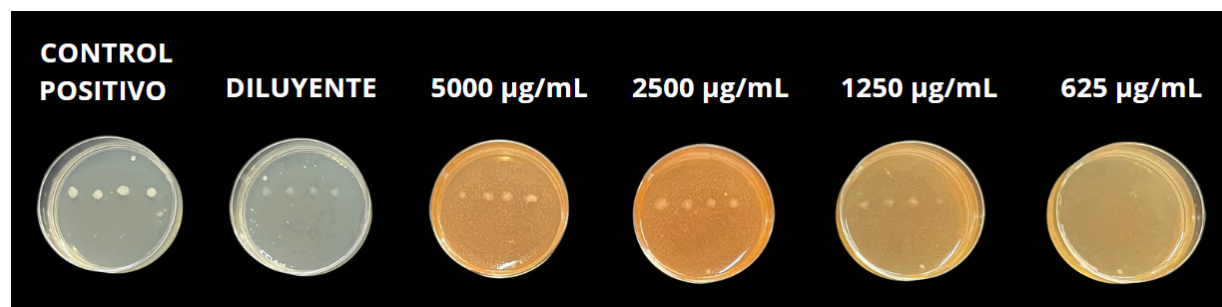


Figura 22. Resultados en la cepa de la levadura C. albicans.

Concentración mínima inhibitoria en placa con hongos filamentosos

En la cepa correspondiente a *Aspergillus niger* se logró observar una inhibición inicial desde 32 $\mu\text{g/mL}$ hasta una completa inhibición en la concentración 1024 $\mu\text{g/mL}$; De igual forma, en la placa con diluyente y control positivo, el hongo creció (figura 23).

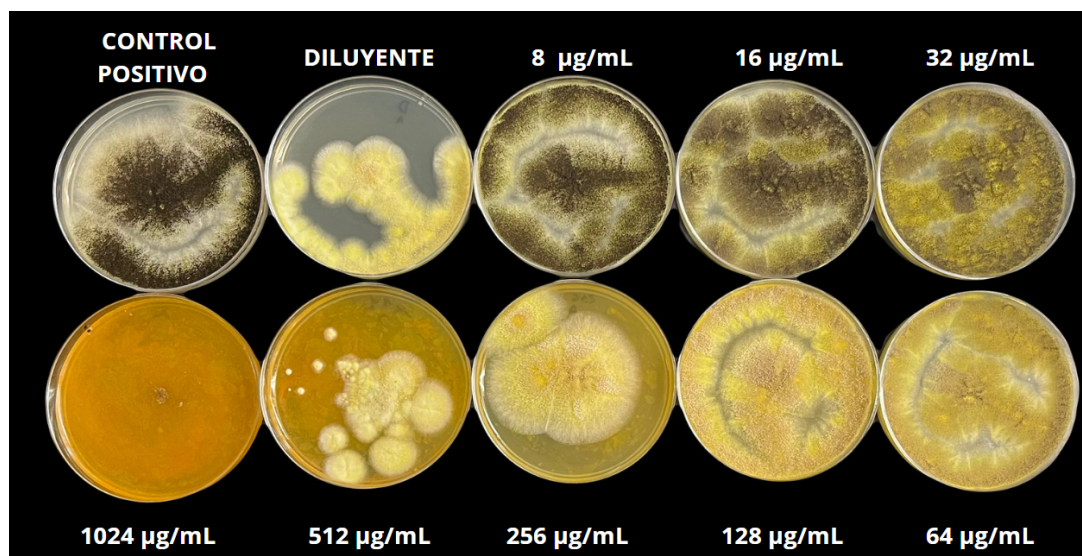


Figura 23. Resultados de concentración mínima inhibitoria en cepa de *Aspergillus niger*.

En la cepa *Penicillium digitatum* se observó la completa inhibición de la cepa en la concentración de 1024 $\mu\text{g/mL}$. A diferencia de *A. niger*, se logra observar una mayor inhibición en la placa donde solo hay diluyente (figura 24).

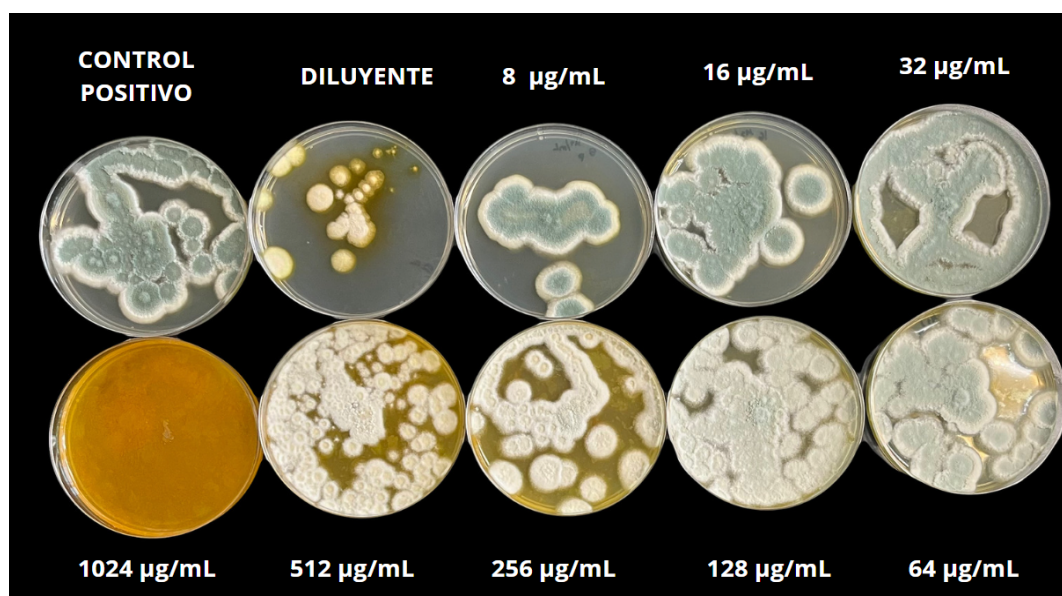


Figura 24. Resultados de concentración mínima inhibitoria en cepa de Penicillium digitatum.

Concentración mínima inhibitoria por microdilución en placa

En la figura 25 se observa la placa con las microdiluciones del compuesto 1 frente a las diferentes cepas después de la incubación a 37°C y 24 h.

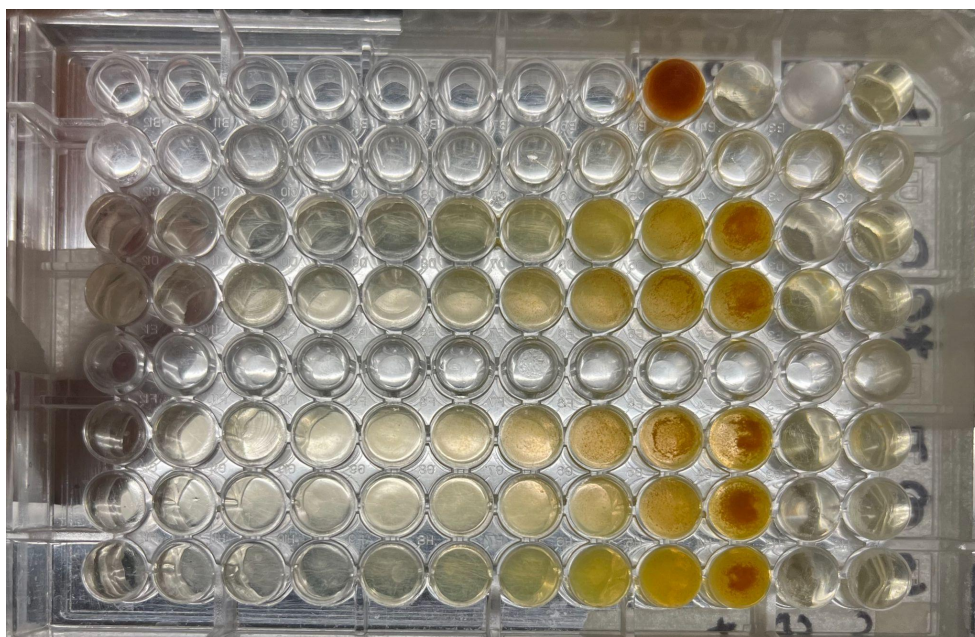


Figura 25. Placa con las microdiluciones de la hidrazona frente a diferentes cepas.

Las placas de AST sembradas con una asada de cada uno de los pozos de la placa anterior (figura 25) e incubadas a 37°C por 24 h mostraron que *C. albicans* fue inhibida a 1024 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, sin embargo, en este caso la levadura fue inhibida por el diluyente (figura 26).

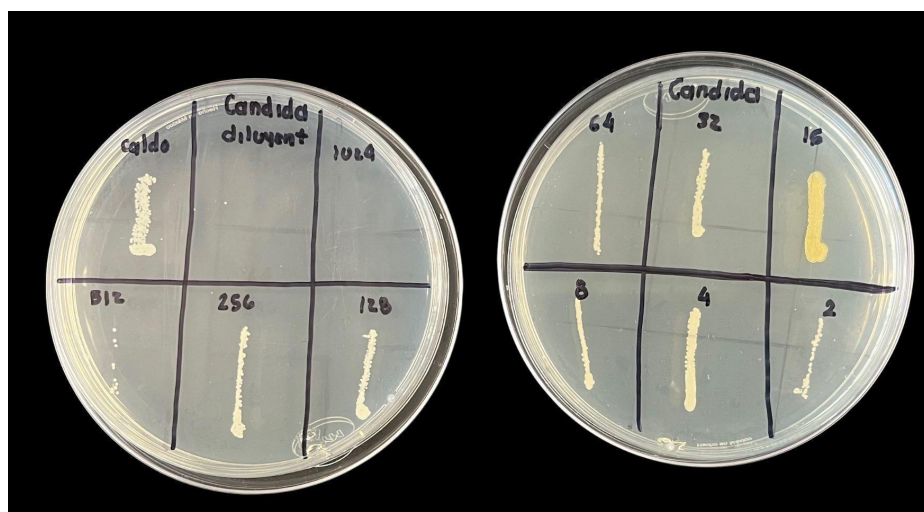


Figura 26. Resultados de la cepa correspondiente a *Candida albicans*.

De igual forma en la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* se logró observar inhibición en la concentración 1024 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, aunque también fue inhibida por el diluyente (figura 27). Para las cepas de *C. neoformans*, *E. coli* y *S. aureus*, solo se observó inhibición por diluyente.

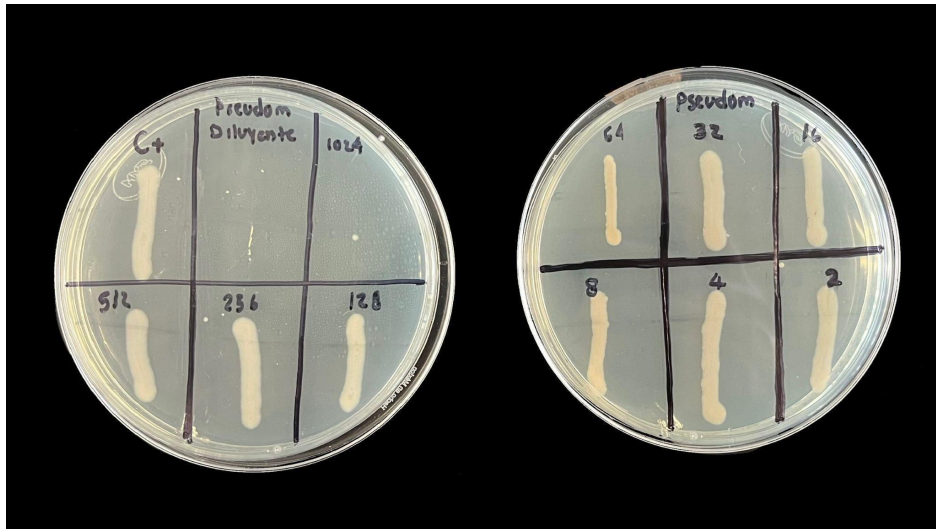


Figura 27. Resultados de la cepa correspondiente a *Pseudomonas aeruginosa*.

Las cepas correspondientes a *C. albicans*, *P. aeruginosa* y *C. neoformans* fueron sembradas a diferentes concentraciones de diluyente para conocer la concentración del diluyente que no presentaba efecto sobre el crecimiento microbiano, *C. albicans* fue inhibida en todas las concentraciones probadas (figura 28).

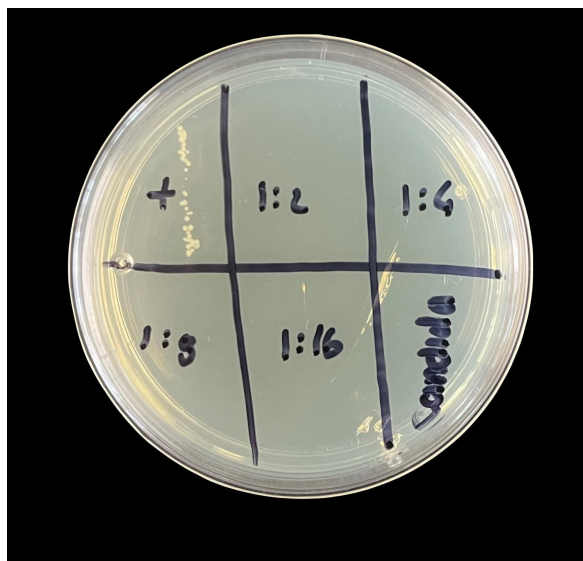


Figura 28. Resultados de diluciones con DMSO en cepa *C. albicans*.

P. aeruginosa pudo crecer a una concentración de 1:8 del diluyente (figura 29) mientras que *C. neoformans* tuvo crecimiento hasta 1:16 (figura 30).

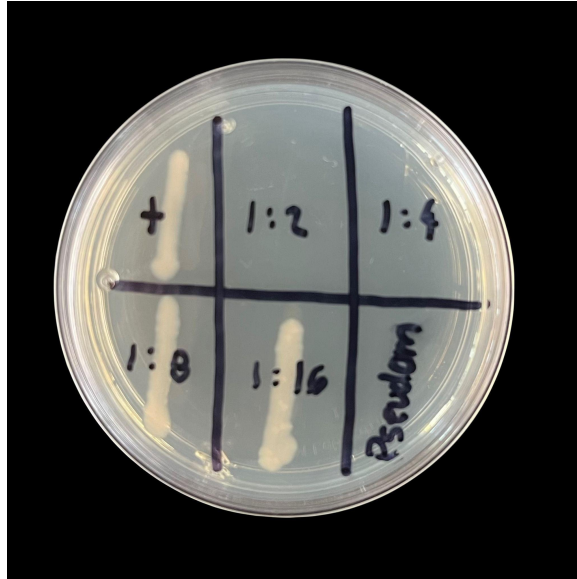


Figura 29. Resultados de diluciones con DMSO en cepa *P. aeruginosa*.

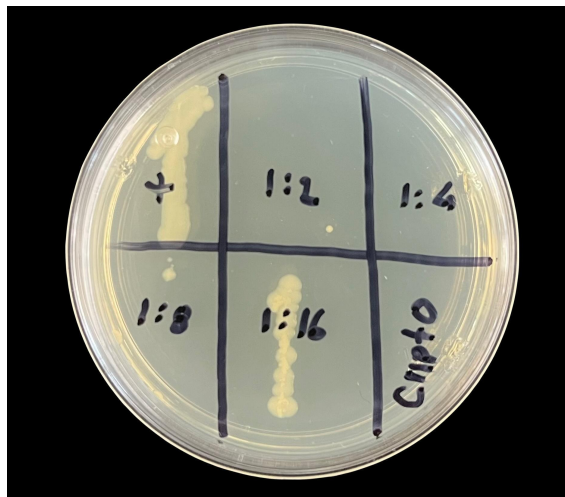


Figura 30. Resultados de diluciones con DMSO en cepa *C. neoformans*.

Prueba por contacto directo

En las placas de Müller Hinton obtenidas de cada cepa bacteriana probada después de la incubación a 37°C/24 h se observó crecimiento en todos los pozos de las cepas *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*, incluyendo en el control positivo (agar MH) y control respectivo a diluyente (DMSO)

(figura 31) mientras que con *C. albicans* en el pozo correspondiente al control positivo (agar MH) tuvo un crecimiento mayor a comparación de los correspondientes a hidrazona, sin embargo, el pozo control únicamente con DMSO disminuyó ligeramente el crecimiento de la levadura (figura 32).

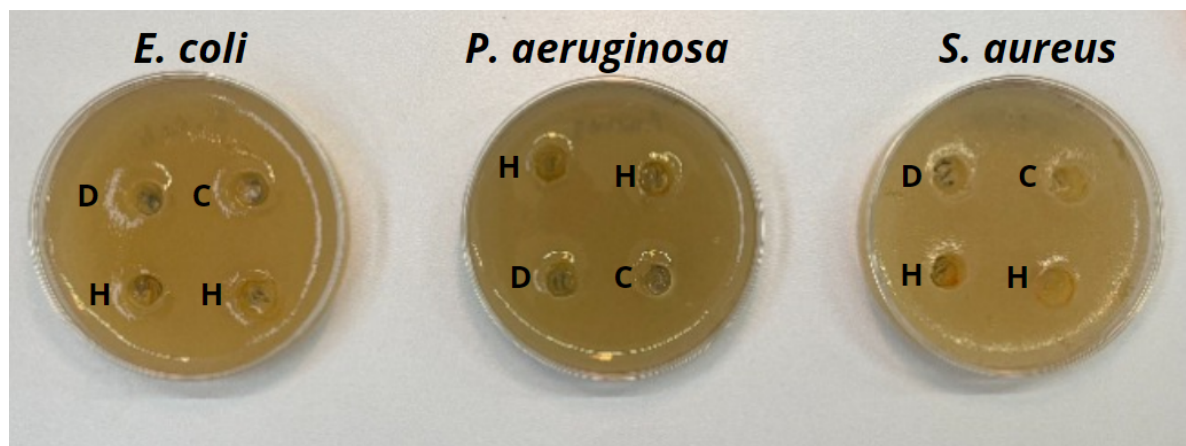


Figura 31. Crecimiento en las placas MH tras inóculo bacteriano en pozos con hidrazona y diluyente. H: hidrazona. D: diluyente. C: Control positivo.



Figura 32. Crecimiento en las placas MH tras inóculo de *C. albicans* en pozos con hidrazona y diluyente. H: hidrazona. D: diluyente. C: Control positivo.

En las placas de AST sembradas con *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* y *C. albicans* provenientes de los pozos de la placa anterior no hubo efecto de inhibición por parte de la hidrazona ni del diluyente (figura 33- 34).



Figura 33. Crecimiento en la placa AST por parte de las cepas bacterianas SH: hidrazona + inóculo de *S. aureus*. SD: DMSO + inóculo de *S. aureus*. SD: Control positivo *S. aureus*. EH: Hidrazona + inóculo de *E. coli*. ED: DMSO + inóculo de *E. coli*. EC: Control positivo *E. coli*. PH: Hidrazona + inóculo de *P. aeruginosa*. PD: DMSO + inóculo de *P. aeruginosa*. PC: Control positivo *P. aeruginosa*.



Figura 34. Crecimiento en la placa AST por parte de *C. albicans*. C: Control. D: Diluyente. H: Hidrazona.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Parte I. Síntesis y caracterización de benzofenona 2,4-dinitrofenilhidrazona

Con respecto a la primera parte de este trabajo, al sintetizar el compuesto 1 con la metodología de etanol como disolvente de reacción, en un medio ácido y reflujo por 24 horas, se obtuvo un sólido cristalino de color naranja cuyo rendimiento total fue de un 78%.

Una de las pruebas de caracterización que sirvieron para confirmar la obtención del producto esperado fue la Espectrometría de Masas por EI, en la cual se obtuvo un valor de 362 M⁺ al igual que el peso molecular teórico esperado.

En cuanto al Punto de Fusión (P.F.), este fue de 248-250°C lo cual coincide con el P.F. reportado en la literatura.

Otra de las técnicas de espectroscopía fue la de Infrarrojo (IR) en la cual se obtuvieron las señales características en 3288.58 cm⁻¹ (N-H), en 1611.30 cm⁻¹ (C=N), 1588.57 cm⁻¹ (C=C aromáticos), 1528.13 cm⁻¹ (NO₂) y 1306.33 cm⁻¹ (C-N) lo que confirmó la presencia de enlaces correspondientes a la molécula de estudio.

Por otra parte, se realizó la RMN de ¹H y ¹³C en la cual, las señales obtenidas correspondían con el mismo número de H y C presentes en la molécula, de modo que estas se corroboraron con estudios más especializados como COSY y HSQC. Cabe mencionar que, al tener seis señales SD diferentes en el espectro correspondiente a ¹³C, se supone que, representan a los carbonos cuaternarios sin poder determinar a qué carbono cuaternario específicamente pertenece, ya que no se realizó el estudio HMBC.

Finalmente, en cuanto a la caracterización no se pudo realizar el análisis por difracción de rayos X porque el compuesto no cristalizó.

Parte II. Retos microbianos

En cuanto a la segunda parte de este trabajo de tesis, se revisó un estudio previo realizado por González y col, en el cual usaron como disolvente de la hidrazona diclorometano y cloroformo haciendo difícil manipular la mezcla (González, 2023). Los mejores diluyentes aparentemente fueron el acetonitrilo y el dimetilsulfóxido (DMSO), sin embargo, el compuesto 1 que se obtuvo en este trabajo se precipitaba con mayor facilidad con acetonitrilo a los pocos segundos a pesar de haber hecho una mezcla muy rigurosa con ayuda del vortex además de ser mucho más volátil que el DMSO, por lo que se decidió a partir del estudio con los hongos utilizar DMSO como diluyente, esto apoyado con lo reportado por Noshiranzadeh y De la Cruz quienes utilizaron DMSO como diluyente para sus pruebas de inhibición microbiana (Noshiranzadeh *et al*, 2017; De la Cruz *et al*, 2022).

González y col, realizaron retos mediante difusión en agar usando pozos donde se depositaba el compuesto 1, sin embargo, no fue sencillo lograr que el compuesto 1 difundiera en el agar debido a la polaridad que presenta a pesar de haber probado diferentes diluyentes (González, 2023).

En los retos de hidrazona sintetizada y caracterizada frente a *C. albicans*, *P. aeruginosa*, *E. coli* y *S. aureus* usando acetonitrilo como diluyente se pudo determinar que, en la prueba de concentración mínima inhibitoria en placa se presentó inhibición de *C. albicans* en la última dilución probada (500 µg/mL) por lo que se tomó la decisión de aumentar la concentración hasta 5000 µg/mL obteniendo una inhibición completa a 625 µg/mL. Y se observó que al aumentar la concentración del compuesto 1 se presentó una sobresaturación, haciendo que la cepa levaduriforme pudo crecer libremente. De la Cruz y col, mostraron resultados similares de inhibición para *C. albicans* desde concentraciones de hidrazona de 200 µg/mL (De La Cruz *et al*, 2022).

En la prueba de concentración mínima inhibitoria de cepas fúngicas usando DMSO como diluyente se logró una inhibición a partir de 32 µg/mL en caso de *A. niger* y de 64 µg/mL para *P. digitatum*, observándose en ambos casos el hongo más joven a comparación de la placa control positivo, además, se obtuvo una inhibición total a una concentración de 1024 µg/mL para ambas cepas. Si contrastamos lo obtenido con los resultados de Gao Zhinan y col, cuyo compuesto tipo hidrazona (metilbencenosulfonhidrazona) fue puesta a prueba contra siete hongos fitopatógenos, obteniendo actividad inhibitoria sobre cinco de los siete hongos probados a una concentración de 100 µg/mL (Gao *et al*, 2015), De igual forma, De la Cruz obtuvo un compuesto tipo hidrazona, cuya diferencia

fue la presencia de yodo en la molécula, que mostró una inhibición de *A. niger* a la misma concentración (100 µg/mL) (De la Cruz, 2023).

El compuesto 1 obtenido en este trabajo (benzofenona 2,4-dinitrofenilhidrazona) mostró mejores resultados que los dos trabajos anteriores al tener una inhibición de los hongos probados desde valores de 32 µg/mL, hasta una inhibición total a 1024 µg/mL. Este resultado llama la atención debido a que *P. digitatum* es el principal responsable de la pérdida del 90% de la cosecha de cítricos (Mingshuang *et al*, 2021), los resultados de este trabajo dan pauta a hacer modelos *in vitro* del compuesto 1 para comprobar efecto fungicida sobre las cosechas.

Con respecto a la prueba de microdilución en placa a concentraciones de 1024 µg/mL, hubo inhibición de *C. albicans* y *P. aeruginosa*, sin embargo, el diluyente inhibió el crecimiento de las cepas. Con el fin de mejorar el crecimiento microbiano frente al diluyente se probaron diferentes diluciones del DMSO frente a las cepas de estudios, sin embargo, en todos los casos el crecimiento se inhibió aun en diluciones 1:16. De la Cruz y col, utilizaron etanol, etilenglicol o DMF como diluyentes mientras que Noshiranzadeh utilizó DMSO, y no observaron inhibición sobre el crecimiento microbiano, esto pudo deberse al tipo de cepas usadas, probablemente las que se utilizaron en este estudio son más sensibles a los diluyentes.

Al tener problemas con la difusión y solubilización del compuesto 1, se intentó conocer el efecto de ésta sobre *C. albicans* por contacto directo, no hubo resultados satisfactorios respecto a la inhibición la levadura a la concentración probada (100 µg/mL), por lo que se propone intentar con concentraciones mayores del compuesto 1 sobre la levadura, aunado a esto, en la bibliografía no se encontraron reportes con esta metodología, por lo que será interesante insistir en esta prueba.

CONCLUSIONES

Se sintetizó la benzofenona 2,4-dinitrofenilhidrazona con un rendimiento del 78% modificando las metodologías propuestas por Ponce Yarce (2022) y García Hernández *et al.* (2023) en cuanto al reflujo, el cual se dejó por 24 horas.

Se realizó la caracterización del compuesto por IR, RMN de ^1H y ^{13}C en una y dos dimensiones, así como por Espectrometría de Masas para confirmar la obtención de la benzofenona 2,4-dinitrofenilhidrazona.

La hidrazona tuvo menor solubilidad en el acetonitrilo que en el DMSO, el acetonitrilo no afectó el crecimiento de las cepas bacterianas, pero sí el de *C. albicans*, En cuanto al DMSO, la hidrazona presentó mayor solubilidad, sin embargo, inhibió el crecimiento de las cepas microbianas.

Finalmente, se encontró que la benzofenona 2,4-dinitrofenilhidrazona presentó una mejor actividad frente a hongos que a bacterias, por lo cual a este compuesto se le atribuye actividad antifúngica pero no antibacteriana, al menos, no con los métodos realizados en este trabajo y empleando las cepas que aquí se mencionan.

PERSPECTIVAS

Como trabajos de tesis a futuro, se podría probar la solubilidad de la benzofenona 2,4-dinitrofenilhidrazona en otros disolventes para mejorar su difusión en los agares que se emplearon en este trabajo e incluso en otros que no fueron contemplados.

Además, se podría realizar el mismo experimento, pero bajo una comparativa con antibióticos y antifúngicos para un mayor peso de validez de los resultados antimicrobianos de la benzofenona 2,4-dinitrofenilhidrazona.

Finalmente, sería interesante de evaluar la benzofenona 2,4-dinitrofenilhidrazona en otras de las funciones biológicas que se mencionan en la literatura como son las actividades anticancerígena, antiparasitaria, antiinflamatoria, anticonvulsiva, etc. Incluso realizar complejos de la benzofenona 2,4-dinitrofenilhidrazona con diferentes iones metálicos y evaluar si estas actividades biológicas se potencian, debido a que, de acuerdo con lo reportado en la literatura al ser complejos estos presentan una actividad mayor.

REFERENCIAS

- Aljaafari, M. N., Alkhoori, M. A., Hag-Ali, M., Cheng, W.-H., Lim, S.-H.-E., Loh, J.-Y., & Lai, K.-S. (2022). Contribution of Aldehydes and Their Derivatives to Antimicrobial and Immunomodulatory Activities. *Molecules*, 27(11), 3589. <https://doi.org/10.3390/molecules27113589>
- Angelova, V., Karabeliov, V., Andreeva-Gateva, P. A., & Tchekalarova, J. (2016). Recent Developments of Hydrazide/Hydrazone Derivatives and Their Analogs as Anticonvulsant Agents in Animal Models. *Drug Development Research*, 77(7), 379–392. <https://doi.org/10.1002/ddr.21329>
- Antimicrobial resistance*. (2023, noviembre). [Gubernamental]. World Health Organization. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
- Autino, J. C., Romanelli, G., & Ruiz, D. M. (2013). *Introducción a la Química Orgánica* (1a ed., Vol. 1). – Editorial de la Universidad de La Plata.
- Buranasinsup, S., Wiratsudakul, A., Chantong, B., Maklon, K., Suwanpakdee, S., Jiemtaweeboon, S., & Sakcamduang, W. (2023). Prevalence and characterization of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolated from veterinary staff, pets, and pet owners in Thailand. *Journal of Infection and Public Health*, 16, 194–202. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2023.11.006>
- Cantón, R. (2017). Resistencia antimicrobiana en bacilos gramnegativos: Una amenaza actual y global. *Enferm Infecc Microbiol Clin*.
- Cazorla, J. I. O. (s/f). *TRABAJO DE FIN DE GRADO: ALDEHIDOS Y CETONAS: REVISIÓN DE SU SÍNTESIS Y REACTIVIDAD*.
- Contreras-Omaña, R., Escorcia-Saucedo, A. E., & Velarde-Ruiz Velasco, J. A. (2021). Prevalencia e impacto de resistencias a antimicrobianos en infecciones gastrointestinales: Una revisión. *Revista de Gastroenterología de México*, 86(3), 265–275. <https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2021.02.003>
- Dascalu, A.-E., Ghinet, A., Lipka, E., Furman, C., Rigo, B., Fayeulle, A., & Billamboz, M. (2020). Design, synthesis and evaluation of hydrazine and acyl hydrazone derivatives of 5-pyrrolidin-2-one as antifungal agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 30(13), 127220. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127220>
- De La Cruz Argüello, B. E., Gálvez Cardoza, B. E., Díaz Crespín, G., & Morán Rodríguez, A. E. (2022). SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE HIDRAZONAS AROMÁTICAS. *Ingeniería Investigación y Desarrollo*, 22(2), 6–15. <https://doi.org/10.19053/1900771X.v22.n2.2022.15016>
- Dehestani, L., Ahangar, N., Hashemi, S. M., Irannejad, H., Honarchian Masihi, P., Shakiba, A., & Emami, S. (2018). Design, synthesis, in vivo and in silico evaluation of phenacyl triazole hydrazones as new anticonvulsant agents. *Bioorganic Chemistry*, 78, 119–129. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.03.001>
- Estefanía Brito-Bazán, Ascanio Gabriel, Iñiguez-Moreno Maricarmen, Calderón Santoyo

- Montserrat. (2023). *High-pressure pulses for Aspergillus niger spore inactivation in a model pharmaceutical lipid emulsion*. 399. <https://doi.bibliotecabuap.elogim.com/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110255>
- Fang, G.-Y., Wu, F.-H., Mu, X.-J., Jiang, Y.-J., & Liu, X.-Q. (2024). Monitoring longitudinal antimicrobial resistance trends of *Staphylococcus aureus* strains worldwide over the past 100 years to decipher its evolution and transmission. *Journal of Hazardous Materials*, 465, 133136. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.133136>
- Galán, J. L., Fernandez Andreu Carlos, Machín Martinez Gerardo, Perurena Lancha Mayda, Velar Martinez Rosario, & Illnati Zaragozi Maria Teresa. (2017). *EMERGENCIA EN CUBA DE ESPECIES DE ASPERGILLUS RESISTENTE A ANTIFÚNGICOS*. 27(13).
- Gao, Z., Lv, M., Li, Q., & Xu, H. (2015). Synthesis of heterocycle-attached methylidenebenzenesulfonhydrazones as antifungal agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 25(22), 5092–5096. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.10.017>
- Gil, D. M. (2020). Synthesis, molecular structure, spectroscopic and theoretical investigation of 5-chlorosalicylaldehyde-2,4-dinitrophenylhydrazone. *Journal of Molecular Structure*, 1205, 127589. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.127589>
- Giono-Cerezo, S., Santos-Preciado, J. I., Morfín-Otero, M. D. R., Torres-López, F. J., & Alcántar-Curiel, M. D. (2020). Resistencia antimicrobiana. Importancia y esfuerzos por contenerla. *Gaceta Médica de México*, 156(2), 3610. <https://doi.org/10.24875/GMM.20005624>
- Gonzalez, D. (2023). *Síntesis, caracterización y evaluación microbiológica de la Benzofenona 2,4-dinitrofenilhidrazona*. Universidad Tecnológica de Puebla.
- Hamers, R. L., Dobрева, Z., Cassini, A., Tamara, A., Lazarus, G., Asadinia, K. S., Burzo, S., Olaru, I. D., Dona, D., Emdin, F., Van Weezenbeek, K., & Bertagnolio, S. (2023). Global knowledge gaps on antimicrobial resistance in the human health sector: A scoping review. *International Journal of Infectious Diseases*, 134, 142–149. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2023.06.004>
- Heidari, A., Haghi, F., Noshiranzadeh, N., & Bikas, R. (2017). (S,E)-2-hydroxy-N-(2-hydroxy-5-nitrobenzylidene) propane hydrazide as a quorum sensing inhibitor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Medicinal Chemistry Research*, 26(9), 1947–1955. <https://doi.org/10.1007/s00044-017-1908-8>
- Heidary, M., Sholeh, M., Koupaei, M., Asadi, A., Khah, S. M., Kheirabadi, F., Saeidi, P., Darbandi, A., Taheri, B., & Ghanavati, R. (2024). Prevalence of tigecycline resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A systematic review and meta-analysis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 108(1), 116088. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2023.116088>
- Janotto, L. D. S., Nazareth, T. D. M., Meca, G., Luciano, F. B., & Evangelista, A. G. (2023). Exploring the efficacy of antibiotic-essential oil combinations: Implications

- for combating antimicrobial resistance. *Bioresource Technology Reports*, 24, 101679. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2023.101679>
- Kajal, A., Bala, S., Sharma, N., Kamboj, S., & Saini, V. (2014). Therapeutic Potential of Hydrazones as Anti-Inflammatory Agents. *International Journal of Medicinal Chemistry*, 2014, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2014/761030>
- Khan, M., Ahad, G., Alam, A., Ullah, S., Khan, A., Kanwal, Salar, U., Wadood, A., Ajmal, A., Khan, K. M., Perveen, S., Uddin, J., & Al-Harrasi, A. (2024). Synthesis of new bis(dimethylamino)benzophenone hydrazone for diabetic management: In-vitro and in-silico approach. *Heliyon*, 10(1), e23323. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e23323>
- Kim, J., Graebel, K., Kumar, A., Sandesh, F., Patel, S., & Golzarian, H. (2023). *Cryptococcus neoformans* presenting as a large pulmonary cavitory lesion in an immunocompetent female. *IDCases*, 34, e01921. <https://doi.org/10.1016/j.idcr.2023.e01921>
- Koopaei, N. N., Shademani, M., Yazdi, N. S., Tahmasvand, R., Dehbid, M., Koopaei, M. N., Azizian, H., Mousavi, Z., Almasirad, A., & Salimi, M. (2022). Design and synthesis of novel ureido and thioureido conjugated hydrazone derivatives with potent anticancer activity. *BMC Chemistry*, 16(1), 81. <https://doi.org/10.1186/s13065-022-00873-3>
- OMS. (2022). *La OMS publica su primera lista de hongos que constituyen una amenaza para la salud*. Recuperado el 21 de febrero de 2024, de <https://www.who.int/es/news/item/25-10-2022-who-releases-first-ever-list-of-health-threatening-fungi>
- Laiglesia, A. L., Martínez, P. S., Lasheras, E. G., Gracia, E. L., Serrano, J. M., & Triola, J. T. (s/f). *MIGUEL GARCÍA LAMIGUEIRO, DKV*.
- Lopes, J. P., & Lionakis, M. S. (2022). Pathogenesis and virulence of *Candida albicans*. *Virulence*, 13(1), 89–121. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.2019950>
- Macias-Paz, I. U., Pérez-Hernández, S., Tavera-Tapia, A., Luna-Arias, J. P., Guerra-Cárdenas, J. E., & Reyna-Beltrán, E. (2023). *Candida albicans* the main opportunistic pathogenic fungus in humans. *Revista Argentina de Microbiología*, 55(2), 189–198. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2022.08.003>
- McMurry, J. (2012). *Química Orgánica* (8va ed., Vol. 1). Cengage learning.
- Mingshuang Wang, Ruoxin Ruan, & Hongye Li. (2021). The completed genome sequence of the pathogenic ascomycete fungus *Penicillium digitatum*, *Genomics*. 2021, 113, 439–446. <https://doi.bibliotecabuap.elogim.com/10.1016/j.ygeno.2021.01.001>
- Noshiranzadeh, N., Heidari, A., Haghi, F., Bikas, R., & Lis, T. (2017). Chiral lactic hydrazone derivatives as potential bioactive antibacterial agents: Synthesis, spectroscopic, structural and molecular docking studies. *Journal of Molecular Structure*, 1128, 391–399. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2016.09.006>
- Pacheco, T. (2012). Síntesis de hidrazonas con probable actividad farmacológica. [Tesis de licenciatura], BUAP.

- Pandele Cusu, J., Musuc, A. M., & Oancea, D. (2020). Thermal decomposition of new aldehyde-2,4-dinitrophenylhydrazones: Kinetic studies and thermal hazard predictions. *Thermochimica Acta*, 689, 178610. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2020.178610>
- Polović, S., Bilić, V. L., Budimir, A., Kontrec, D., Galić, N., & Kosalec, I. (2019). Antimicrobial assesment of aroylhydrazone derivatives *in vitro*. *Acta Pharmaceutica*, 69(2), 277–285. <https://doi.org/10.2478/acph-2019-0020>
- Popiołek, Ł. (2021a). The bioactivity of benzenesulfonyl hydrazones: A short review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 141, 111851. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111851>
- Popiołek, Ł. (2021b). Updated Information on Antimicrobial Activity of Hydrazide–Hydrazones. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(17), 9389. <https://doi.org/10.3390/ijms22179389>
- Popiolek Lukasz, Rysz Berndetta, & Wujec Monika. (2020). Synthesis of promising antimicrobial agents: Hydrazide-hydrazones of 5-nitrofurantoin-2-carboxylic acid. 2020, 95, 269. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13639>
- Riojas Hernández, M. P., Pérez Cavazos, S., De La Peña Aguilar, G., Vaquera Aparicio, D. N., Castillo Bejarano, J. I., Mascareñas De Los Santos, A. H., & De La O Cavazos, M. E. (2021). Bacteriemia por *Pseudomonas aeruginosa* en niños: Perfil de resistencia antimicrobiana. *Revista Latinoamericana de Infectología Pediátrica*, 34(1), 34–40. <https://doi.org/10.35366/99826>
- Samreen, Ahmad, I., Malak, H. A., & Abulreesh, H. H. (2021). Environmental antimicrobial resistance and its drivers: A potential threat to public health. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 27, 101–111. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2021.08.001>
- Şenkardeş, S., İhsan Han, M., Gürboğa, M., Özakpınar, Ö. B., & Güniz Küçükgülzel, Ş. (2022). Synthesis and anticancer activity of novel hydrazone linkage-based aryl sulfonate derivatives as apoptosis inducers. *Medicinal Chemistry Research*, 31(2), 368–379. <https://doi.org/10.1007/s00044-021-02837-z>
- Thi, M. T. T., Wibowo, D., & Rehm, B. H. A. (2020). *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), 8671. <https://doi.org/10.3390/ijms21228671>
- Wade, L. (2011). *Química orgánica* (7a ed., Vol. 1). Pearson.
- Wade, L. (2012). *Química Orgánica* (Vol. 2). Pearson. <https://ia600500.us.archive.org/9/items/QuimicaOrganicaDeWade.Volumen2/Qu%C3%ADmica%20org%C3%A1nica%20de%20Wade.%20Volumen%202.pdf>
- Wentrup, C. (2022). Origins of Organic Chemistry and Organic Synthesis. *European Journal of Organic Chemistry*, 2022(25), e202101492. <https://doi.org/10.1002/ejoc.202101492>
- Zafar, H., Altamirano, S., Ballou, E. R., & Nielsen, K. (2019). A titanic drug resistance threat in *Cryptococcus neoformans*. *Current Opinion in Microbiology*, 52, 158–164.

<https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.11.001>

- Zhang, G., Zhang, N., Xu, J., Yang, T., Yin, H., & Cai, Y. (2023). Efficacy and safety of vancomycin for the treatment of *Staphylococcus aureus* bacteraemia: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 62(4), 106946. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2023.106946>
- Zhou, Z., Wang, X., & Zhou, T. (2019). Synthesis and Antibacterial Activity of Benzenesulfonylhydrazone Derivatives of Methyl Dehydroabietate. *Russian Journal of General Chemistry*, 89(4), 819–823. <https://doi.org/10.1134/S1070363219040297>