



FACULTAD DE FARMACIA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Prácticas experimentales de síntesis de fármacos y sus precursores empleando métodos sostenibles

Autor: Cayuela Calvo, María

DNI: 05288856-Y

Tutor: López-Alvarado Gutiérrez, Pilar

Convocatoria: 30-Junio

30 de mayo de 2015

Dpto. Química Orgánica y Farmacéutica

Resumen	3
Introducción y antecedentes	3
Objetivos	6
Material y metodología	6
1. REACCIÓN DE FORMACIÓN DEL ÁCIDO 5-METILISOXAZOL-3-CARBOXÍLICO	7
2. REACCIÓN DE FORMACIÓN DEL 5-METILISOXAZOL-3-CARBOXILATO DE METILO	9
3. OBTENCIÓN DE BENZILHIDRAZONA. HIDRATO DE HIDRAZINA $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	11
4. REACCIÓN FINAL DE OBTENCIÓN DE ISOCARBOXIAZIDA.	17
Discusión de los resultados	18
Conclusiones	19
Bibliografía	21

RESUMEN

La isocarboxazida es un inhibidor irreversible y no selectivo de la enzima monoaminoxidasa. Este fármaco se emplea para el tratamiento de la depresión y la ansiedad, aunque presenta un alto número de efectos adversos, por ello no se considera un tratamiento de primera elección. El mecanismo de acción de este fármaco es interferir en la degradación metabólica de distintos neurotransmisores.

Para la obtención de este compuesto debemos partir de la hidrazina, ya que es un derivado de la misma. Es una síntesis convergente en la cual obtenemos dos productos intermedios que al ponerlos a reaccionar nos forman nuestro compuesto final (isocarboxazida).

El objetivo final de este trabajo es intentar comprobar que esta síntesis se puede realizar en un laboratorio de prácticas de la asignatura “Métodos Experimentales en Síntesis y Caracterización de Fármacos” para lo cual debe tener una duración máxima de 15 horas.

Tras la elaboración de la síntesis vemos que presenta una duración muy superior a las 15 horas de trabajo del laboratorio, esto implica que no es una síntesis que se pudiera realizar en el periodo de prácticas de dicha asignatura.

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

La isocarboxazida es un inhibidor irreversible y no selectivo de la MAO (enzima monoaminoxidasa). Por este motivo, entra dentro del grupo de fármacos denominados antidepresivos y ansiolíticos. Se emplea principalmente para el tratamiento de la depresión, ansiedad social, situaciones de pánico y también, en los estados iniciales de farmacoterapia contra el Parkinson y otras enfermedades asociadas a la demencia.

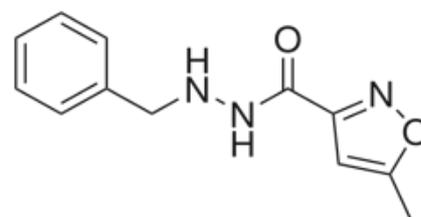


Figura 1: Isocarboxazida

La MAO es un enzima que se encuentra ampliamente distribuido por todo el organismo, lo que conlleva un alto número de efectos secundarios. Por lo tanto, aunque es un fármaco indicado en el tratamiento de la depresión no lo es de primera elección. Es uno de los pocos IMAO derivados de hidrazina que aún se encuentran en uso clínico, junto con la fenelzina.

Las monoaminooxidasas son flavoenzimas que catalizan reacciones de desaminación oxidativa, principalmente de aminas aromáticas primarias no ramificadas. Utilizan como cofactor las flavinas que son las formas activas de la riboflavina o vitamina B₂ e intervienen en los procesos redox.

En el SNC, las MAO intervienen en la degradación metabólica de neurotransmisores: noradrenalina, adrenalina, dopamina (catecolaminas) y serotonina. Las MAO periféricas (hígado y tracto gastrointestinal) además de metabolizar las aminas biógenas, también degradan aminas ingeridas en la dieta u originadas en el metabolismo como triptamina y tiamina (ambas presentes en muchos alimentos y también originadas en el intestino por descarboxilación del triptófano y tirosina, respectivamente).

Los IMAO se utilizan para restablecer los niveles de neurotransmisores en el SNC. Sus principales efectos secundarios se deben a la alteración de los niveles de aminas a nivel periférico. Los IMAO no selectivos se utilizan como antidepresivos, ya que la depresión está relacionada con niveles bajos en el SNC de estos dos neurotransmisores.

Una limitación importante de estos inhibidores es que producen el llamado “efecto queso”: provocan crisis hipertensivas cuando se consumen alimentos ricos en tiamina (queso, cerveza, vino, etc.). La inhibición de la MAO A periférica (hepática y gastrointestinal) impide la degradación de la tiamina que se acumula y desplaza la noradrenalina del nervio simpático. La acción vasoconstrictora de ésta produce un aumento de la presión sanguínea. En condiciones normales, el exceso de noradrenalina es degradado por la MAO A y COMT (catecol-*O*-metiltransferasa), pero si la MAO A está inactiva la noradrenalina no se degrada con suficiente rapidez, la presión sigue subiendo y se produce la crisis hipertensiva.

El compuesto que hemos elegido para su síntesis es un inhibidor no selectivo (conocidos como inhibidores suicidas) derivado de la hidrazina (iproniazida, nialamida, isocarboxiazida, fenelzina).

El riesgo de producir crisis hipertensivas de estos compuestos y su hepatotoxicidad junto con el descubrimiento de los antidepresivos tricíclicos (agentes que inhiben la recaptación), ha relegado el uso de los IMAO no selectivos a depresiones que no responden a otros tratamientos.

El mecanismo de acción de este tipo de inhibidores se indica en el siguiente esquema. Es una inhibición suicida ya que la propia enzima cataliza la formación del diazeno que la va a activar.

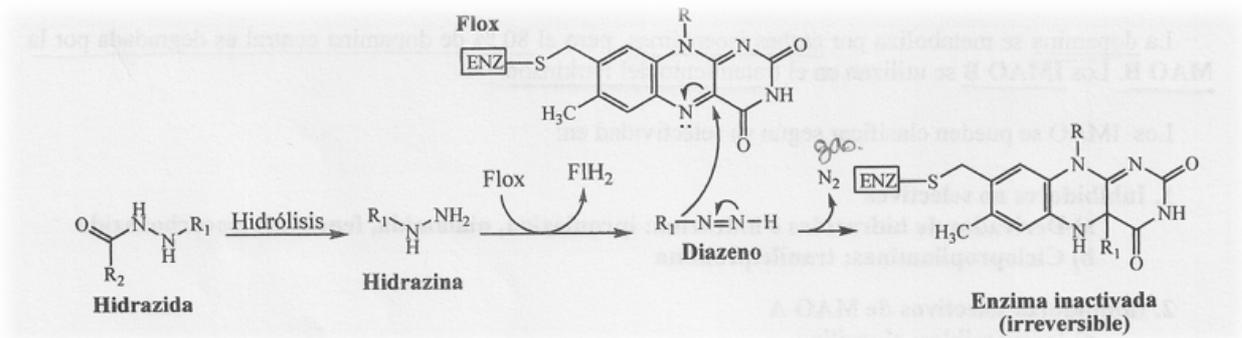


Figura 2: Mecanismo de inhibición de la Isocarboxazida

La isocarboxazida es una sustancia cristalina incolora con muy poco sabor que contiene en su estructura un anillo de isoxazol. En cuanto a su síntesis, se parte de la benzilhidrazina y el éster 5-metilisoxazol-3-carboxilato de metilo, obteniéndose *N'*-bencil-5-metilisoxazol-3-carbohidrazida.

OBJETIVOS

Pretendemos estudiar la síntesis de isocarboxazida a partir de distintas síntesis y patentes encontradas en diversas páginas de publicaciones científicas, comprobando que los métodos detallados son correctos y permiten su elaboración en un laboratorio de prácticas con alumnos y a pequeña escala.

Una vez comprobado que el método de elaboración del fármaco es correcto, intentar adecuar esa síntesis a métodos sostenibles que eviten en la medida de lo posible la contaminación o el uso de gran cantidad de reactivos.

Tras estos estudios se llevarán a cabo una serie de pruebas que nos permitan incorporar esta síntesis a un periodo de prácticas de la asignatura “Métodos Experimentales en Síntesis y Caracterización de Fármacos” impartida por el Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la UCM. Este periodo de prácticas comprende una semana con 3 horas diarias, siendo el tiempo máximo en el que se podría elaborar la síntesis.

MATERIAL Y METODOLOGÍA

Como material bibliográfico hemos empleado distintas síntesis y patentes obtenidas de distintas páginas de publicaciones científicas. En cuanto al material de laboratorio que se emplea para la elaboración de la práctica, se irán describiendo en cada apartado de reacción.

La síntesis que vamos a realizar es una síntesis convergente. Primero obtendremos dos productos que posteriormente pondremos a reaccionar entre ellos para la obtención del producto final. Primero prepararemos el éster de isoxazol y por otro lado bencilhidrazina. Al ponerlos en contacto obtendremos nuestro fármaco isocarboxazida (*N'*-bencil-5-metilisoxazol-3-carbohidrazida)

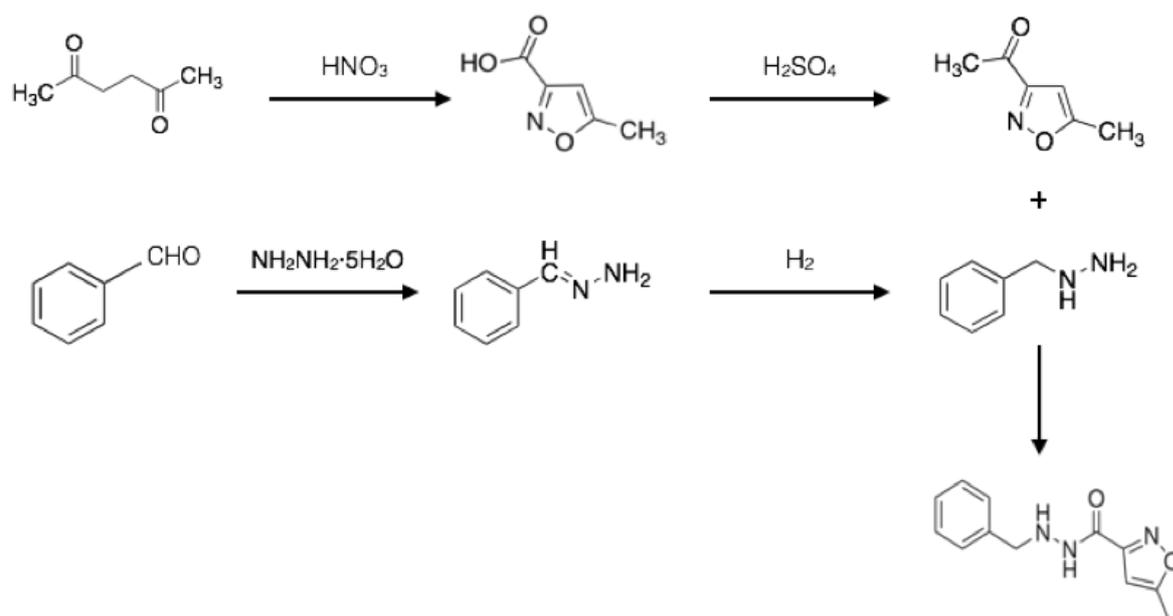


Figura 3: Síntesis de Isocarboxazida

1. Reacción de formación del ácido 5-metilisoxazol-3-carboxílico

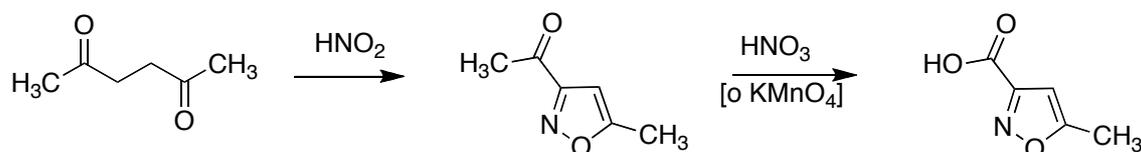


Figura4: Reacción de formación del ácido 5-metilisoxazol-3-carboxílico

En un matraz de fondo redondo se añaden 8 ml de agua y 4,75 ml (lo que equivale a 6,5g) de ácido nítrico (HNO_3). La solución obtenida se calienta a reflujo hasta que sobrepase los 100 °C, siempre con agitación.

En este punto añadimos por la parte superior del refrigerante, muy poco a poco para que no se proyecte, 2,5 ml (2,5 g) de 2,5-hexanodiona. Se calienta a reflujo durante 2 horas más a una temperatura en el baño exterior de 150 °C. La temperatura debe alcanzar los 150 °C para que podamos obtener un rendimiento de al menos, el 30%.

Una vez pasadas las 2 horas se introduce el matraz de reacción en un baño de hielo hasta que precipite todo el compuesto (es importante que se vaya agitando en el baño de hielo para que disminuya la temperatura por toda la mezcla).

Una vez precipitado todo, añadimos 7-8 ml de agua y filtramos bien recogiendo todo el producto. El producto es un polvo blanco con mala fluidez.

El análisis por ^1H y ^{13}C -RMN nos muestra si hemos obtenido el producto deseado.

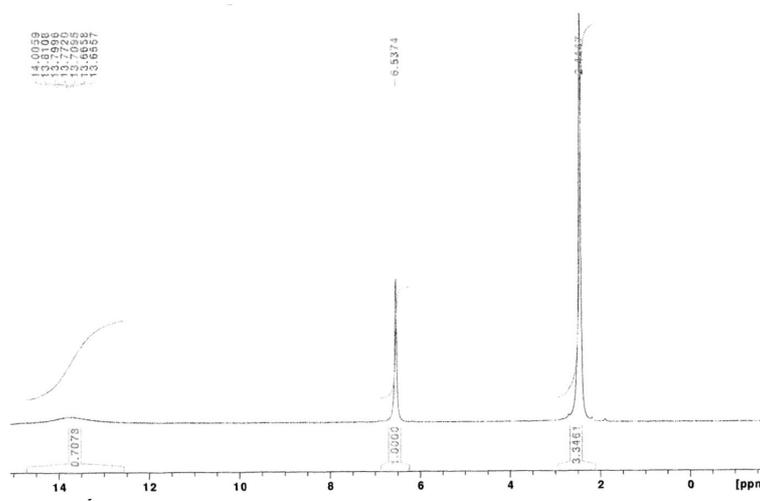


Figura 6: ^1H -RMN del ácido 5-metilisoxazol-3-carboxílico

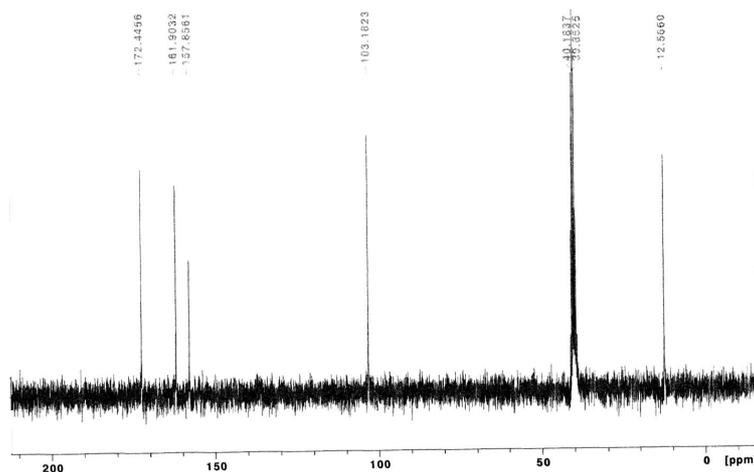


Figura 7: ^{13}C -RMN del ácido 5-metilisoxazol-3-carboxílico

2. Reacción de formación del 5-metilisoxazol-3-carboxilato de metilo

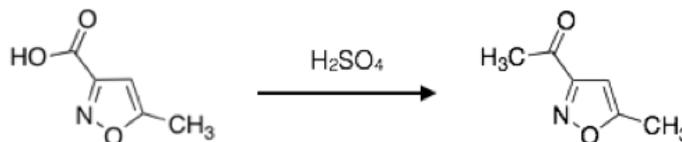


Figura 9: Reacción de formación del 5-metilisoxazol-3-carboxilato de metilo

En un matraz de fondo redondo ponemos 1 g de ácido 5-metilisoxazol-3-carboxílico disuelto en 4 ml de metanol. Para que se esterifique añadimos 0,2 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4).

Lo ponemos a reflujo a una temperatura de $45^\circ C$ durante 2 horas. Una vez pasadas las 2 horas enfriamos la solución a $30^\circ C$ y diluimos con 1,5 ml de agua.

Neutralizamos la reacción hasta un pH de 7 con Hidróxido amónico acuoso (NH_4OH). Enfriamos en un baño de hielo hasta que alcance una temperatura aproximada de $10^\circ C$.

Pasamos el producto que nos queda por un filtro de vidrio y recogemos el producto seco que nos ha quedado. Se lava con un poco de agua para recoger bien todo el producto y por último, se puede secar a vacío a $40^\circ C$. El producto que se obtiene presenta un color rosáceo-blanquecino en forma de polvo.

Esta reacción presenta un rendimiento del 29%. Es necesario comprobar que hemos obtenido este producto para que podamos seguir con el resto de reacciones y para ello como anteriormente hemos realizado un espectro 1H -RMN.

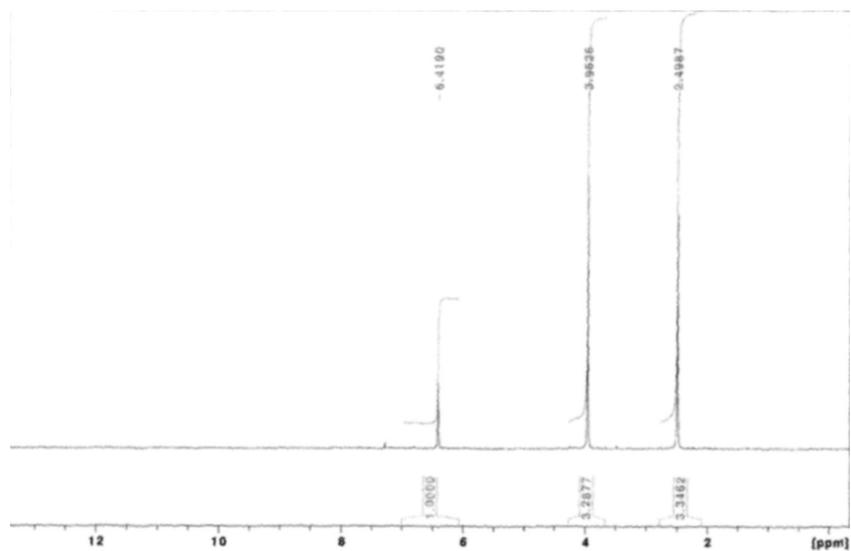


Figura 10: ¹H-RMN del ácido 5-metilisoxazol-3-carboxilato de metilo

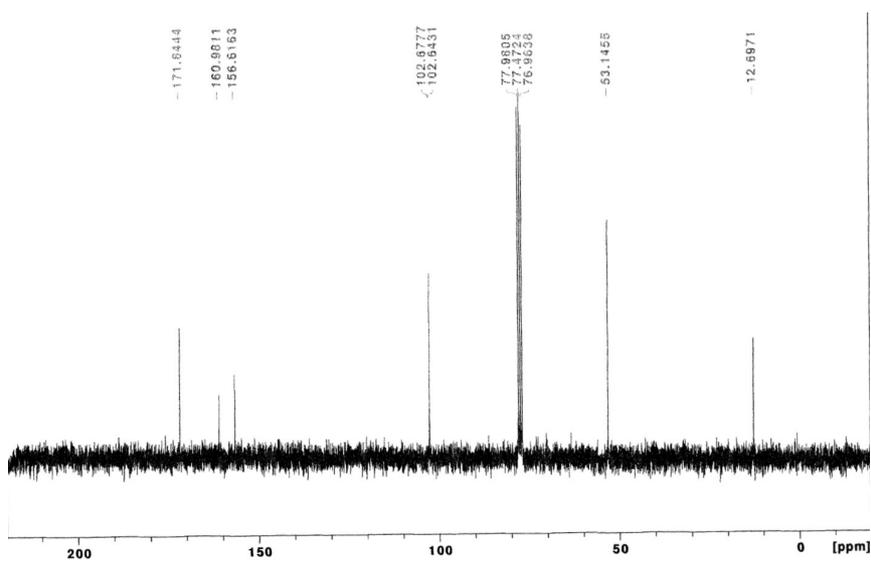


Figura 11: ¹³C-RMN del ácido 5-metilisoxazol-3-carboxilato de metilo

3. Obtención de benzilhidrazona. Hidrato de hidrazina $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Para obtener la benzilhidrazina debemos obtener primero la benzilhidrazona y posteriormente reducirla.

a) Formación de la hidrazona

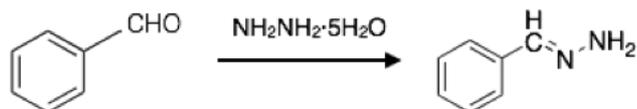


Figura 12: Reacción de formación de la hidrazona

Los reactivos necesarios para llevar a cabo la primera reacción son hidrato de hidrazina, benzaldehído e alcohol isopropílico como disolvente, aunque se pueden emplear otros como metanol o etanol.

Para poder trabajar con el benzaldehído procedemos a la destilación del mismo. El benzaldehído tiende a degradarse durante su almacenamiento, produciendo ácido benzoico lo cual hace que no partamos de una riqueza del 100% y que podamos generar impurezas en las demás reacciones que vayamos a realizar. Por ello, es necesario llevar a cabo la destilación. Para ello cogemos un matraz de 250 ml al que añadimos el benzaldehído, lo ponemos a calentar en un baño maría con una placa calefactora y lo conectamos a un refrigerante. En el otro extremo del refrigerante se coloca una pieza de destilación con dos salidas al que se adaptan 2 matraces de 100 ml. Lo dejamos durante al menos 30 minutos hasta que veamos que se ha recogido suficiente benzaldehído en los matraces pequeños. La primera fracción de la destilación se descarta.

En un matraz de fondo redondo de 50 ml añadimos 1 g (lo que equivaldría a 1 ml) de hidrato de hidrazina y 1,2 ml de alcohol isopropílico (el alcohol isopropílico se puede sustituir por etanol lo cual no modificaría la reacción). Lo colocamos en un baño de hielo que se encuentre aproximadamente a 0 °C sobre un agitador magnético.

En una ampolla de adición añadimos 2 ml de benzaldehído y 2 ml de alcohol isopropílico. La solución obtenida la añadiremos gota a gota sobre el matraz de fondo redondo. Es muy importante que la adición se haga muy lentamente ya que de esta manera se forma menos cantidad de dibencilhidrazona (compuesto secundario).

Cuando la adición haya terminado pasamos el matraz a un baño previamente calentado a 60 °C en agitación y lo dejamos durante 1,5 horas. Esto permite que la dibencilhidrazona formada se hidrolice dejándonos únicamente bencilhidrazona.

Después evaporamos el alcohol isopropílico en un rotavapor intentando que el baño no sobrepase los 60 °C. El producto que tenemos es un producto que funde a los 30 °C por lo que después de la destilación del disolvente se obtiene la bencilhidrazina en forma de aceite en el que se aprecian unas gotitas de agua proveniente del hidrato de hidrazina.

Una vez evaporado el alcohol isopropílico se procede a eliminar el agua del reactivo. Para ello añadimos dietiléter (aproximadamente 50 ml). Pasamos la solución a un erlenmeyer y añadimos un agente secante como el sulfato de magnesio, removemos bien y lo dejamos reposar 3 minutos. Lo filtramos en un filtro de pliegues y llevamos otra vez a evaporar en el rotavapor.

Se obtienen unos cristales aciculares de color amarillo fosforito que cuesta disolverlos ligeramente. También se puede obtener en estado pulverulento.

Esta reacción presenta un rendimiento del 94%.

Después de haber extraído el compuesto, comprobamos mediante espectro de ¹H-RMN el producto obtenido.

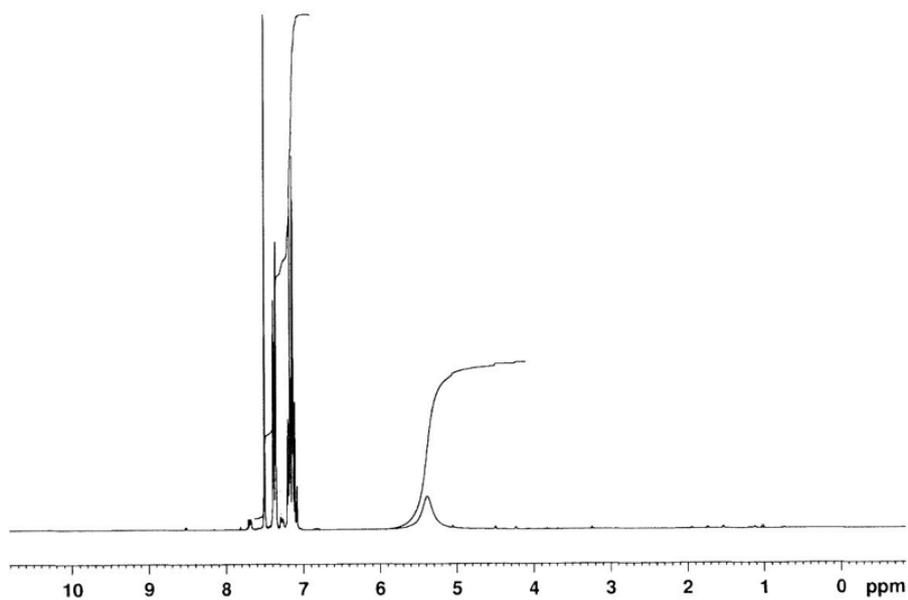


Figura 13: ¹H-RMN de Hidrazona

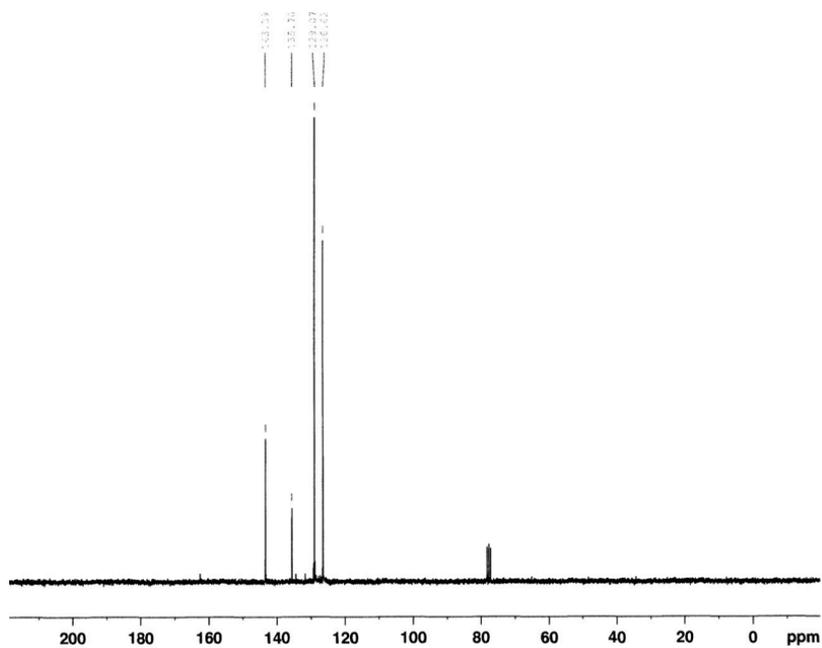


Figura 14: ¹³C-RMN de Hidrazona

Es importante no lavar nunca este producto con acetona ya que reacciona formando otra hidrazona por el extremo del amino libre.

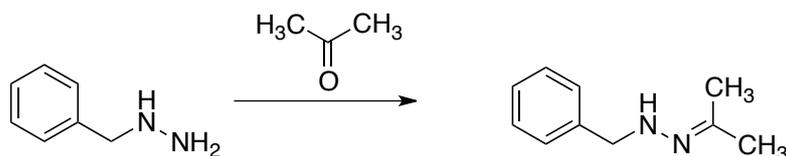


Figura 15: Formación de un nuevo producto en contacto con acetona

b) Reducción de la bencilhidrazona a bencilhidrazina

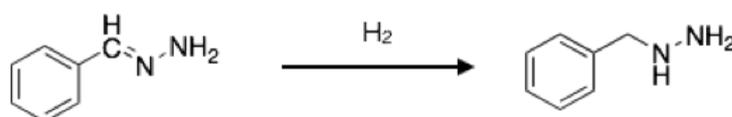


Figura 16: Formación de la bencilhidrazina

La reducción que vamos a llevar a cabo se realiza con carbono-paladio e hidrógeno gas. Es una reacción que puede presentar cierto peligro ya que el carbono-paladio puede inflamarse con el oxígeno ambiental. Esto hace que sea muy importante la eliminación del aire antes de introducir el hidrógeno en el matraz.

Esta reacción permite llevar a cabo el proceso de forma limpia ya que de todas las reacciones de reducción, las hidrogenaciones no precisan grandes gastos de solventes durante su aislamiento, ya que uno de los reactivos es un gas (hidrógeno) y el catalizador es un metal soportado que se elimina por filtración. Este es uno de los principios en los que se basa la Química Sostenible, en evitar la producción de residuos.

En un matraz de fondo redondo añadimos 1 gramos de bencilhidrazona (obtenida en la reacción anterior), 100 mg de carbono-paladio al 10% y 5-10 ml de isopropanol.

El matraz lo tapamos con un septum y pinchamos un globo en él. A continuación se extrae el aire del interior del matraz con una bomba de vacío. Sabremos que hemos sacado todo el aire cuando en el líquido comiencen a aparecer burbujas producidas por la evaporación del isopropanol. Es importante que saquemos bien el oxígeno para no tener problemas con el catalizador metálico.

Añadimos el hidrógeno, en cantidad suficiente para asegurarnos que se va a llevar a cabo la reacción. Es decir, hasta que el globo alcance un tamaño de unos 15 cm de diámetro.

Dejamos el matraz en un baño maría a 50 °C en agitación constante durante 2 horas. Pasado ese tiempo se elimina el carbono-paladio de la reacción. Para ello primero se extrae el hidrógeno mediante una bomba de vacío de la misma manera en la que quitamos el aire anteriormente.

Preparamos un filtro de celite (tierra de diatomeas) en un filtro de vidrio para eliminar bien el carbono-paladio y que no nos queden impurezas. Pasamos nuestra solución por él, limpiando siempre con alcohol isopropílico.

Una vez hemos filtrado, si quisiéramos aislar el producto deberíamos evaporar la solución en rotavapor a temperatura ambiente. Esto es debido a que la bencilhidrazina es un producto muy poco estable a temperatura ambiente. En este caso no vamos a necesitar evaporarlo ya que podemos realizar la siguiente reacción en ese medio. El producto que hemos obtenido se puede guardar en la nevera hasta que lo vayamos a utilizar. En nuestro caso, lo evaporamos para caracterizarlo por RMN y comprobar que la reacción había finalizado.

La patente donde se describe la preparación de este compuesto no especifica ni el tipo de disolvente empleado para la hidrogenación ni el tiempo necesario para la misma. Desgraciadamente, estas dos horas no son suficientes para la completa reacción del compuesto ya que se observa todavía parte del compuesto sin reducir y no conviene dejar durante toda la noche los sistemas de hidrogenación calentando por una posible subida de potencia que pueda hacer saltar los globos llenos de hidrógeno.

4. Reacción final de obtención de isocarboxazida.

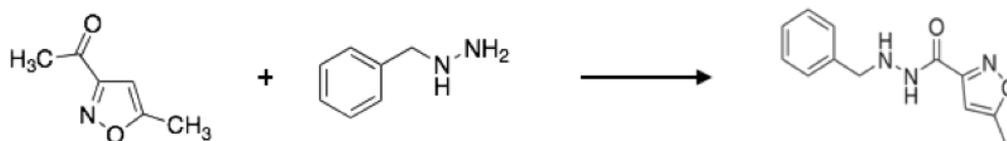


Figura 19: Reacción final de la síntesis

Al matraz que habíamos guardado en la nevera de bencilhidrazina disuelta en alcohol isopropílico se añadiría 1g de 5-metilisoxazol-3-carboxilato de metilo. El disolvente que habíamos elegido para la hidrogenación es el mismo que el que necesitábamos para la preparación del éster para evitarnos la evaporación después de la formación de la hidrazina y su posible descomposición.

Ponemos el matraz en reflujo durante 3 días a baño maría en agitación a una temperatura de 60° C. Pasados los 3 días se filtra el precipitado y se obtendría nuestro producto final.

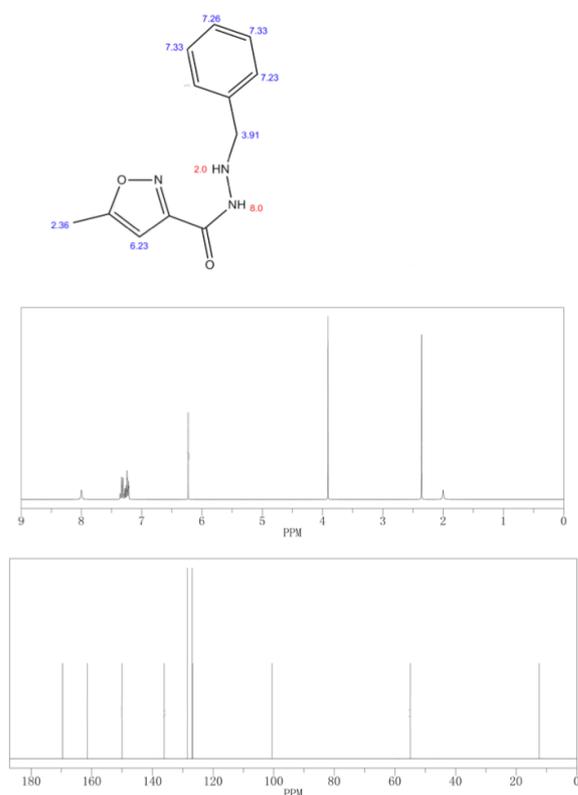


Figura 20: Isocarboxazida, H-RMN y C¹³-RMN

DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

La primera reacción del ácido debe mantenerse durante 2 horas, además para la preparación de materiales de partida y llegar a la temperatura de reflujo se necesitan 15 minutos. Por último se debe filtrar la reacción y enfriarla lo que nos añadiría unos 15 minutos al total. Sumando todo ello 2 horas 30 minutos de elaboración.

El éster se obtiene haciendo reaccionar el ácido con ácido sulfúrico. Para ello se deben emplear al menos 2 horas de reflujo. Para la preparación del reflujo deberíamos sumar 15 minutos. Cuando la reacción termina se debe neutralizar y filtrar, además podemos llevar a cabo un proceso de secado para la eliminación completa del agua lo que nos puede llevar unos 20 minutos. La suma total del tiempo de elaboración sería de 2 horas 35 minutos.

La tercera reacción de síntesis de la bencilhidrazona tiene como punto crítico la adición en frío del benzaldehído al hidrato de hidrazina. Si añadimos el benzaldehído a temperatura ambiente o en caliente podemos generar una alta cantidad de compuestos secundarios como la dibencilhidrazona que posteriormente son difíciles de romper y obtener nuestro compuesto.

La adición tiene un tiempo de realización de unos 15 minutos (contando el tiempo de montaje de la práctica así como el tiempo de adición del compuesto). Luego tenemos que sumarle la hora que dejamos el compuesto reaccionar para eliminar los compuestos secundarios. Por ello, en total tendría un tiempo de realización de casi 2 horas más otra hora más su aislamiento. En total 3 horas.

En la cuarta reacción como hemos comentado en el procedimiento, se debe tener especial cuidado con el catalizador C-Pd ya que es inflamable a temperatura ambiente. Por ello, debemos tener cuidado que durante la reacción no esté en contacto con el oxígeno del ambiente.

La preparación de esta práctica tiene una duración mayor que la anterior. Se necesitan unos 15 minutos para preparar el matraz y pesar los reactivos. Además del tiempo que necesita la reacción (más de 2 horas) para que se produzca la hidrogenación total del compuesto, tiempo durante el que se puede dejar preparado el filtro de celite que necesitamos para eliminar el C-

Pd, la eliminación de la atmósfera de hidrógeno y la filtración final sumarían otros 30 minutos. Esto hace un total de un tiempo de elaboración de superior a las tres horas del periodo de prácticas.

La reacción final es la más larga de todas, en cuanto a preparación sólo nos llevaría 15 minutos, pero el tiempo que debe dejarse reaccionando es de 72 horas como mínimo (3 días). Esto supone un tiempo largo de realización que no supone un problema porque puede combinarse con la realización de otra práctica durante esos días.

CONCLUSIONES

Los procedimientos experimentales llevados a cabo para poner a punto esta práctica presentan modificaciones respecto a las síntesis descritas en las publicaciones. Las síntesis que publican en las patentes son una pequeña guía para saber como comenzar a hacerla pero hemos mejorado las condiciones de reacción que se han encontrado en ellas durante la puesta a punto cada uno de los pasos. Muchas de las síntesis que se encuentran no vienen detalladas las temperaturas o tiempos de reacción necesarios para la obtención de los productos. Además se añade la dificultad de que muchos de ellas se realizan a gran escala para la obtención de fármaco en industria y esos datos se deben adaptar a una síntesis de laboratorio.

En general, en la mayoría de las reacciones hemos empleado el alcohol isopropílico como medio de disolución lo que nos ha permitido no desechar este producto de una reacción a otra. Los alcoholes además no son un disolvente complejo de eliminar ya que no son especialmente tóxicos al no presentar halógenos, pero se deben calentar a temperaturas por encima de los 80°C por lo que pueden presentar algún tipo de dificultad. El alcohol isopropílico nos ha permitido no desechar este producto de una reacción a otra, lo que supone un ahorro de tiempo y energía.

El único reactivo con un manejo más complicado es el C-Pd, que puede llevarnos a situaciones complicadas en el laboratorio si se inflama. Además, se debe tener un depósito especial para poder eliminarlo de forma correcta.

Podemos decir que en general hemos mantenido métodos sostenibles en la elaboración de la práctica, aunque aún podríamos mejorar estos métodos para que todos los disolventes empleados fueran el mismo y poder reutilizarlo en el resto de reacciones.

Como hemos dicho el periodo de prácticas de la asignatura “Métodos Experimentales en Síntesis y Caracterización de Fármacos” tiene una duración de 15 horas, repartidas en 3 horas diarias durante 5 días. Nuestra reacción tiene un periodo de realización superior a 3 días (más de 9 horas) (81 horas en total con el tiempo de espera).

En principio, podríamos decir que esta síntesis se pudiera realizar en ese periodo de tiempo al tratarse de una síntesis convergente que permite realizar dos reacciones diarias. Todas nuestras reacciones tienen una duración media de 2 horas 30 minutos, cada día tenemos 3 horas para realizar las prácticas a excepción de la reducción de la hidrazona que necesita un periodo de tiempo superior al de una sesión de prácticas y es peligroso dejarlos montajes funcionando toda la noche.

Además, debemos tener en cuenta que la realización de esta síntesis se ha hecho en un laboratorio con todos los productos preparados para una persona. En el laboratorio de prácticas debemos sumar tiempos extra que se producen por las colas para coger los reactivos, las explicaciones del profesor para elaborar correctamente las reacciones, las dudas que surgen durante la realización de las prácticas, etc.

Si añadimos estos tiempos a la elaboración de la práctica sería difícil adaptarla al tiempo disponible en el programa ya que se necesitaría añadir aproximadamente entre media y una hora extra para la elaboración de la práctica cada día. Por lo tanto, concluimos que la síntesis de este fármaco no se puede incluir en el programa de prácticas de esta asignatura.

BIBLIOGRAFÍA

1. MARPLAN, VALIDUS PHARMACEUTICALS (2012). *Prospecto*.
<<http://marplan.com/wp-content/uploads/sites/6/2014/06/marplan-prescribing-info.pdf>> [Consulta: 4 – Abril – 2015]
2. AVENDAÑO, C. (1993) *Libro de Introducción a la Química Farmacéutica*.
Mcgraw Hill Editorial
3. US 6,518,254 B1 (2003), *U.S. patent Ribonucleoside-Tribose*
4. Thiel, O y Achmatowicz, M. (2013). *Palladium-Catalyzed Triazolopyridine Synthesis: Synthesis of 7-Chloro-3-(2-Chlorophenyl)-1,2,4-Triazol[4,3-a]Pyridine*
5. Asís, S. , Bruno, A. , Martínez, A. , Sevilla, M. , Gaozza, C. , Romano, A. , Coussio, J. y Ciccía, G. “Diarylsemicarbazones: synthesis antineoplastic activity and topoisomerase I inhibition assay” en *Il Farmaco* 54 (1999) 517-523
6. Street, J. et al. “Synthesis and Biological Evaluation of 3-Heterocyclyl-7,8,9,10-tetrahydro-(7,10-ethano)-1,2,4-triazolol[3,4-a]phthalazines and Analogues as Subtypes-Selective Inverse Agonists for the GABA_Aα5 Benzodiazepine Binding Site” en *Journal of Medicine Chemistry* (2004), Vol. 47, No. 14. 3642-3657.