

MINEKO TOMINAGA

PREPARAÇÃO E PROPRIEDADES DE
DERIVADOS IODADOS DA HISTAMINA

Tese de doutoramento apresentada
ao Instituto de Biologia da
Universidade de Campinas.

Orientador:

Prof. ANTONIO C. M. PAIVA

Campinas

-1968-

Aos meus pais

AGRADECIMENTOS

Desejamos inicialmente, expressar nossa profunda gratidão ao Prof. Antonio Cechelli de Mattos Paiva a cujo convite ingressamos na carreira universitária. Foi o seu exemplo fecundo que nos despertou o interesse pela pesquisa. Este trabalho é fruto de sua orientação segura e constante tanto na nossa Universidade, como nos Laboratórios do Departamento de Biofísica e Fisiologia da Escola Paulista de Medicina.

Entre as pessoas cujo auxílio devemos agradecer destacamos a Dra. Therezinha Bandiera Paiva, pela colaboração em tôdas as fases dêste trabalho, bem como pelas valiosas sugestões apresentadas.

Somos ainda imensamente gratos:

Ao Prof. Aldo Focesi Jr. e aos demais colegas do Departamento cujo elevado espírito de compreensão e colaboração muitos nos auxiliaram.

Aos Profs. Paulo Carvalho Ferreira, Mário Motidome e Wolfgang F. Seidel, pelos incentivos recebidos e por nos terem possibilitado a síntese de N-acetil-histamina.

Ao Dr. Ito Cracel e ao Eng. Alberto Hashimoto, por - nos terem possibilitado as análises espectral ao infra-vermelho e de ressonância magnética nuclear.

Às Srtas. Maria do Carmo Biajoni e Maria Angela Carotta, pelos trabalhos datilográficos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo auxílio concedido a esta realização.

Finalmente a todos os colegas e amigos que conosco cooperaram dentro do mais alto espírito universitário.

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO	1
1. Estrutura da histamina e sua relação com a atividade biológica	1
2. Iodação dos compostos imidazólicos	4
3. Objetivos dêste trabalho	5
II. MATERIAIS E MÉTODOS	7
1. Reagentes e solventes	7
2. Caracterização dos compostos obtidos	7
3. Espectros de ressonância magnética nuclear ...	7
4. Espectrofotometria	7
5. Titulações eletrométricas	8
6. Cromatografia em camada delgada	9
7. Determinação da atividade biológica	9
III. RESULTADOS	11
1. Síntese da moniodohistamina	11
2. Síntese da diiodohistamina	14
3. Preparação da N-acetil-histamina	17
4. Preparação de N-acetil-moniodohistamina	20
5. Preparação de N-acetil-diiodohistamina	23
6. Cromatografia das iodohistaminas em camada delgada	26
7. Identificação dos produtos de inativação da histamina pelo iôdo	28
8. Atividade biológica dos derivados iodados da histamina e N-acetil-histamina	28
9. Titulações eletrométricas	30
10. Estudo espectrofotométrico de reação de iodação da histamina	40
IV. DISCUSSÃO	48
1. Iodação da histamina e da N-acetil-histamina ..	48
2. Titulação de histamina	50
3. Conformação da histamina	50
4. Conformação dos derivados iodados	52
5. Atividade biológica	54

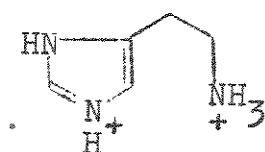
V. RESUMO E CONCLUSÕES	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

I. INTRODUÇÃO

1. Estrutura da histamina e sua relação com a atividade biológica

A histamina é uma amina biógena que desde a sua descoberta no início deste século, por Windaus¹, vem sendo estudada exaustivamente por muitos pesquisadores. A importância biológica dessa substância ficou comprovada quando se demonstrou a sua existência em vários tecidos normais e pela verificação de que havia liberação de histamina em numerosas condições patológicas, como nos choques anafilático e cirúrgico e nos estados alérgicos em geral. Quanto à ação farmacológica a histamina atua principalmente: sobre o músculo liso provocando espasmos devidos à contração dos brônquios, útero e do intestino; sobre os capilares e arteríolas provocando a sua dilatação e aumento da permeabilidade da parede capilar resultando no edema e queda de pressão arterial; e sobre as glândulas de secreção estimulando-as no sentido de maior produção.

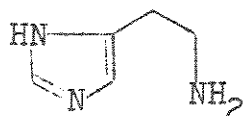
Quimicamente a histamina é o 4(5)-(beta-aminoetil)-imidazol e, conforme o seu estado de protonação, pode existir nas formas catiônica divalente (I), catiônica monovalente (II), neutra (III) e aniônica (IV).



(I)



(II)



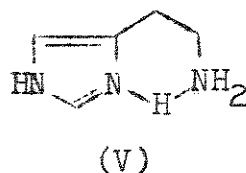
(III)



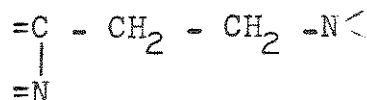
(IV)

Nas condições fisiológicas a espécie predominante é a catiônica monovalente.

A relação entre a atividade biológica e a estrutura da histamina tem sido investigada por muitos autores. Niemann e Hays², baseados na forma protonada do amino grupo da cadeia lateral e na atividade histamínica do composto β (2 piridil)-etilamina³, sugeriram que, a atividade da histamina está relacionada com a possibilidade dessa molécula assumir, uma conformação estabilizada pela formação de ponte de hidrogênio intramolecular entre o amino grupo da cadeia lateral e o nitrogênio piridínico do anel:



Por outro lado, um estudo da relação entre a estrutura e a atividade da histamina e de diversos compostos análogos levou Lee e Jones⁴ a propor que a parte da molécula importante para a sua atividade seja o seguinte grupo:



onde $=\text{C}-\text{N}=$ é uma porção do núcleo aromático. Além disso, para aqueles autores, o tamanho e a estrutura do anel aromático também são fatores importantes para a atividade da histamina. Observaram que todas as substâncias ativas apresentavam uma estrutura favorável à formação da ponte de hidrogênio intramolecular proposta por Niemann e Hays². Algumas das substâncias inativas também tinham a possibilidade de apresentar essa ponte de hidrogênio, porém não possuíam o fragmento estrutural considerado fundamental para a atividade histamínica.

Garforth e Pyman⁵ prepararam derivados da histamina com o amino grupo alquilado. O estudo da atividade histamínica desses derivados, feito por Vartiainen⁶, demonstrou que a alquilação produz redução daquela atividade, e estes resultados foram mais tarde confirmados por Huebner, Turner e Scholz⁷

e Huebner⁸. Para Barlow⁹ este fato parece indicar que o amino grupo, na sua forma catiônica, sirva como um ponto de ligação para o receptor. Este autor põe em dúvida que a presença da ponte de hidrogênio seja essencial para a atividade e não esteja apenas com ela associada aleatoriamente¹⁰. Hoffmann¹¹, por sua vez, não julga provável a existência da referida ponte de hidrogênio nas condições fisiológicas, mas em trabalhos recentes^{12,13,14} a hipótese da ponte de hidrogênio intra-molecular na histamina é aceita sem contestação. Parece-nos, entretanto, que tal conclusão só poderia ser alcançada após um maior estudo experimental do problema.

As substituições e as alterações no anel imidazólico provocam uma redução abrupta da atividade, fato que parece estar ligado com a mudança de tamanho e forma da molécula⁴ e mudança da distribuição dos eletrons no anel. Entre as substituições no anel imidazólico, cujo efeito sobre a atividade histamínica foi estudado¹⁵, a metilação na posição 2 resultou na queda da atividade sobre o músculo liso para 30% e da atividade sobre a pressão arterial para 15% da observada com a histamina¹⁶. A metilação nas demais posições produziu redução muito acentuada ou abolição das atividades da histamina. A 2-fenil-histamina também apresenta atividade miotrópica reduzida⁸ e a introdução de um grupo tiol na posição 2, praticamente abole a atividade da histamina¹⁷. A presença de uma carboxila na posição 2 reduz de cerca de vinte vezes a atividade da 2-metil-histamina¹⁸. Outras substituições estudadas e que aboliram a atividade foram a introdução de um radical benzila na posição 1¹⁹ e dos radicais fenilazo e para nitro-fenilazo na posição 2²⁰.

O problema da substituição por iôdo no anel imidazólico da histamina surgiu com a verificação, por Paiva e cols.^{21,22}, de que a histamina perdia a sua ação sobre o íleo isolado de cobaia, quando era previamente incubada com iôdo em meio neutro ou alcalino. Demonstraram que se tratava de uma reação química do iôdo com a histamina e não de uma ação do iôdo sobre a preparação farmacológica. Pela titulação dos cátions hidrogênio liberados durante a incubação, constataram a egiên

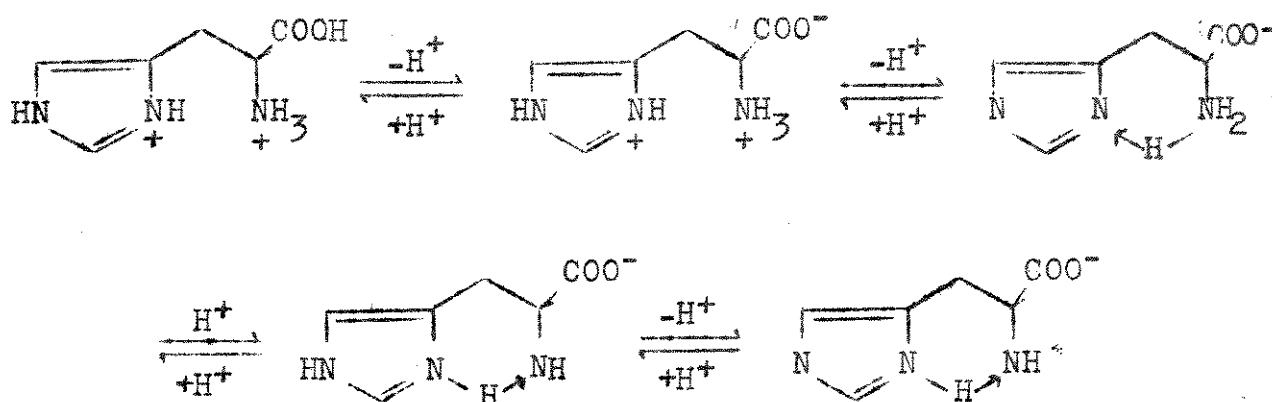
cia de iodação na molécula. A influência do pH na inativação da histamina pelo iodo levou-os à conclusão de que a velocidade de reação dependia do estado de protonação do anel imidazólico. Através de cromatografia em papel do produto de incubação com iodo radioativo verificaram aqueles autores a presença de uma única mancha, não se conseguindo entretanto o seu isolamento para a melhor caracterização.

2. Iodação de compostos imidazólicos

As reações de iodação do imidazol e da histidina foram descritas por Pauly e Gundermann²³ em 1908. No meio alcalino o imidazol apresenta-se na forma de ânion monovalente e sofre ataque eletrófilo com a formação de 2-4-5-triiodo imidazol. A monoiodo histidina e a diiodo histidina foram sintetizadas e isoladas por Brunnings²⁴ pela adição de iodo dissolvido em hexano, à histidina dissolvida em solução de hidróxido de sódio.

Pela iodação limitada de 4(5)-metil-imidazol Pauly e Arauner²⁵ obtiveram 2-iodo-4(5)-metil-imidazol e concluíram que a substituição inicial no anel imidazólico ocorria na posição 2. Entretanto Grimison e Ridd²⁶, através do estudo cinético da iodação dos 2-deutero, 4,5-dideutero e 2,4,5-trideutero imidazóis mostraram que a substituição inicial ocorre na posição 4(5).

Na síntese dos derivados iodados da histidina, Brunnings encontrou resistência à introdução de iodo no anel imidazólico. Pela titulação eletrométrica dos derivados iodados obtidos, verificou que o efeito da iodação sobre a ionização do amônio grupo da cadeia lateral, era demasiado grande para ser explicado pelo efeito indutivo do iodo. Baseado nestas observações Brunnings propôs a existência de uma ponte de hidrogênio intramolecular entre o nitrogênio piridínico do anel imidazólico e o nitrogênio do íon amônio da cadeia lateral. Segundo esse autor as estruturas das diferentes formas de histidina, conforme seu grau de protonação, seriam as seguintes:



O quelato proposto por Brunnings envolve um anel de 6 elementos, que apresentaria estabilidade. Isto poderia explicar os valores relativamente baixos do pK do grupo amônio nos derivados iodados, assim como a dificuldade na reação de iodação, pois segundo alguns autores^{24,27,28} o mecanismo de iodação do imidazol requer a participação do nitrogênio do anel, formando-se inicialmente um intermediário N-iôdo com posterior rearranjo da molécula e fixação do iôdo ao carbono.

3. Objetivos dêste trabalho

O estudo da inativação da histamina pelo iodo²², sugeriu a possibilidade de que a iodação do anel imidazólico cause a perda da atividade. Entretanto, isto não foi demonstrado por não se ter isolado o produto de iodação e por não se terem ainda descritos os derivados iodados da histamina. No presente trabalho procedemos a síntese da monoiodo e da diiodohistamina, com a intenção de determinar a sua atividade e de compará-las cromatograficamente com o produto da inativação da histamina pelo iôdo, anteriormente descrita. Pretendemos também investigar a possível atividade anti-histamínica dêsses derivados. Procedemos, também, a síntese da mono e da N-acetil-diiodo-histamina, compostos ainda não descritos, com o objetivo inicial de empregá-los como intermediários na preparação das mono e diiodohistamina.

Procuramos caracterizar todos os compostos obtidos por meio dos espectros infra-vermelho, de ressonância magné

tica nuclear e pela titulação eletrométrica em diferentes temperaturas, com a finalidade de obter dados, que melhor esclareçam o problema da conformação da histamina e de seus derivados.

Também foi nosso objetivo procurar evidências espectrofotométricas da existência de um complexo intermediário na reação de iodação da histamina, com vistas à possível interpretação da cinética da iodação sob o ponto de vista mecanístico.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Reagente e solventes

Foram empregados dois tipos de reagentes e solventes, segundo o grau de pureza: a) Reagente para análise: Di-cloridrato de histamina (Carlo Erba), Iôdo ressublimado (Baker), Hidróxido de sódio (QEEL), Anidrido acético (Merck), Ácido clorídrico d=1,19 (Baker), Alumina neutra para cromatografia (Merck), Ácido pícrico (Merck), Acetona (Baker), Hidróxido de amônio (Merck), Sílica gel G (Merck), n-Butanol (Merck), Metanol (Merck), Dietilamina (Merck), Carbonato de sódio (Baker), Ácido cítrico (Reagen), Fosfato dibásico de sódio (Baker), Cloreto de acetil-colina (Sigma), Cloreto de sódio (Baker), Cloreto de cálcio (Baker), Cloreto de magnésio.6H₂O (Baker), Cloreto de potássio (Baker), Fosfato dibásico de sódio (Reagen), Glicose (Merck), Ftalato ácido de potássio (Merck), Fosfato monobásico de potássio (Reagen), Borato de sódio (Baker), Óxido de deutério (Merck); b) Outros reagentes: Ácido sulfanílico diazotado²⁹, n-Hexana (Herzog) Alcool etílico absoluto (QEEL).

2. Caracterização dos compostos sintetizados

O ponto de fusão foi determinado em um aparelho Kofler (Reichert), com termômetro calibrado.

As análises elementares foram feitas pelos "Galbraith Laboratories, Inc.", Knoxville, Tennessee, E.U.A.

3. Espectros de ressonância magnética nuclear

Foram obtidos em espectrômetros Variam T-60 e Perkin-Elmer R-10, utilizando-se como referência interna a água e em alguns casos a acetona. As amostras eram dissolvidas em água deuterada, acidificada com ácido clorídrico, na concentração aproximada de 100 mg/ml.

4. Espectrofotometria

Para o estudo cinético da reação de iodação da

histamina utilizou-se um espectrofotômetro Beckman, modelo LB, e cubas de sílica fundida de 1 cm de espessura. Todas as experiências foram realizadas à temperatura de 30°C, obtida pela circulação de água a essa temperatura através de serpentinas embutidas no aparelho. A água de temperatura constante, impulsionada por uma bomba centrífuga, provinha de um banho termoregulado "FORMA-TEMP". Durante o período das leituras a temperatura do interior da câmara do espectrofotômetro pode ser mantida dentro de $\pm 0,1^\circ\text{C}$.

Os espectros infra-vermelho foram feitos na fase sólida (pastilhas de KBr) na concentração de 2 mg/300 mg, utilizando-se espectrofotômetros Beckman IR-5 e Unicam S.P.200.

5. Titulações eletrométricas

Foram feitas com um pH-metro Radiometer, modelo PHM 4c, com eletrodo de vidro G202B e eletrodo de calomelano K100, equipado de agitador magnético e instalado no interior de uma gaiola de Faraday para melhor evitar possíveis interferências eletrostáticas. As soluções eram colocadas em um recipiente provido de jaqueta através da qual se fazia circular a água de um banho de temperatura constante (FORMA-TEMP), onde a variação era da ordem de $\pm 0,1^\circ\text{C}$. O pH-metro era calibrado antes de cada titulação com soluções tampão preparadas de acordo com as recomendações do "National Bureau of Standards"³⁰. Após a calibração com tampão fosfato 0,025M (pH = 6,855 a 25°C) a sensibilidade da resposta era conferida com os tampões borato 0,01M (pH = 9,18 a 25°C) e ftalato 0,05M (pH = 4,010 a 25°C). A máxima tolerância para discrepâncias neste intervalo de pH de 4 a 9 foi de 0,03 unidades de pH. Durante a titulação e calibração as soluções eram borbulhadas com nitrogênio e a verificação da calibração ao fim de cada titulação nunca apresentou discrepância maior do que $\pm 0,015$ unidades de pH. Aproximadamente 100 μmoles da substância a ser titulada eram dissolvidos em 25 ml de solução de KCl 0,1M dentro da câmara de titulação. A solução de hidróxido de sódio ou de ácido clorídrico aproximadamente 1 N, com o título rigorosamente determinado era

adicionada com uma seringa calibrada "Aglá", adaptada a um micrômetro "Burroughs Wellcome" graduado em 0,01 mm. Cada adição de ácido ou base era feita de forma a provocar uma variação de cerca de 0,1 unidades de pH. O solvente era titulado da mesma maneira e os cálculos dos pontos experimentais da titulação em cada pH, eram feitos usando-se os valores da atividade aparente dos íons hidrogênio obtidos da titulação do solvente através das equações:

$$\text{pH} = -\log [\text{H}^+] - \log \gamma_{\text{H}}' \quad (1)$$

$$\text{pK}_w - \text{pH} = \text{pOH} = -\log [\text{OH}^-] - \log \gamma_{\text{OH}}' \quad (2)$$

Os valores de pK foram obtidos graficamente pela equação de Handerson-Hasselbalch e extrapolados para a condição de força iônica (μ) nula usando-se uma forma simplificada da equação de Debye:

$$\text{pK}_{(\mu=0)} = \text{pK} - 0,5 \sqrt{\mu} / (1 + \sqrt{\mu}) \quad (3)$$

6. Cromatografia em camada delgada

Foram utilizadas placas de vidro de 20x20 cm e 10x20 cm sobre as quais se aplicava manualmente uma camada fina e uniforme de gel de sílica G. As placas eram ativadas em estufas a 105°C por 30 minutos. Os sistemas de solventes empregados, com as respectivas proporções em volume, foram os seguintes: a) n-butanol saturado com hidróxido de amônio a 50% (v/v); b) n-butanol:metanol:dietilamina 85:5:1; c) fenol saturado com água; d) etanol:acetato de etila:água:hidróxido de amônio concentrado 50:40:10:1; e) n-butanol saturado de hidróxido de amônio a 10% (v/v). As cromatoplacas foram reveladas com reagente de Pauly modificado²⁹, preparado no momento do uso pela dissolução de 0,1 g de ácido sulfanílico diazotado em 20 ml de solução de carbonato de sódio a 10%.

7. Determinação da atividade biológica

Os derivados iodados da histamina foram ensaiados

dos, quanto à sua atividade espasmogênica, sôbre a preparação do íleo isolado de cobaia. Cobaias de 150 a 200 g de pêsso corporal eram sacrificadas por uma pancada na cabeça e a porção terminal do seu íleo era extraída. Um segmento de cêrca de 3cm de comprimento dêsse íleo era suspenso em um banho de solução de Tyrode, mantido a 33°C, dentro de uma câmara de 5 ml de capacidade. Todos os compostos ensaiadas eram dissolvidos no líquido de Tyrode, cuja composição era a seguinte: 8,0 g de NaCl 0,2 g de CaCl_2 , 0,1 g de MgCl_2 , 0,2 g de KCl, 1,0 g de NaHCO_3 , 0,125 g de NaH_2PO_4 e 1,0 g de glicose em um litro de água. As contrações eram registradas com uma alavanca frontal com ampliação de 3 vêzes e carga de 1,5 g.

III. RESULTADOS

1. Síntese da monoiódohistamina

Dois gramas de dicloridrato de histamina, 200 ml de hidróxido de sódio 0,5 N e 100 ml de n-hexano foram colocados num erlenmeyer de 1 litro e conservados em banho de gelo sob agitação vigorosa, a qual foi mantida durante toda a reação de iodação. Quando a temperatura atingiu 5°C, iniciou-se a adição de 2,76 g de iodo dissolvidos em 300 ml de n-hexano, feita lentamente por meio de um funil de separação. Após a adição que teve a duração de cerca de 90 minutos, manteve-se a agitação por mais 5 minutos. Adicionaram-se 0,56 g de iodato de potássio dissolvidos em 20 ml de água e 10 ml de ácido clorídrico concentrado ($d = 1,19$). O excesso de iodo foi extraído várias vezes com n-hexano. A solução foi concentrada sob pressão reduzida, a 35°C, até a secura completa. O resíduo foi suspenso em 200 ml de etanol absoluto e 10 ml de ácido clorídrico concentrado e refluxado por 30 minutos. Ao adicionar grande quantidade de acetona à solução obteve-se um precipitado branco, volumoso, que foi recolhido e dissolvido em água. Após tratamento com carvão ativo a quente, provocou-se a cristalização pela adição de acetona. Após repetidas purificações obteve-se um rendimento final de 1,5 g. O composto obtido funde-se entre 211 e 213°C com decomposição, é muito solúvel em água, pouco solúvel em álcool, insolúvel em acetona e decompõe-se facilmente no meio alcalino à temperatura ambiente. Na sua análise elementar foi encontrada a composição percentual abaixo indicada (juntamente com a calculada teoricamente para o dicloridrato de monoiódohistamina: $C_5H_{10}N_3ICl_2$):

Calculada: C 19,37; H 3,25; N 13,36; I 40,94; Cl 22,88

Determinada: C 19,12; H 3,22; N 13,63; I 40,84; Cl 22,54

O espectro de ressonância magnética nuclear do composto encontra-se na Fig. 1 e a Fig. 2 mostra o espectro da histamina obtido nas mesmas condições. A comparação desses es-

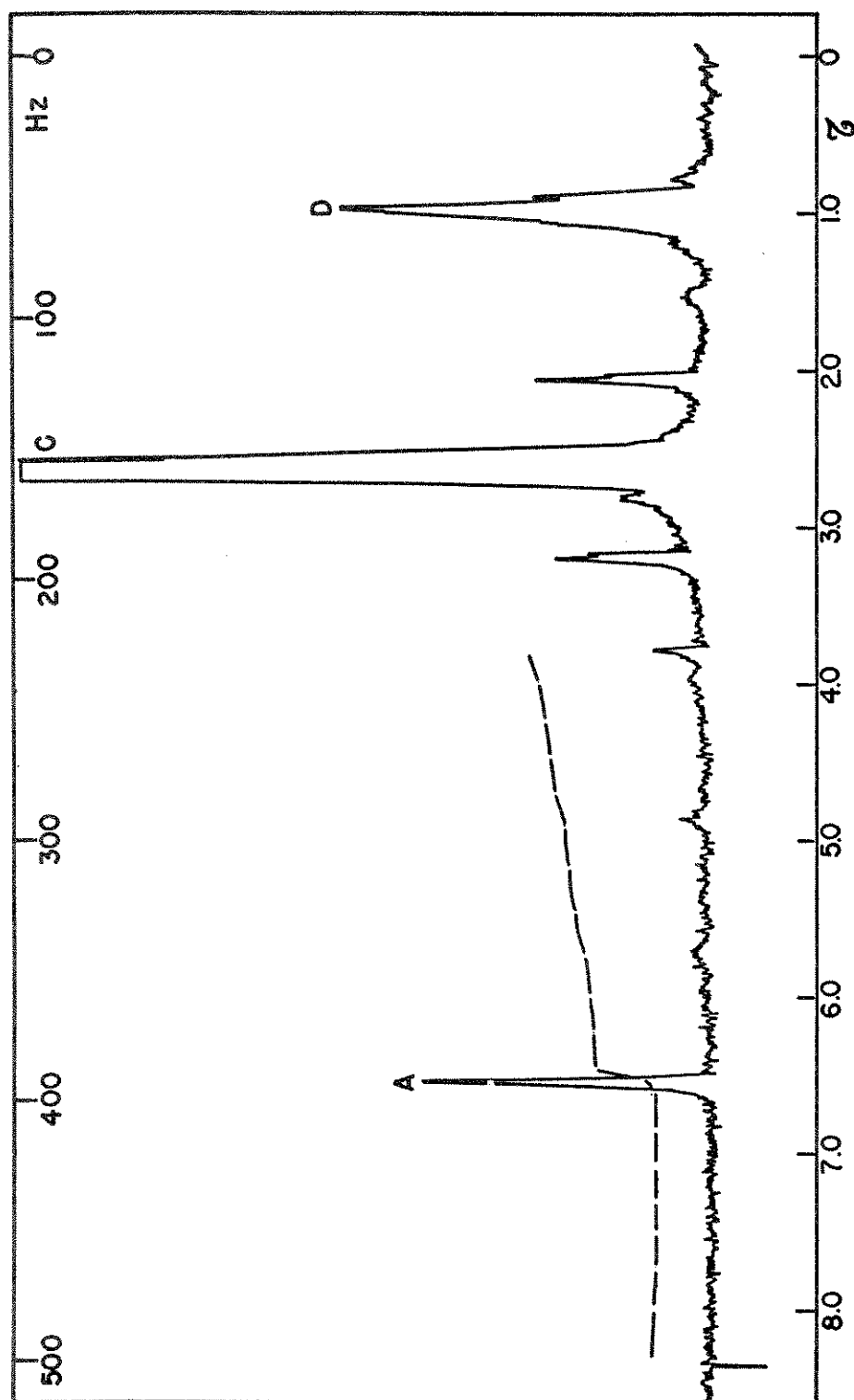


Fig. 1 - Espectro de ressonância magnética nuclear da monohistamina dissolvida em D₂O e HCl 1 aproximadamente 1N. A: H-2; C: H₂O; D: hidrogênios da cadeia lateral. A linha tracejada representa a integração dos picos.

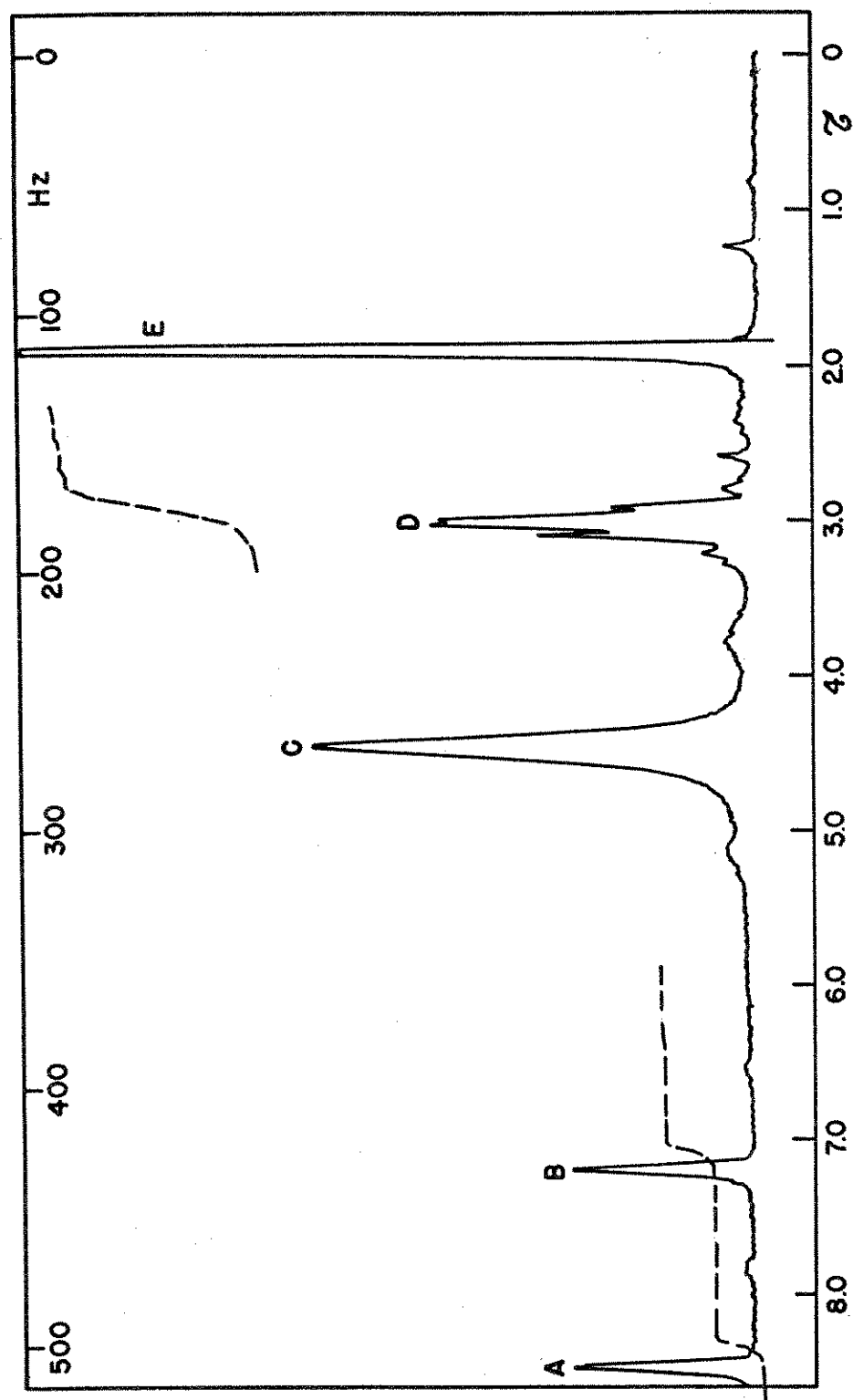


Fig. 2 - Espectro de ressonância magnética nuclear do dicloridrato de histamina em D_2O . A: H-2; B: H-4; C: H_2O ; D: hidrogênios da cadeia lateral; E: Acetona (referência). A integração dos picos é representada em linha tracejada.

pectros com os já descritos na literatura para o imidazol e outros derivados por substituição no anel imidazólico^{12,13,31-35} permite atribuir as ressonâncias observadas nos dois espectros aos protons do anel conforme assinalado nas figuras.

A caracterização do composto obtido, pela análise elementar e espectro de ressonância magnética nuclear, leva à conclusão de que se trata do dicloridrato de monoiódohistamina no qual o átomo de iôdo se encontra ligado ao carbono 5 do anel imidazólico:



Monoiódohistamina

Os espectros infra-vermelho do dicloridrato de histamina e do dicloridrato de monoiódohistamina, na fase sólida, encontram-se nas Figs. 3 e 4 respectivamente.

2. Síntese da diiodohistamina

Um grama de dicloridrato de histamina foi dissolvido em 200 ml de hidróxido de sódio 0,25 N e 100 ml de n-hexano e a essa solução adicionaram-se 3,04 g de iôdo dissolvidos em 240 ml de n-hexano, do mesmo modo descrito para a síntese da monoiódohistamina. A adição teve a duração de 90 minutos e a agitação foi mantida por mais 20 minutos. Adicionaram-se 0,50 g de iodato de potássio dissolvidos em 20 ml de água e 5 ml de ácido clorídrico concentrado. Após a remoção do excesso de iôdo a solução foi concentrada a pressão reduzida, a 35°C, até um volume de 30 ml. A alcalinização com hidróxido de amônio concentrado até pH aproximadamente 9, resultou na precipitação de uma substância de coloração amarelada. Esta foi purificada três vezes por dissolução em ácido clorídrico concentrado, tratamento com carvão ativo a quente e alcalinização com hidróxido de amônio até pH 9. O rendimento foi de 0,85 g. O composto funde, com

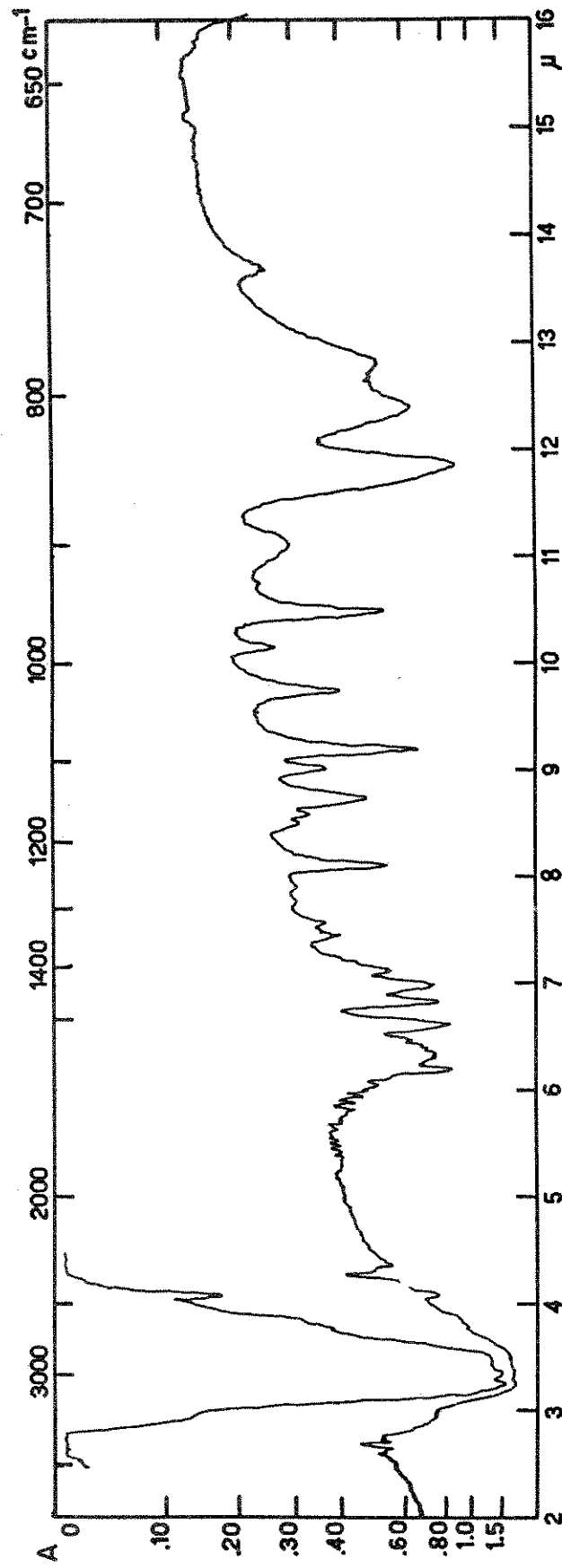


Fig. 3 - Espectro infravermelho do dicloridrato da histamina na fase sólida (pastilha de KBr).

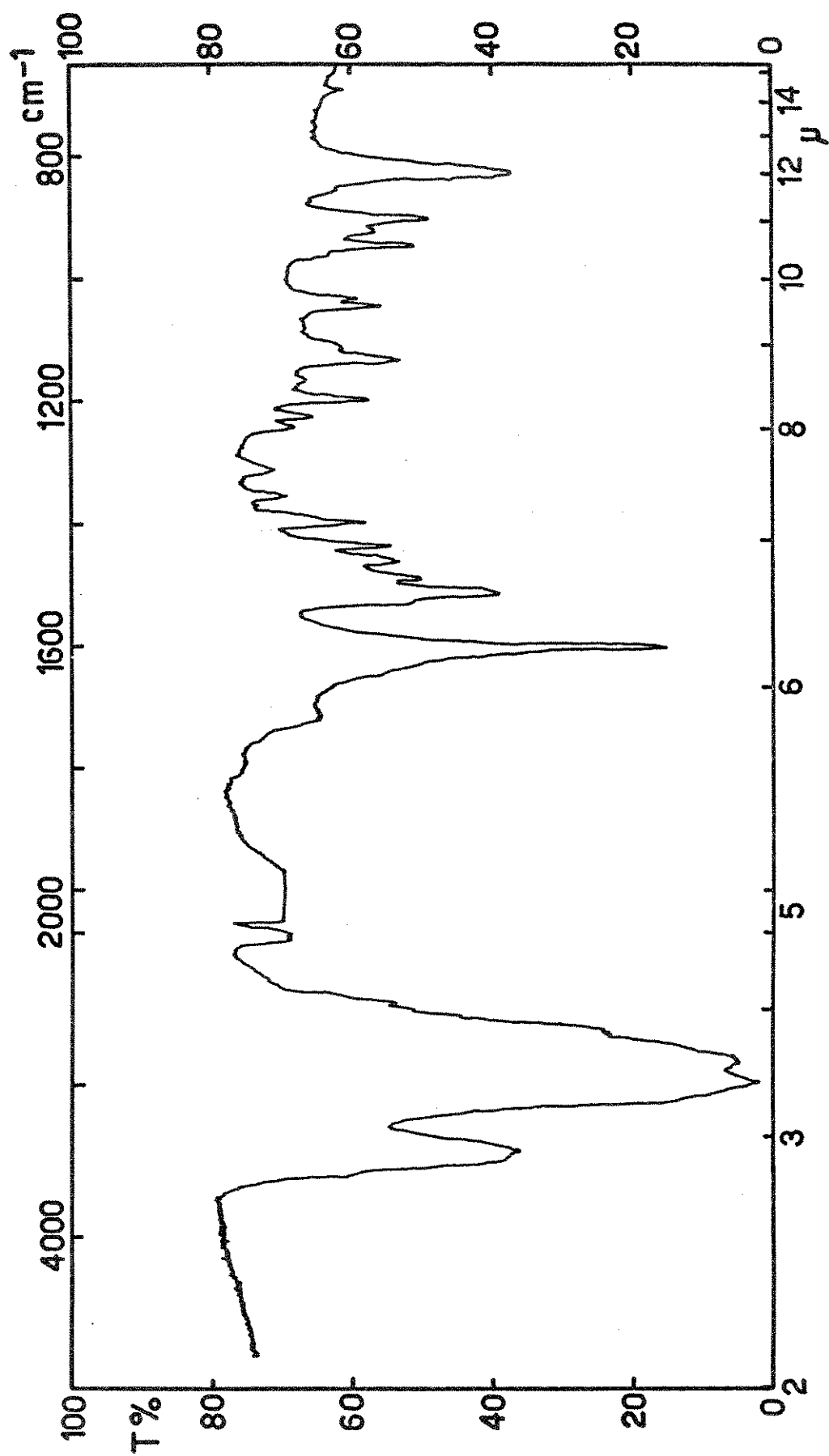


Fig. 4 - Espectro infravermelho do dicloridrato de moniodohistamina (pastilha de KBr).

decomposição, entre 163 e 164°C, é solúvel em meio ácido e pouco solúvel em meio alcalino. Decompõe-se em solução alcalina à temperatura ambiente.

A composição percentual calculada teoricamente para a diiodohistamina ($C_5H_7N_3I_2$) e o resultado da análise elementar do derivado iodado obtido, encontram-se na tabela abaixo:

Calculado: C 16,53; H 1,95; N 11,57; I 69,95

Determinado: C 16,84; H 2,25; N 11,31; I 69,44

A Fig. 5 mostra o espectro de ressonância magnética nuclear do composto obtido. O desaparecimento das ressonâncias devidas aos prótons ligados aos carbonos 2 e 5 do anel imidazólico, juntamente com os dados da análise elementar, permitem concluir tratar-se da diiodohistamina, com a seguinte estrutura:



Diiodohistamina

O espectro infra-vermelho deste composto foi obtido e encontra-se reproduzido na Fig. 6

3. Preparação da N-acetil-histamina

Tentou-se inicialmente obter este composto pelo método descrito por van der Merwe¹⁶, que consiste em refluxar a histamina básica com anidrido acético por uma hora. Pela eliminação do excesso de reagente, obteve-se um óleo de coloração escura. Diversamente do que consta na literatura, não foi possível cristalizar este óleo pela adição de algumas gotas de acetona, nem mesmo após purificá-lo mediante o emprêgo de vários solventes como etanol absoluto, éter absoluto, metanol, clorofórmio e acetato de etila. Utilizou-se o método de purificação introduzido por Tabor e Mosettig³⁶, que consiste em preparar o

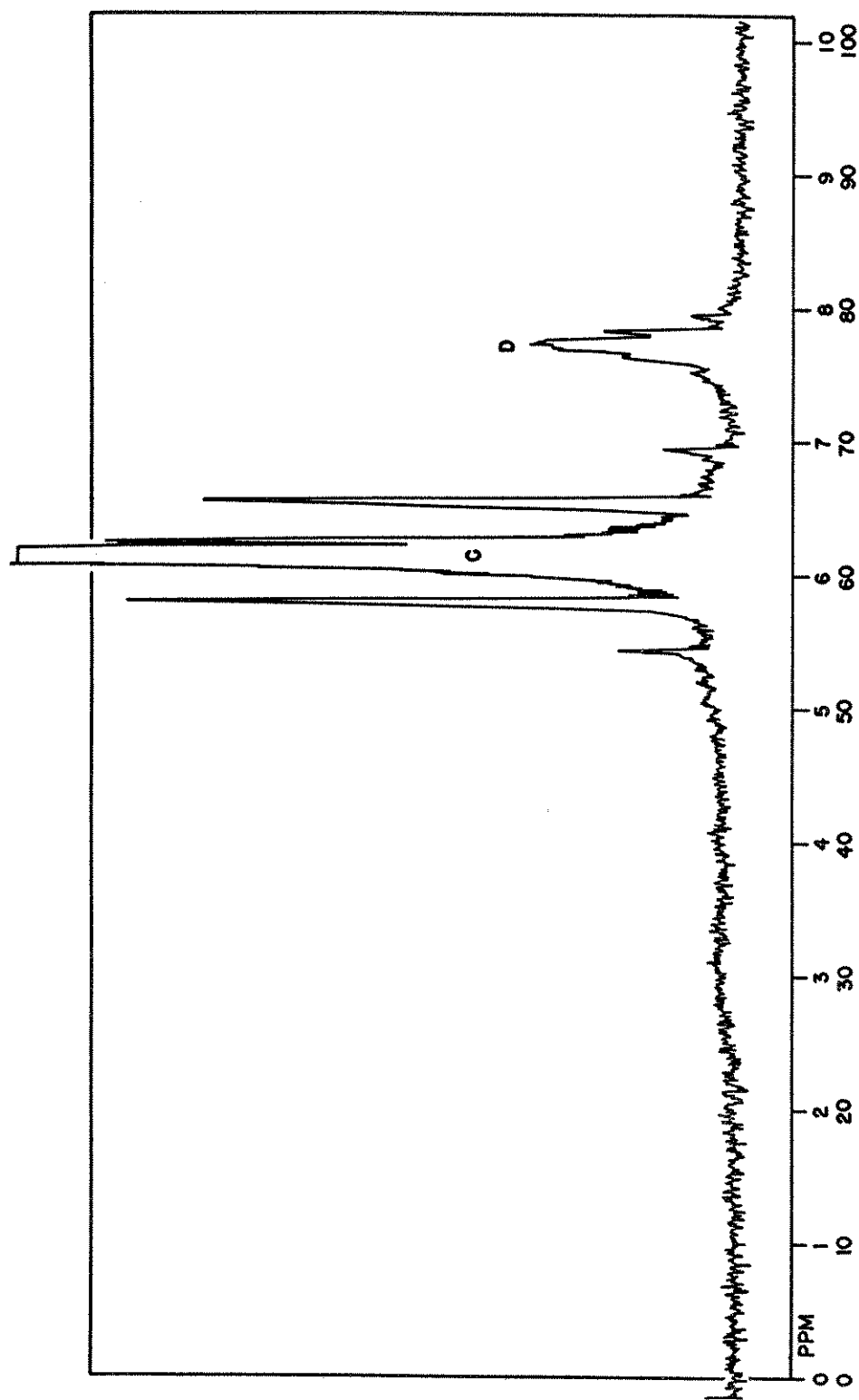


Fig. 5 - Espectro de ressonância magnética nuclear da diiodohistamina em D₂O, HC1 aproximadamente 2N. C: H₂O; D: hidrogênios da cadeia lateral.

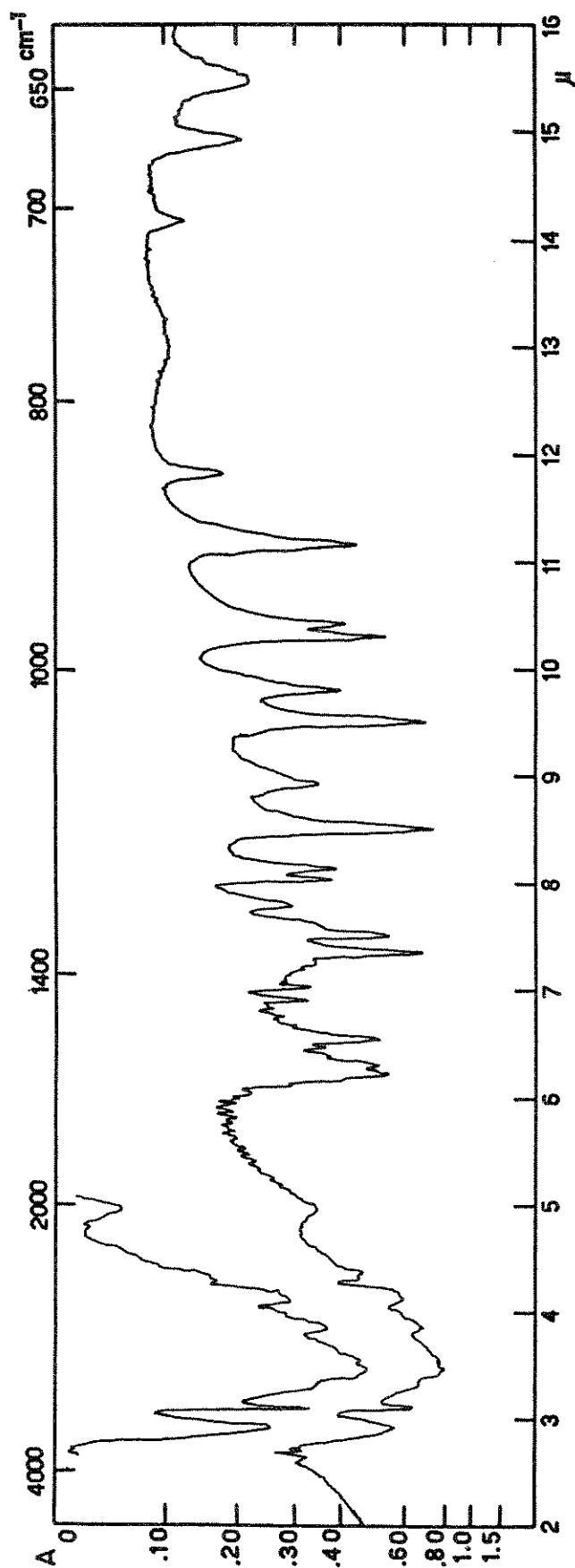


Fig. 6 - Espectro infravermelho da dilodohistamina (pastilha de KBr).

picrato dessa base pela adição, ao óleo obtido, de ácido pícrico saturado em etanol. Friccionando a parede do recipiente, com um bastão de vidro precipitou-se imediatamente o picrato, que fundiu a 164-166°C. Este foi recristalizado de álcool absoluto a quente e deixado à temperatura ambiente. Obtiveram-se cristais em forma de agulha que fundem entre 169 e 171°C. O picrato de N-acetil-histamina, dissolvido em pequeno volume de etanol absoluto, foi colocado em uma coluna de alumina neutra da qual a base (N-acetil-histamina) foi eluída com etanol absoluto. Pela evaporação do solvente obtiveram-se cristais em forma de agulha, que fundiram entre 145 e 146°C. Todavia o rendimento foi muito baixo e procurou-se introduzir modificações no processo de preparação e purificação. O método que se mostrou melhor foi o seguinte: 1,2 g de histamina básica foram dissolvidos em 2,8 ml de anidrido acético e mantidos à temperatura ambiente por uma hora. Evitou-se o refluxo, visto que o aquecimento provocava o escurecimento do produto final. Após a eliminação do excesso de anidrido acético, por aquecimento em banho maria a pressão reduzida, obteve-se um resíduo oleoso de coloração amarela pálida. Este foi eluído de uma coluna de alumina neutra com etanol absoluto e, após a eliminação do solvente, obtiveram-se cristais que fundiram entre 145 e 147°C. O rendimento foi de 1,2 g. Os espectros de ressonância magnética nuclear e de absorção no infra-vermelho referentes à N-acetil-histamina encontram-se nas Figs. 7 e 8.

4. Preparação de N-acetil-monoiódohistamina

A um grama de N-acetil-histamina, dissolvida em 100 ml de hidróxido de sódio 0,2 N, adicionaram-se 1,66 g de iodo, pela técnica já descrita. Após a remoção do excesso de iodo a solução foi concentrada a pressão reduzida, a 40°C, até o volume de 10 ml. Pela alcalinização a pH = 8 e fricção da parede do tubo de ensaio com um bastão de vidro, formou-se um precipitado branco. Este foi purificado várias vezes pela redissolução em meio ácido e posterior alcalinização. O composto obtido funde-se entre 188 e 190°C e o seu rendimento foi de 0,78

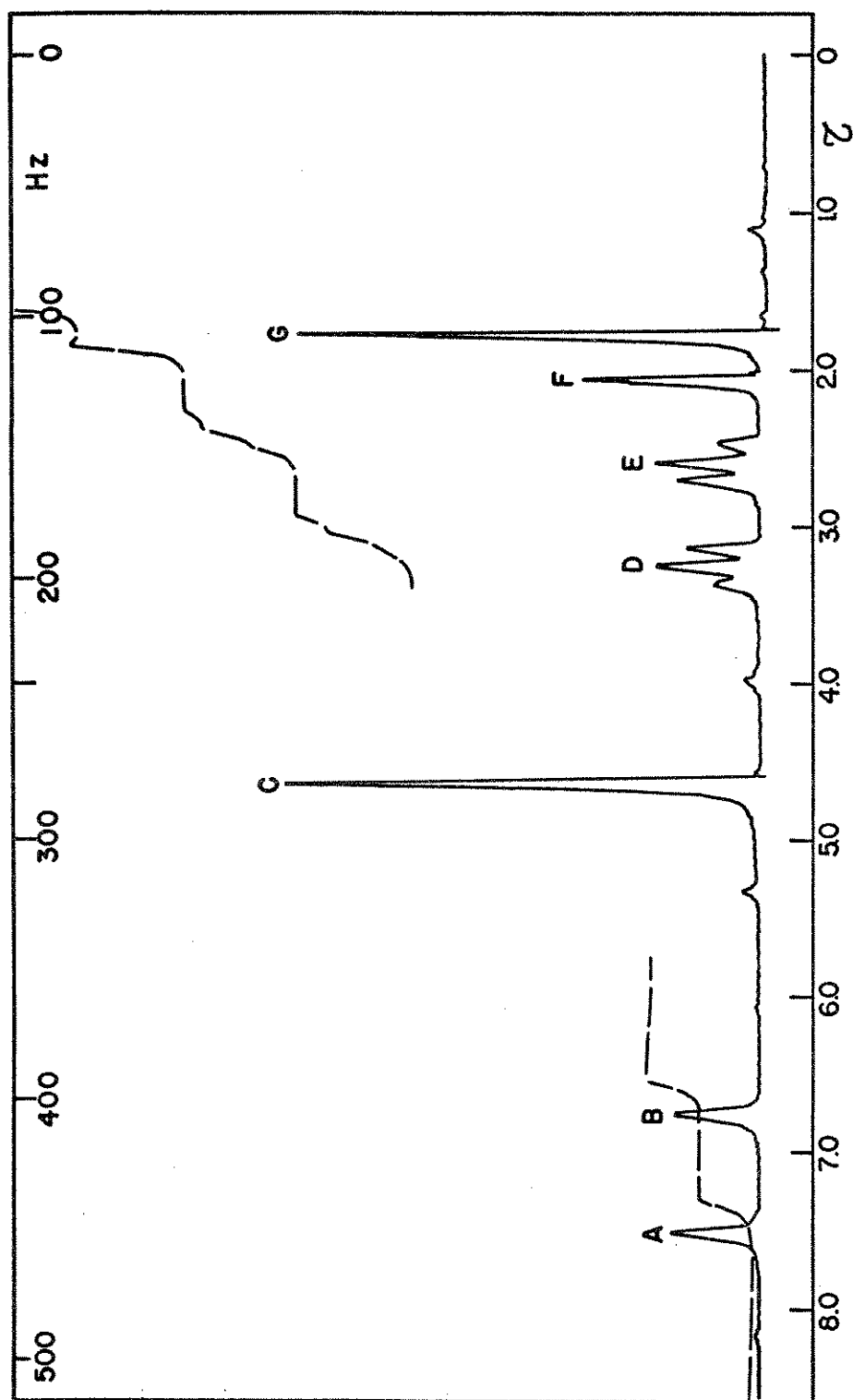


Fig. 7 - Espectro de ressonância magnética nuclear da N-acetil-histamina em D_2O .
 A: H-2; B: H-4; C: H_2O ; D: H-; E: H-; F: acetona (referência);
 G: hidrogênios do grupo metila. A integração dos picos está representada por linha tracejada.

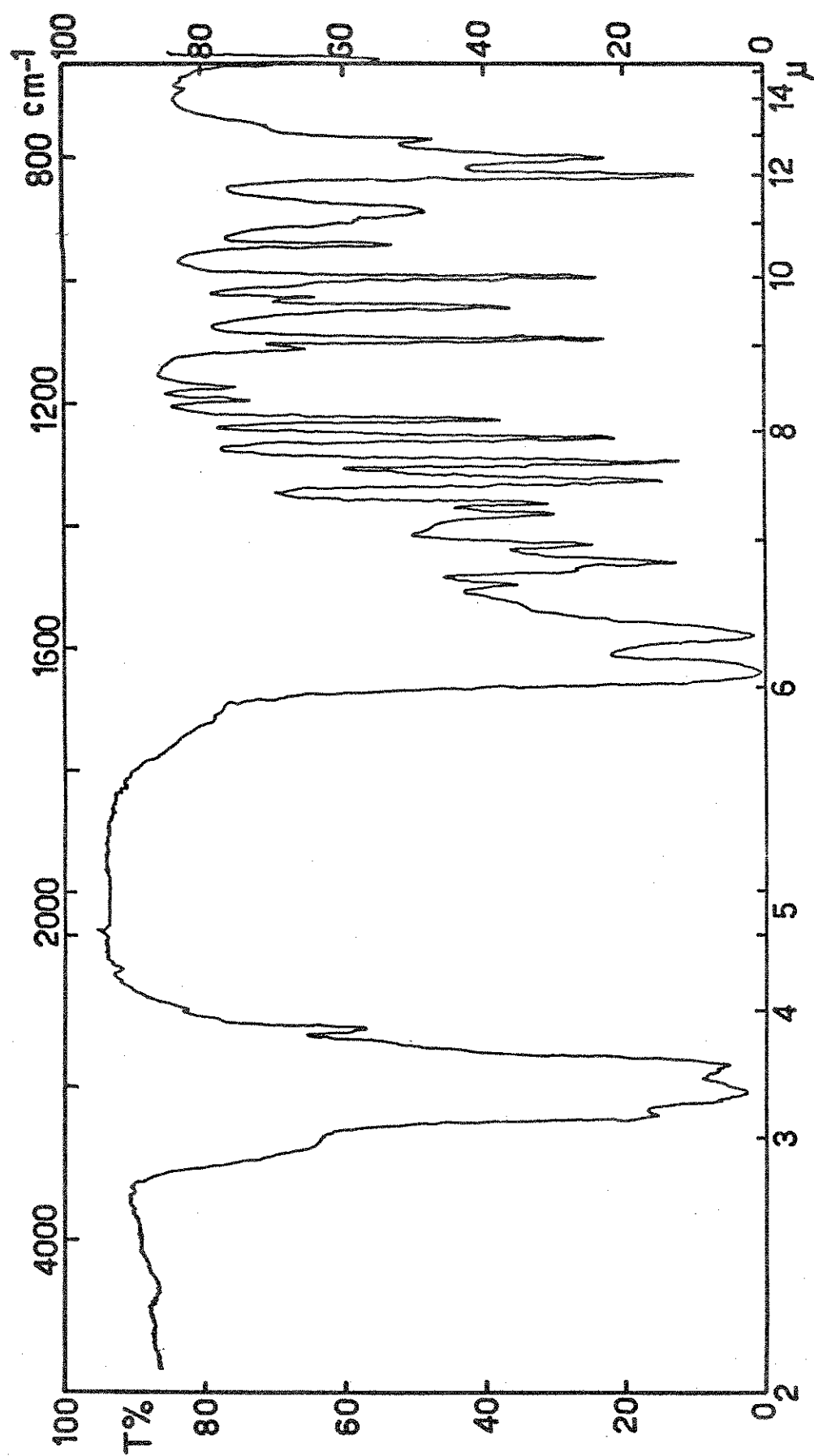


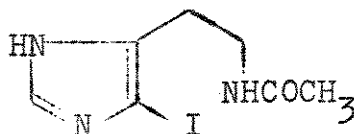
Fig. 8 - Espectro infravermelho da N-acetil-histamina (pastilha de KBr).

gramas. Segue-se a análise elementar, comparada com a calculada para a N-acetil-monoiodobistamina ($C_7H_{10}ON_3I$):

Calculada: C 30,12; H 3,61; N 15,06; I 47,49; O 5,73

Determinada: C 29,96; H 3,53; N 15,06; I 47,47

Pelo espectro de ressonância magnética nuclear (Fig. 9) concluímos que a substituição pelo iôdo se deu no carbono 5 do anel imidazólico:



N-acetil-monoiodobistamina

A Fig. 10 mostra o espectro infra-vermelho do composto obtido.

5. Preparação de N-acetil-diiodohistamina

A 0,5 g de N-acetil-histamina, dissolvida em 100 ml de NaOH 0,1 N, adicionaram-se 1,52 g de iôdo seguindo a técnica descrita anteriormente. Alcalinizando-se até pH 8, após a remoção do excesso de iôdo, obteve-se um precipitado branco, volumoso, que foi centrifugado e colocado em dessecador. Obtiveram-se 0,415 g de um composto que fundiu entre 214 e 216°C, insolúvel em água e em meio alcalino mas solúvel em ácido. Os resultados da análise elementar, em comparação com os calculados para a N-acetil-diiodohistamina ($C_7H_9ON_3I_2$), são as seguintes:

Calculada: C 20,76; H 2,24; N 10,38; I 62,67; O 3,95

Determinada: C 20,14; H 2,31; N 10,28; I 59,73

Devido à dificuldade em se obter solução deste composto em concentração adequada, não se conseguiu um bom espectro de ressonância magnética nuclear.

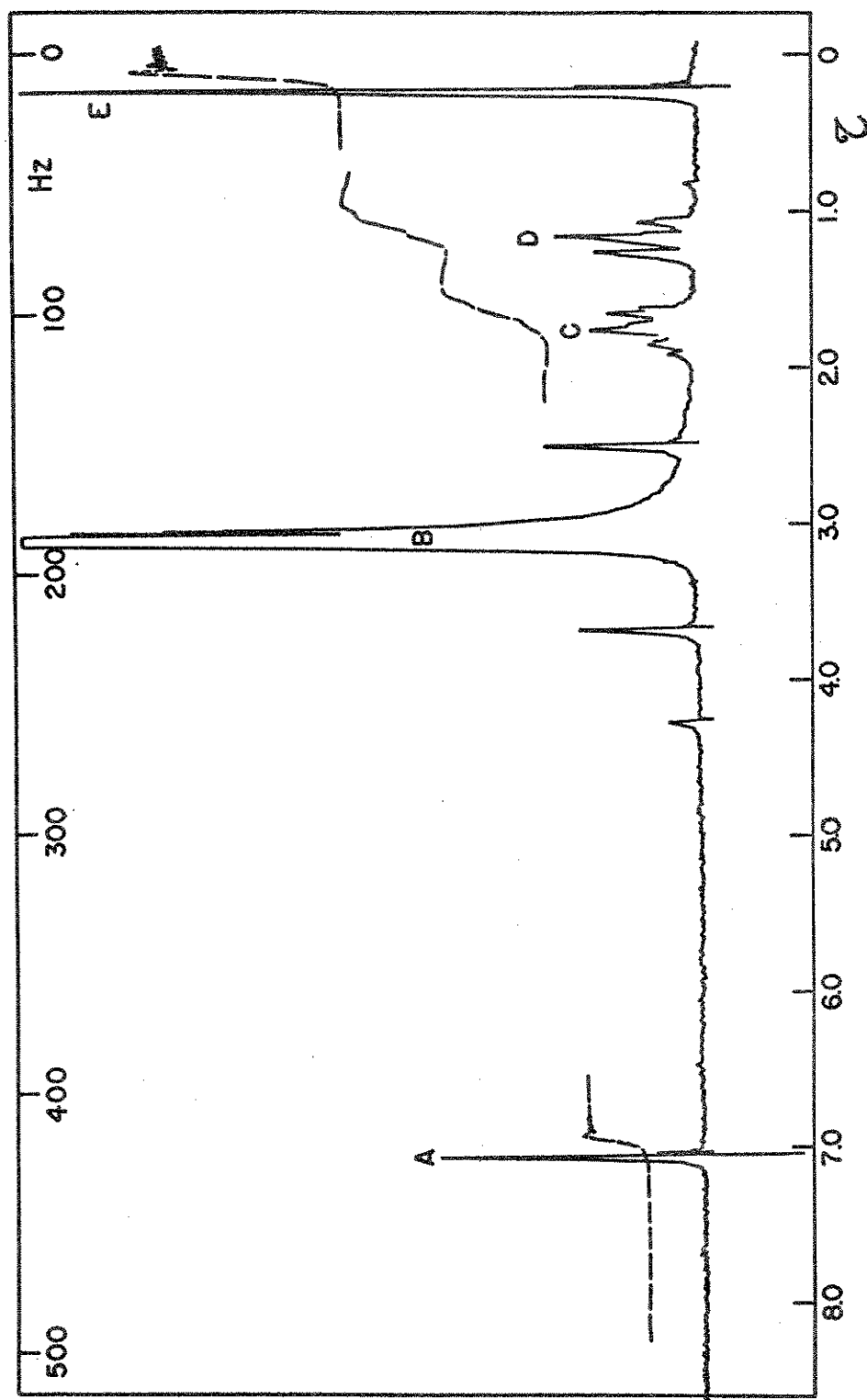


Fig. 9 - Espectro de ressonância nuclear magnética da N-acetil-moniodohistamina.
 A: H-2; B: H₂O; C: H- ; D: H- ; E: hidrogênios do grupo metila.
 Linha tracejada: integração dos picos.

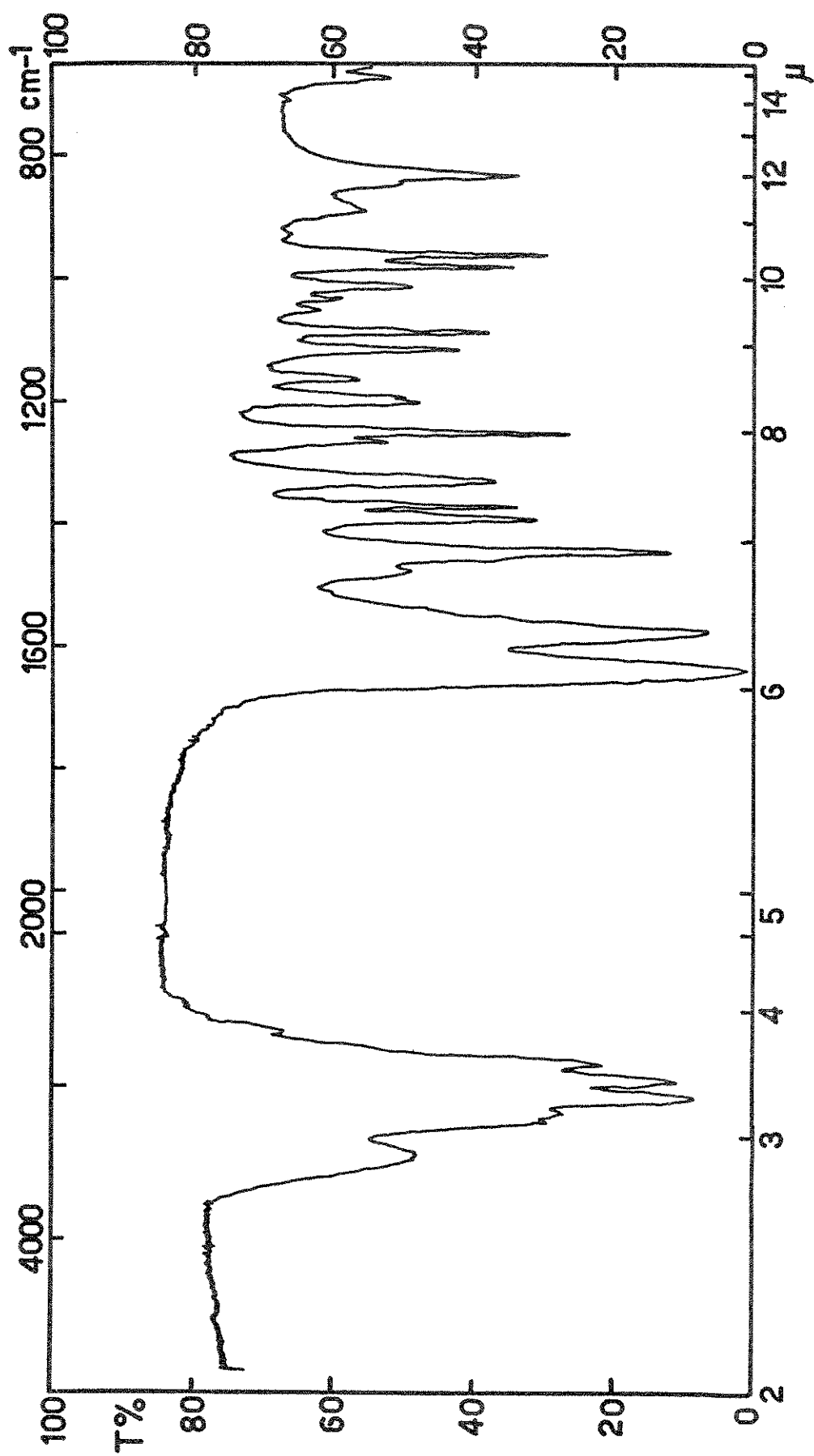
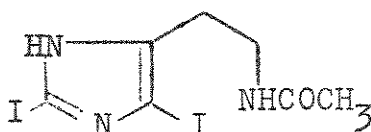


Fig. 10 - Espectro infravermelho da N-acetil-monohistamina (pastilha de KBr).



N-acetil-diiodohistamina

Na Fig. 11 encontra-se o espectro de absorção da região do infra-vermelho.

6. Cromatografia das iodohistaminas em camada delgada

De todos os sistemas de solventes empregados, aqueles que permitiram melhores separações foram: a) n-butanol saturado de hidróxido de amônio a 50% (v/v); b) n-butanol:metanol:dietilamina 85:5:1 (sistema B).

Na Tabela I encontram-se os valores de Rf obtidos utilizando-se o sistema (a) como solvente, e na Fig. 12 encontra-se a reprodução de uma cromatoplaça obtida com o mesmo solvente.

TABELA I

	Rf
Histamina.2HCl	0,084
Monoiodohistamina.2HCl	0,334
Diiodohistamina	0,519
N-acetil-histamina	0,467
N-acetil-monoiodohistamina	0,662
N-acetil-diiodohistamina	0,798

O sistema (b) mostrou-se mais apropriado à cromatografia do dicloridrato de histamina e da N-acetil-histamina que apresentaram, com esse solvente, os Rf de 0,17 e 0,37 respectivamente.

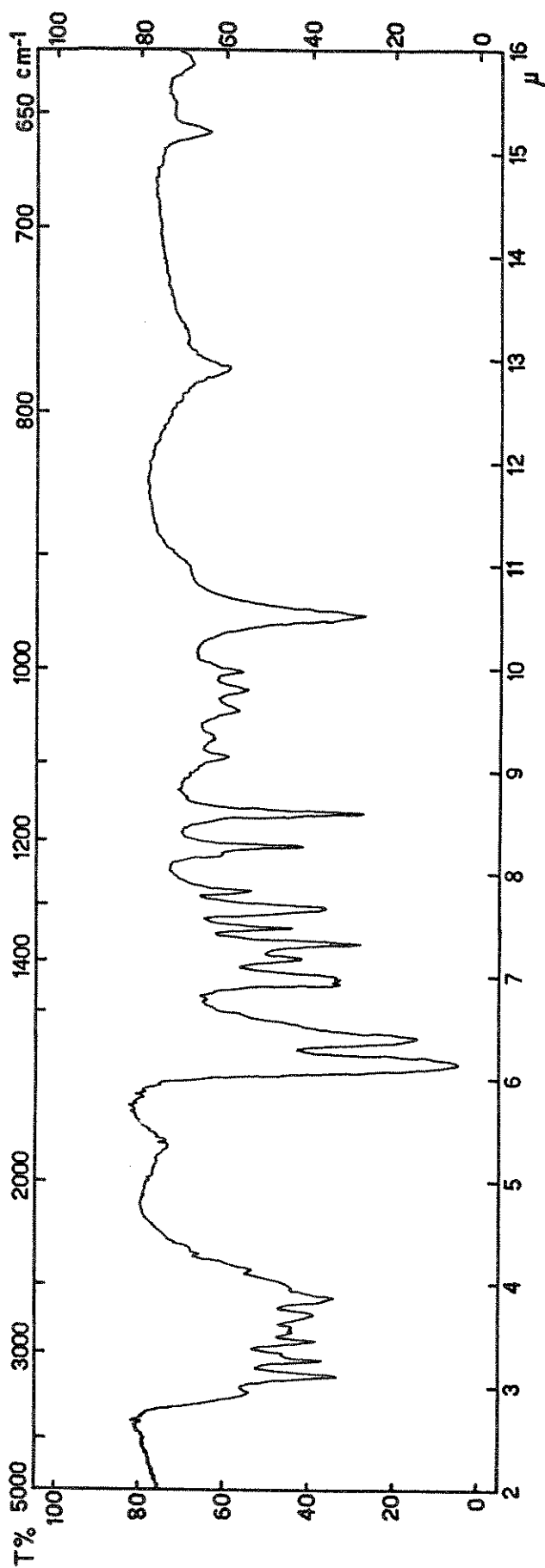


Fig. 11 - Espectro infravermelho na N-acetilidohistamina.

7. Identificação dos produtos de inativação da histamina pelo iôdo

Procuramos determinar a estrutura do produto de inativação da histamina pelo iôdo, nas condições descritas por Paiva e cols.^{9,14}. Foram preparadas as soluções de dicloridrato de histamina e iôdo nas concentrações de 10 mg/ml em tampão citrato-fosfato de pH=8,0. A partir desta foram preparadas misturas em que a relação molar histamina:iôdo variou de 1:2 até 2:1. Estas misturas eram incubadas na geladeira durante 30 minutos e as reações eram interrompidas pela acidificação com ácido clorídrico. O excesso de iôdo era removido por sucessivas extrações com n-hexano. O produto das incubações era caracterizado por cromatografia em camada delgada, feita simultaneamente juntamente com amostras autênticas de moniodohistamina e diiodohistamina. A cromatografia foi desenvolvida no sistema de solvente n-butanol saturado de hidróxido de amônio a 50% e revelada com reativo de Pauly modificado. Verificou-se que, nestas condições, o único produto de iodação foi a moniodohistamina.

8. Atividade Biológica dos derivados iodados da histamina e N-acetil-histamina

Os derivados iodados obtidos foram comparados com a histamina quanto à sua atividade espasmogênica sobre o íleo isolado de cobaia. Verificou-se que nenhum dos derivados apresenta atividade do tipo histamínico, em ensaios que permitiriam detectar essa atividade se ela fôsse maior do que 10^{-4} vezes a da histamina. Esses compostos foram também estudados quanto à sua atividade anti-histamínica, tendo esta sido encontrada em pequeno grau na N-acetil-diiodohistamina e na diiodohistamina. Esta última apresentou-se mais ativa neste sentido, inibindo 50% da resposta à histamina $2 \times 10^{-8}M$ quando a concentração da diiodohistamina era $5,5 \times 10^{-5}M$ (Fig. 13). Verificou-se também que a diiodohistamina não apresenta atividade inibidora sobre o efeito da acetilcolina.

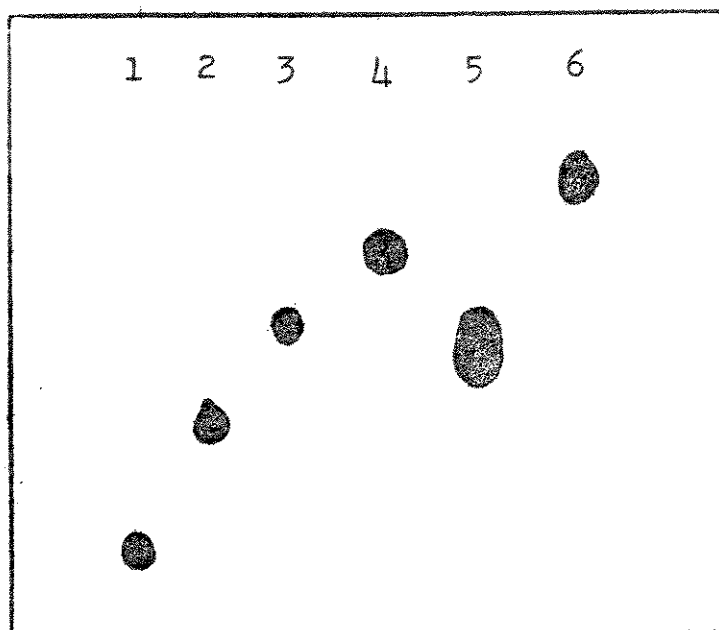


Fig. 12 - Reprodução de uma cromatoplaça desenvolvida com n-butanol saturado de hidróxido de amônio a 50% (v/v): 1, histamina; 2, monoiódohistamina; 3, diiodohistamina; 4, N-acetil-monoiódohistamina; 5, N-acetil-histamina; 6, N-acetil-diiodohistamina.

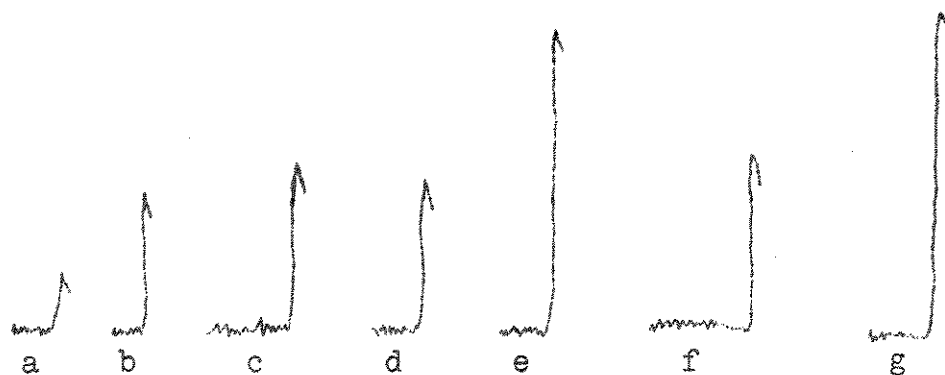


Fig. 13 - Contrações de uma preparação do íleo isolado de cobaia pela adição de: a, 10 ng de acetilcolina; b, 20 ng de acetilcolina; c, 100 µg de diiodohistamina seguidas de 20 ng de acetilcolina; d, 20 ng de histamina; e, 40 ng de histamina; f, 100 µg de diiodohistamina seguidas de 40 ng de histamina; g, 40 ng de histamina. A preparação foi lavada várias vezes com solução de Tyro de após cada contração.

9. Titulações eletrométricas

Com as finalidades de melhor caracterizar os derivados iodados da histamina e de obter informações de possível valia para o estudo de sua conformação em solução aquosa, foram feitas titulações pH-métricas desses compostos em várias temperaturas. As curvas de titulação dos derivados da histamina por nós preparados, obtidos a 25°C, estão representadas nas Figuras 14-18. Estes gráficos mostram os pontos obtidos experimentalmente, aos quais foram sobrepostas as curvas teóricas computadas pela equação de Handerson-Hasselbalch, com os valores pK_a que melhor se adaptaram aos dados experimentais. As médias aritméticas dos valores de pK_a (corrigidos para força iônica nula) obtidos em várias temperaturas para os grupos ionizáveis da histamina, monoiódohistamina e diiódohistamina encontram-se nas tabelas II, III e IV. Na tabela V acham-se os valores obtidos nas titulações da N-acetil-histamina e de seus derivados a 25°C. O efeito da temperatura sobre os valores de pK foi analisado de acordo com a equação de van't Hoff. A entalpia da titulação de cada grupo foi obtida pelo coeficiente angular da reta determinada pelo método dos mínimos quadrados relacionando pK_a em função da recíproca da temperatura absoluta. Um exemplo do tipo de gráfico obtido encontra-se na Fig. 19. Os desvios padrão correspondentes aos valores de ΔH foram determinados pelo erro padrão da estimativa do coeficiente angular. Os resultados encontram-se na tabela VI, juntamente com os valores da variação de energia livre e entropia correspondentes.

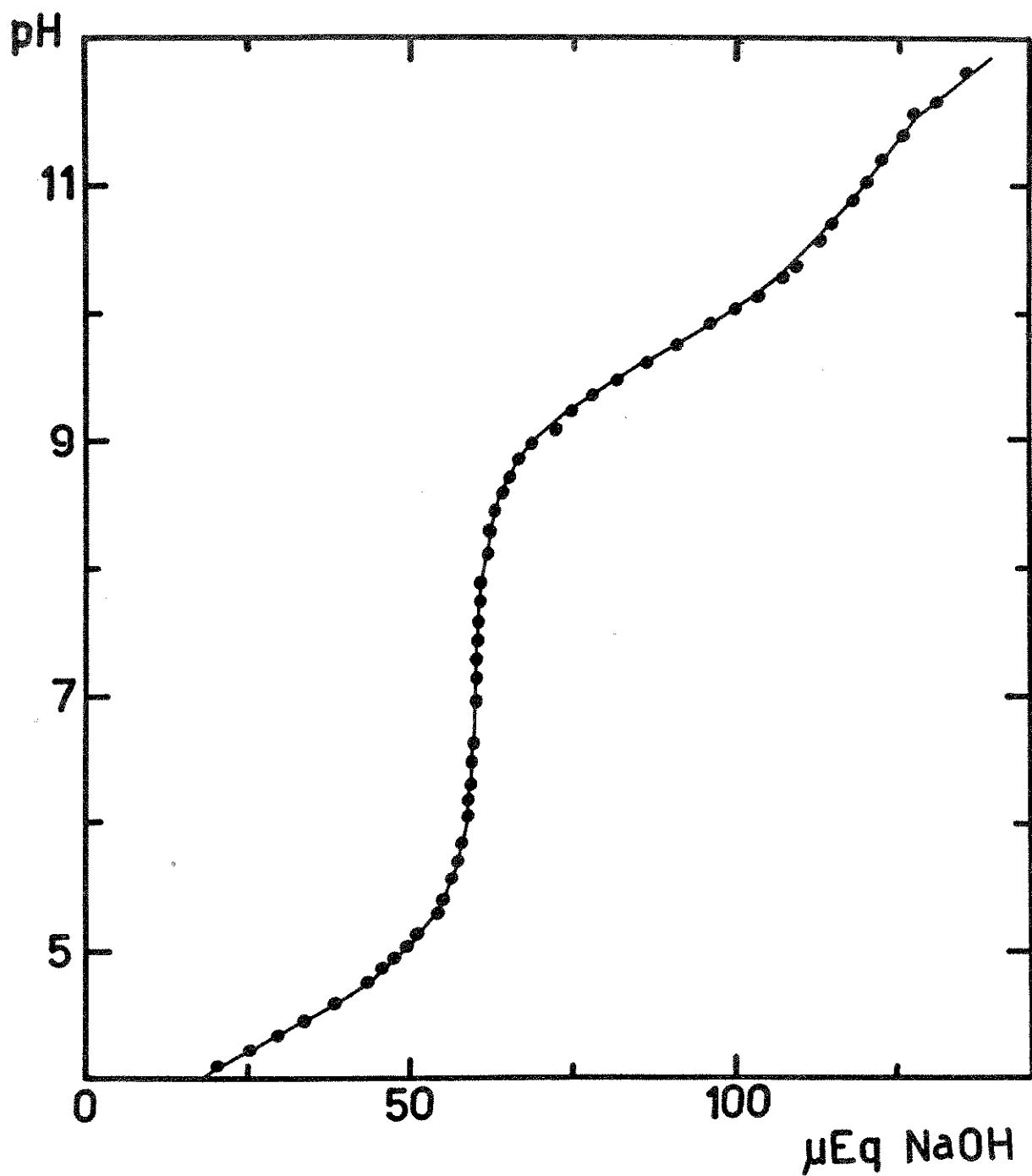


Fig. 14 - Títulação de 100 micromoles de monolodohis
tamina a 12°C.

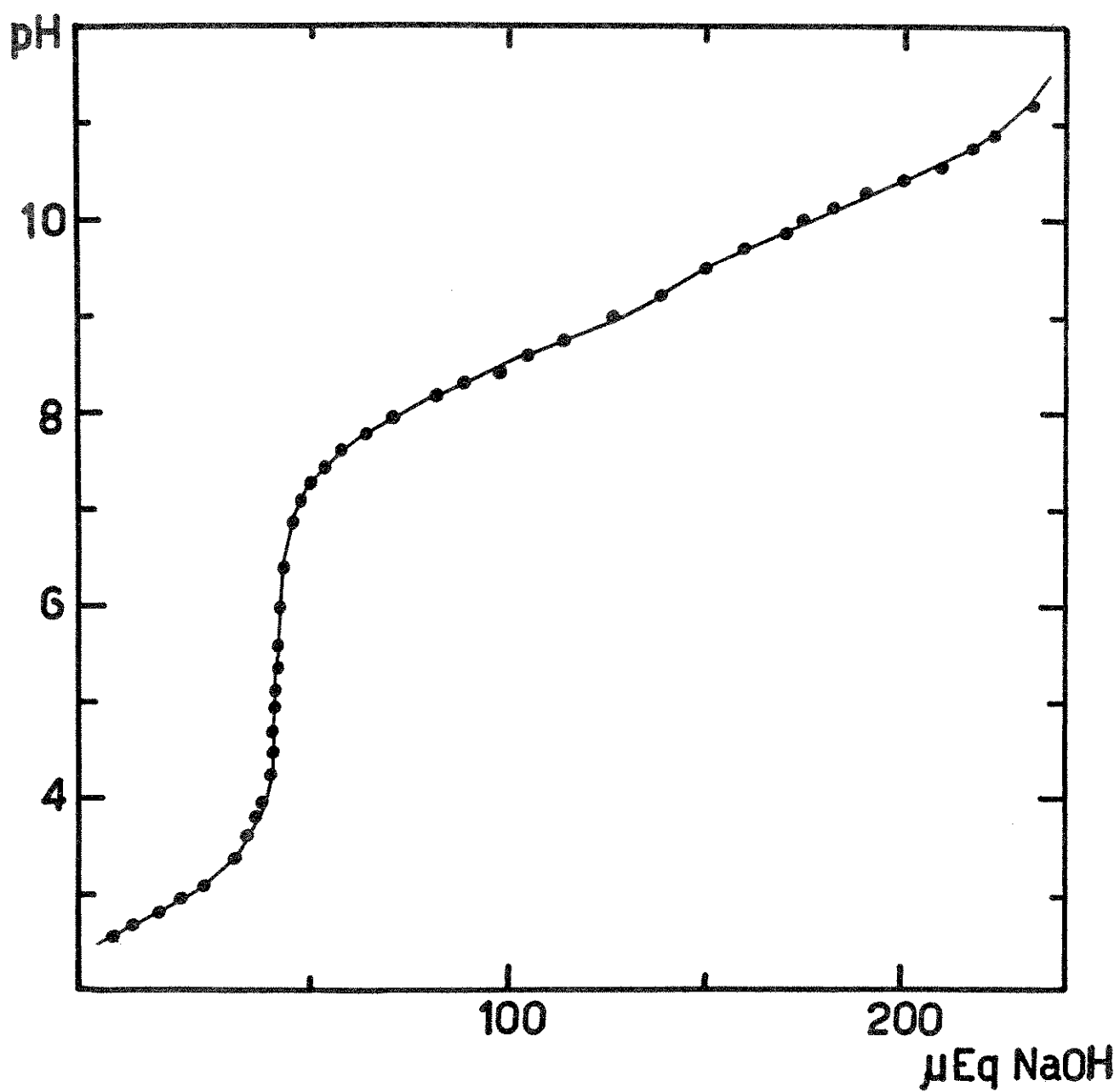


Fig. 15 - Titulação de 100 micromoles de diiodohistamina a 25°C.

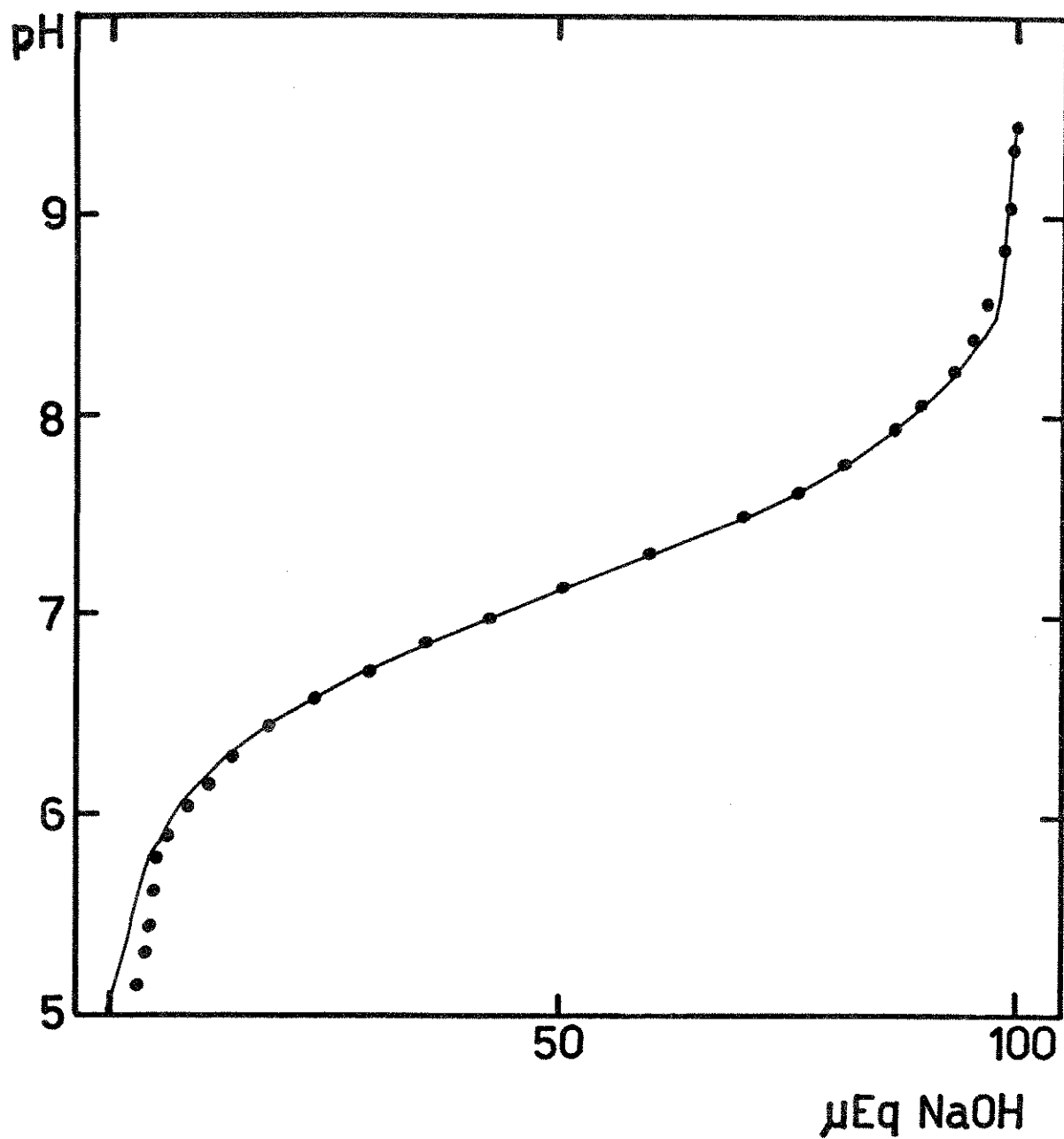


Fig. 16 - Titulação de 100 micromoles de N-acetil-histamina a 25°C.

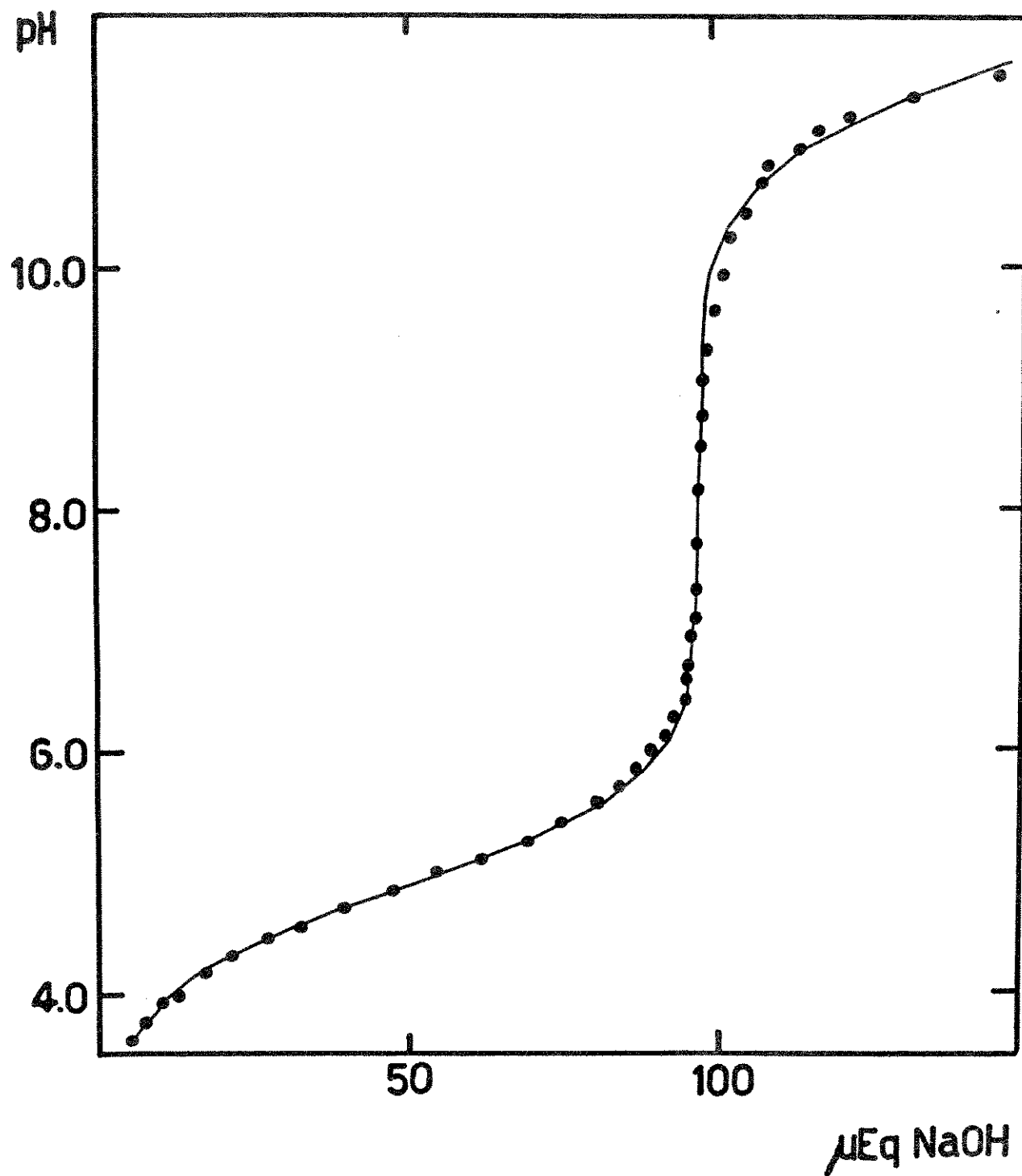


Fig. 17 - Titulação de 97,5 micromoles de N-acetilmonohistamina a 25°C.

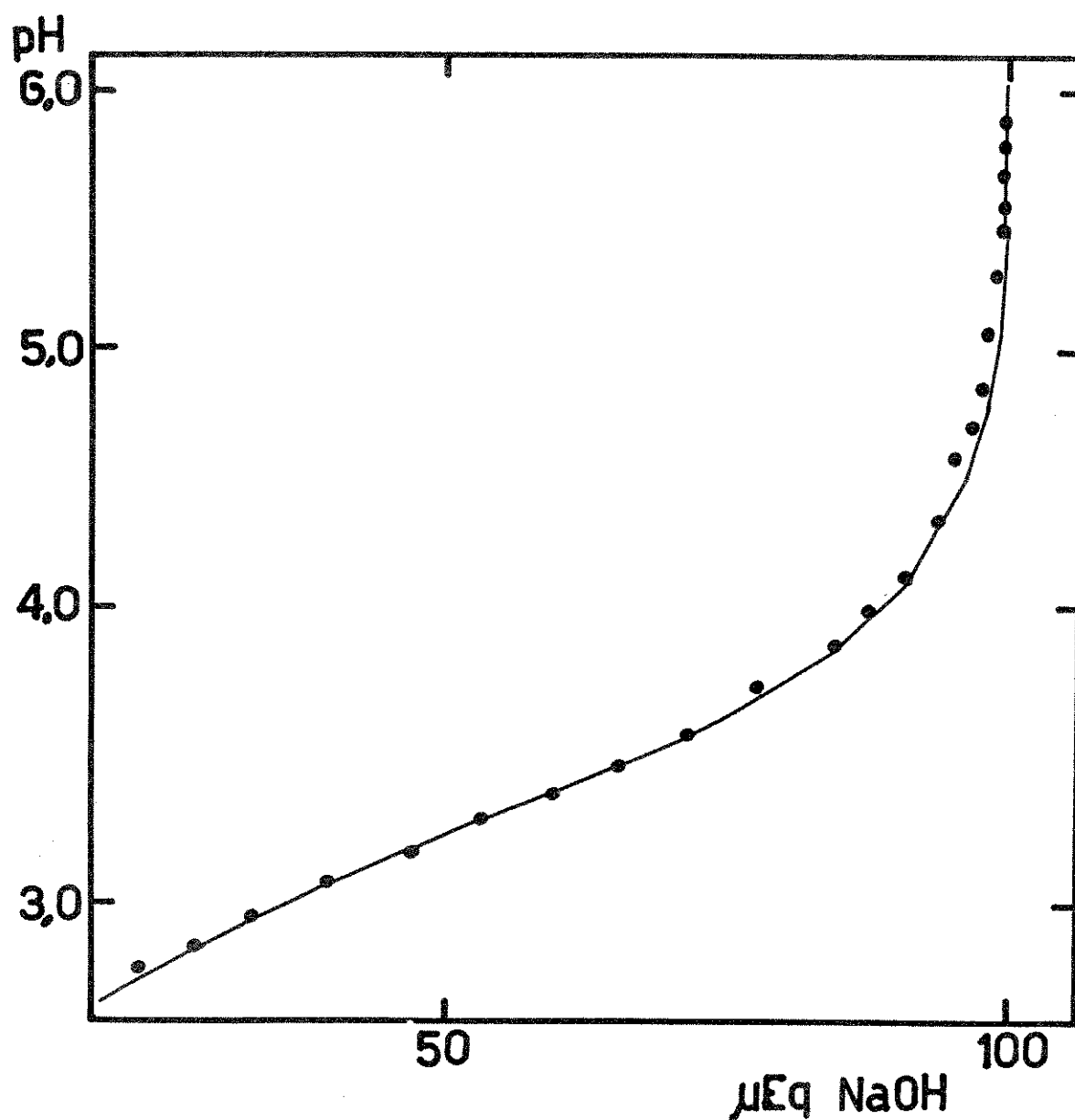


Fig. 18 - Titulação de 100 micromoles de N-acetil-dihistamina a 25°C.

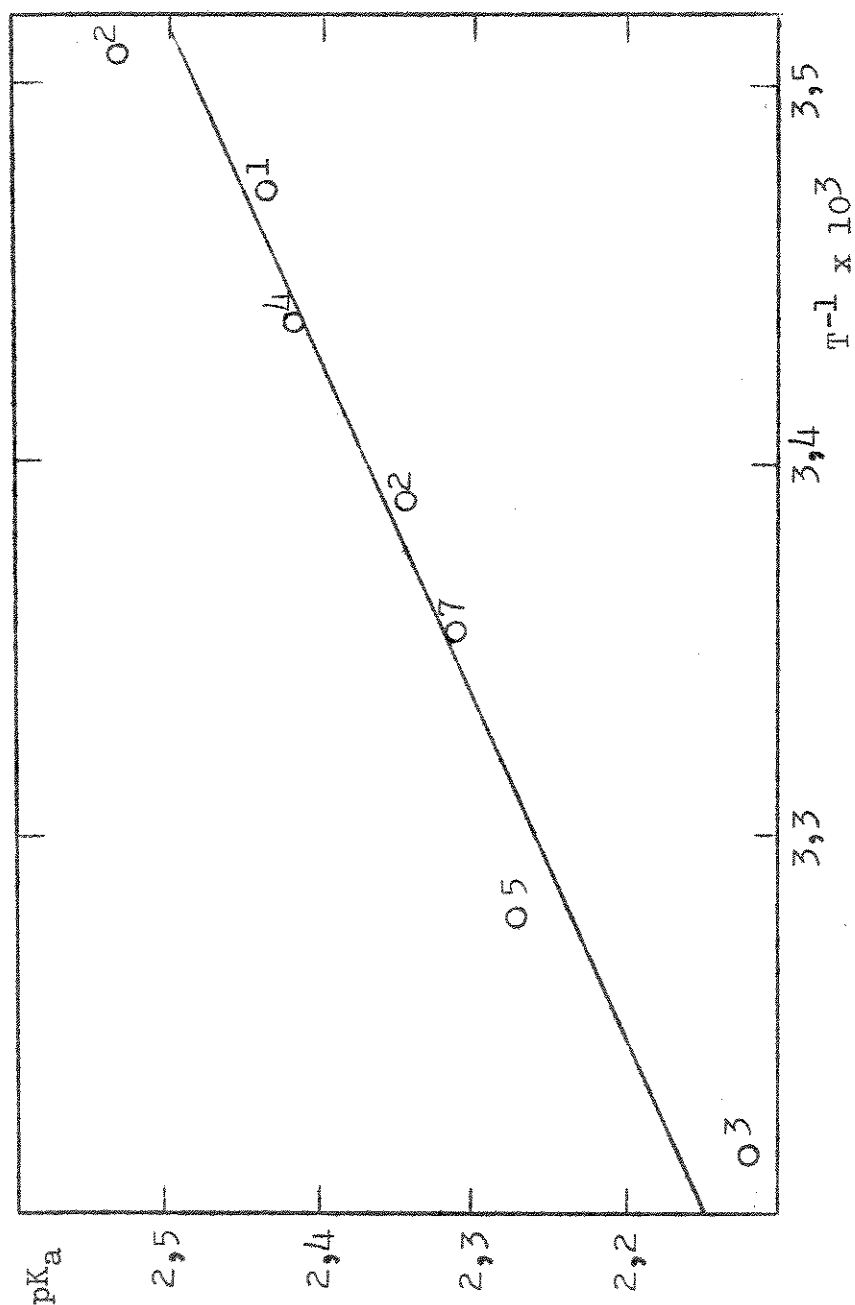


Fig. 19 - Efeito da temperatura sobre o pK_a do grupo imidazólico da diiodohistamina. Cada ponto representa a média de determinações cujo número é indicado ao seu lado.

Tabela II - pK_a^* dos grupos ionizáveis da histamina em várias temperaturas

Grupo Temp.	Imidazólio	Amônio
15,0°C	6,23	10,04
17,5°C	6,11	9,97
20,0°C	6,14	9,93
22,5°C	6,03	9,78
25,0°C	6,03	9,75
27,5°C	5,96	9,60
30,0°C	5,94	9,62
35,0°C	5,85	9,45

* Os valores de pK_a obtidos pela titulação eletrométrica foram extrapolados para força iônica nula.

Tabela III - pK_a^* dos grupos ionizáveis da moniodohistamina em três temperaturas

Grupo Temp.	Imidazólio	Amônio	Imidazol
12°C	4,21	9,62	12,19
25°C	4,06	9,20	11,56
38°C	3,89	8,86	11,30

* Valores extrapolados para força iônica nula.

Tabela IV - pK_a^* dos grupos ionizáveis da diiodohistamina em várias temperaturas

Temp. \ Grupo	Imidazólio	Amônio	Imidazol
12°C	2,51	8,52	10,58
15°C	2,44	8,45	10,47
18°C	2,42	8,35	10,37
22°C	2,35	8,24	10,18
25°C	2,31	8,20	10,11
32°C	2,27	8,04	9,92
38°C	2,12	7,93	9,72

* Os valores foram extrapolados para força iônica nula.

Tabela V - pK_a^* dos grupos ionizáveis da N-acetil-histamina e seus derivados iodados a 25°C

Grupo \ Composto	Imidazólio	Imidazol
N-acetil-histamina	6,99	---
N-acetil-monoiodo-histamina	4,73	11,53
N-acetil-diiodohistamina	2,99	---

* Valores extrapolados para força iônica nula.

Tabela VI - Parâmetros termodinâmicos das ionizações da histamina e seus iôdo-derivados a 25°C

		ΔH (Kcal/mol)	ΔG (Kcal/mol)	ΔS (cal/° mol)
Histamina	Im^+	$5,8 \pm 0,9$	$8,27 \pm 0,05$	$-8,3 \pm 3$
	$\begin{smallmatrix} + \\ -NH_3 \end{smallmatrix}$	$12,2 \pm 0,8$	$13,36 \pm 0,09$	$-3,9 \pm 2$
Monoiodo-histamina	Im^+	$5,5 \pm 0,2$	$5,57 \pm 0,01$	$-0,2 \pm 0,8$
	$\begin{smallmatrix} + \\ -NH_3 \end{smallmatrix}$	$12,3 \pm 0,8$	$12,61 \pm 0,01$	$-1,2 \pm 2$
	Im^0	$14,4 \pm 0,3$	$15,84 \pm 0,09$	$-4,8 \pm 1$
Diiodohis-tamina	Im^+	$5,2 \pm 0,6$	$3,17 \pm 0,05$	$6,8 \pm 2$
	$\begin{smallmatrix} + \\ -NH_3 \end{smallmatrix}$	$9,4 \pm 0,3$	$11,24 \pm 0,02$	$-6,2 \pm 1$
	Im^0	$12,4 \pm 0,3$	$13,86 \pm 0,02$	$-4,9 \pm 1$

Os desvios indicados representam os erros padrão

10. Estudo espectrofotométrico da reação de iodação da histamina

A possibilidade da evidenciação de um complexo intermediário entre o iôdo e a histamina durante a reação de iodação foi investigada através do estudo do espectro de absorção do iôdo, em meio ácido, na presença de histamina.

O estudo da cinética da iodação de vários compostos imidazólicos, inclusive da histamina, foi feito por Schutte e colaboradores^{12,13}. Esses autores fizeram suas observações em presença de excesso de iodeto, em condições que asseguravam cinética predominantemente de primeira ordem para o desaparecimento do iôdo. Para permitir o estudo de possíveis alterações no espectro de absorção do iôdo e do íon I_3^- em presença da histamina fizemos o estudo com baixas concentrações de iodeto. As soluções de iôdo eram preparadas, alguns minutos antes de seu uso, pela agitação de um excesso de iôdo em água destilada, até o aparecimento de cor amarela escura, seguida de filtração. O filtrado apresentava um espectro de absorção caracterizado pe-

la presença de um máximo de 460 nm, devido ao I_2 solvatado (absorptividade molar, $\epsilon=746$) e outro em 353 nm, correspondente ao I_3^- ($\epsilon=26400$)³⁷. A concentração de I_2 e a relação $[I_2]/[I_3^-]$ dependiam do tempo de agitação e variavam lentamente com o tempo após a filtração. Entretanto essa alteração não era significativa nas primeiras horas após a filtração e não interferiu com as nossas observações.

A adição de excesso de histamina a soluções aquosas de iodo em pH acima de 5,5 resultava em rápido desaparecimento do iodo, dificultando as observações e por isso escolhemos a região de pH entre 3,6 e 5,2 para o nosso estudo. O pH de cada experiência era obtido pela titulação prévia da solução de histamina que seria adicionada à de iodo. Nestas condições, a adição de histamina $1,09 \times 10^{-2} M$ a soluções de iodo de concentração próxima a $4 \times 10^{-4} M$ resultava em uma lenta diminuição do I_2 e aumento do I_3^- presentes. O pH também caía lentamente mas, embora não existissem substâncias tamponantes presentes, essa queda era apenas da ordem de 0,05 unidades nos primeiros quatro minutos da reação.

Admitindo-se que no início da reação há apenas formação de monoiódohistamina, conforme as equações:



deveria ser possível obter o valor da constante de dissociação (K) de I_3^- , conhecendo-se as concentrações de I_2 , I_3^- , e de I^- , esta última calculada a partir da premissa de que cada molécula de iodo consumida na iodação produza um equivalente de iodo to:

$$K = \frac{[I_2]_t \left([I_2]_0 - [I_2]_t - 2 ([I_3^-]_t - [I_3^-]_0) + [I^-]_0 \right)}{[I_3^-]_t} \quad (6)$$

$[I_2]_0$ e $[I_3^-]_0$ são as concentrações de iodo e

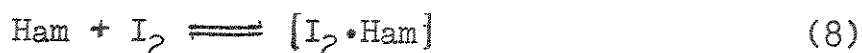
tri-iodeto determinadas pela absorbância da solução de iôdo antes da adição da histamina e $[I^-]_0$ é a concentração inicial de iodeto calculada a partir das duas outras e da constante de dissociação do I_3^- ($K=1,57 \times 10^{-3}$)³⁷; $[I_2]_t$, $[I_3^-]_t$ e $[I^-]_t$ são concentrações em diferentes tempos, após a adição da histamina.

A Tabela VII mostra os resultados dos cálculos de K em experiências representativas realizadas em vários pH. A concentração do iôdo em tôdas as experiências foi da ordem de $4 \times 10^{-4}M$ e a de histamina foi de $1,09 \times 10^{-2}M$. Os valores da constante aparente da dissociação do I_3^- , obtidos após cerca de 5 minutos de reação, oscilaram em torno de $1,59 \times 10^{-3}$, em concordância com o citado na literatura³⁷. Inicialmente, entrando há um desvio significativo com tendência a valores mais altos, o que pode ser interpretado admitindo-se que uma parte

Tabela VII - Constante aparente de dissociação do íon tri-iodeto durante a iodação da histamina a 30°C.

Tempo em segundos	K x 10 ³			
	pH			
	4,0	4,7	4,8	5,2
30	1,89	1,84	1,82	1,77
60	1,88	1,72	1,73	1,85
90	1,88	----	1,62	1,79
120	1,89	1,60	1,58	1,76
180	1,82	1,49	1,57	1,70
240	1,85	1,57	1,55	1,68
300	1,80	1,55	1,55	1,65
360	1,75	1,52	1,53	1,63
420	1,69	1,52	1,54	1,62
480	1,68	1,56	1,53	1,60
540	1,65	1,56	1,52	1,59
600	1,67	1,56	1,52	1,59

da absorvância em 460 nm, seja devida a uma forma de iôdo ligado à histamina. Teríamos, assim,



A espécie representada acima entre colchetes poderia ser um complexo inespecífico ou um intermediário da reação de iodação. Para verificar qual destas hipóteses é a mais provável procuramos calcular a concentração do iôdo ligado à histamina (q) através da expressão:

$$q = ([I_2]_0 - [I_2]_t) - ([I_3^-]_t - [I_3^-]_0) \quad (10)$$

Os valores de q foram calculados em diferentes tempos da reação e a sua extrapolação para o tempo zero, feita como se mostra na Fig. 20, foi tomada como a concentração de iôdo ligado à histamina no início da reação (q_0).

Os valores de q_0 foram relacionados, em cada caso, com a velocidade inicial (v_i) da reação. Na Tabela VIII e Fig. 21 encontram-se os valores de v_i e q_0 obtidos em vários pH.

Tabela VIII - Valores da velocidade inicial (v_i) e da concentração inicial de iôdo ligado à histamina (q_0) em reações de iodação feitas a 30°C em vários pH.

pH	v_i (mol/l.min.)	q_0
3,99	$0,62 \times 10^{-5}$	$0,2 \times 10^{-5}M.$
4,52	$2,80 \times 10^{-5}$	$1,1 \times 10^{-5}M.$
4,85	$4,55 \times 10^{-5}$	$1,5 \times 10^{-5}M.$
5,09	$5,70 \times 10^{-5}$	$2,1 \times 10^{-5}M.$
5,20	$6,93 \times 10^{-5}$	$2,7 \times 10^{-5}M.$

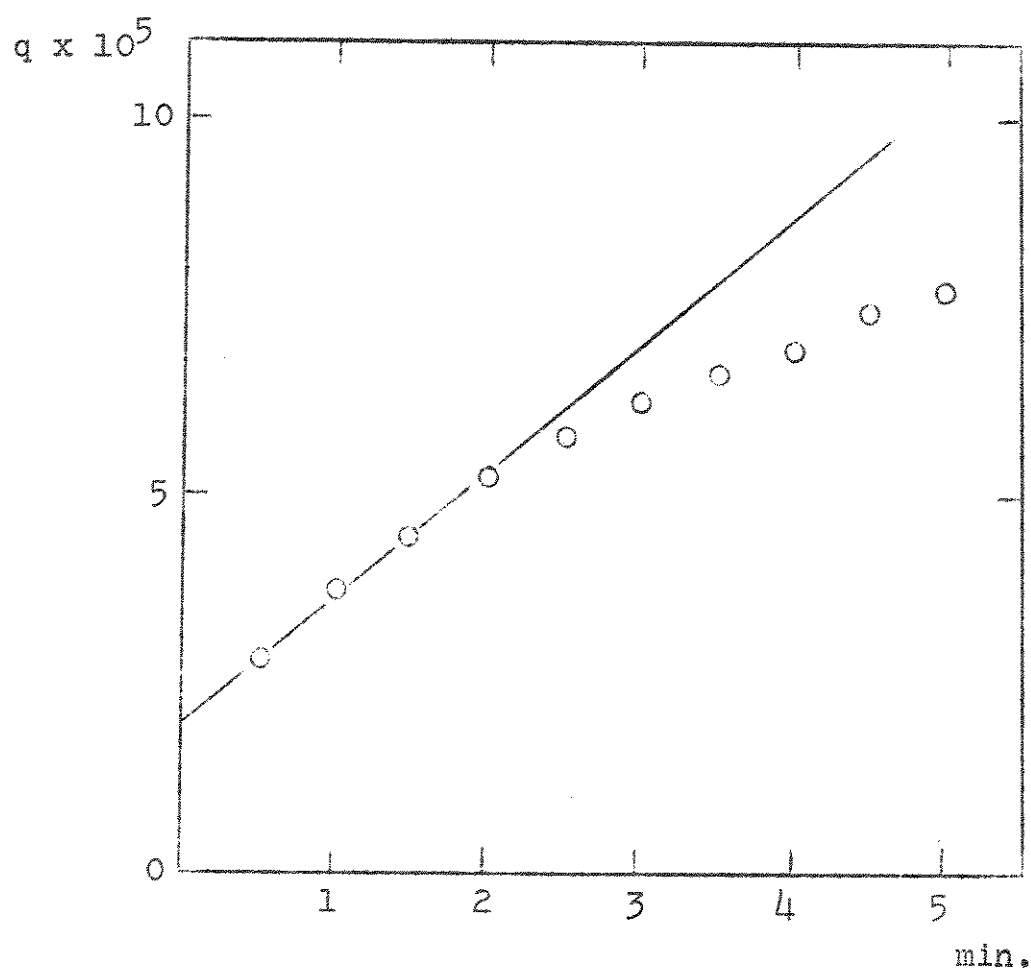


Fig. 20 - Variação da concentração de "iôdo li-
gado à histamina" (q) em função do tempo de io-
dação. Histamina $1,09 \times 10^{-2}M$; $[I_2]_0 = 3,22 \times 10^{-4}M$;
 $[I_3]_0 = 7,77 \times 10^{-6}M$; $pH = 5,09$

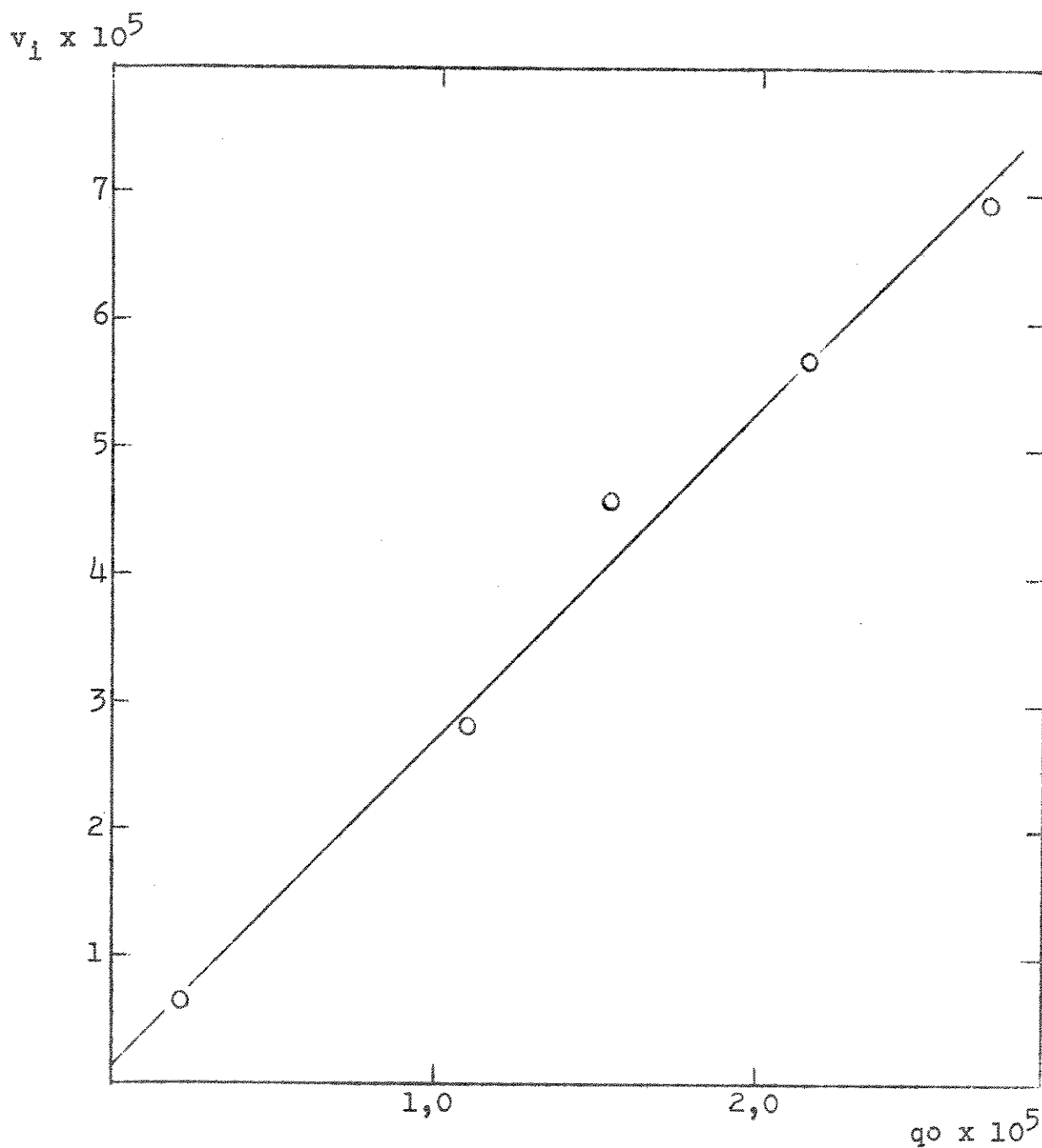


Fig. 21 - Relação entre a velocidade inicial (v_i) e concentração inicial de iodo ligado à histamina (q_0), em reações de iodação feitas a 30°C em vários pH.

O aumento da velocidade inicial da iodação é diretamente proporcional tanto à concentração da histamina na forma catiônica monovalente (Ham^+) como ao valor de q_0 . Estes resultados favorecem a hipótese de que nossas observações espectrofotométricas resultem da existência de um complexo entre o iodo e a histamina desprotonada, que seria um intermediário na reação de iodação. A Constante de formação desse complexo, calculada através da equação $K = q_0 / [\text{Ham}^+][\text{I}_2]_0$, resultou em um valor médio de 96 com desvio padrão 20.

Procuramos verificar ainda a possibilidade da ligação de histamina ao I_3^- ou ao I^- através do exame do espectro de absorção de soluções desses íons em presença da histamina protonada, porém não conseguimos nenhuma evidência deste fato.

Também estudamos as alterações produzidas no espectro de absorção do iodo ($3-4 \times 10^{-4}\text{M}$), em solução aquosa ($\text{pH}=2,0$) pela adição de histamina em concentrações que variaram de 10^{-2}M até $2 \times 10^{-1}\text{M}$. Para as concentrações altas de histamina verificou-se um deslocamento do máximo de absorção do iodo de 460 nm para 440 nm, e também um ligeiro aumento da absorbância do I_3^- em 353 nm. Este efeito, porém, não foi observado quando a concentração de histamina era da mesma ordem que as empregadas nas várias observações por nós realizadas (Fig. 22). Aparentemente as alterações do espectro do iodo verificadas em presença de maiores concentrações de histamina se devem a um efeito de modificação do solvente.

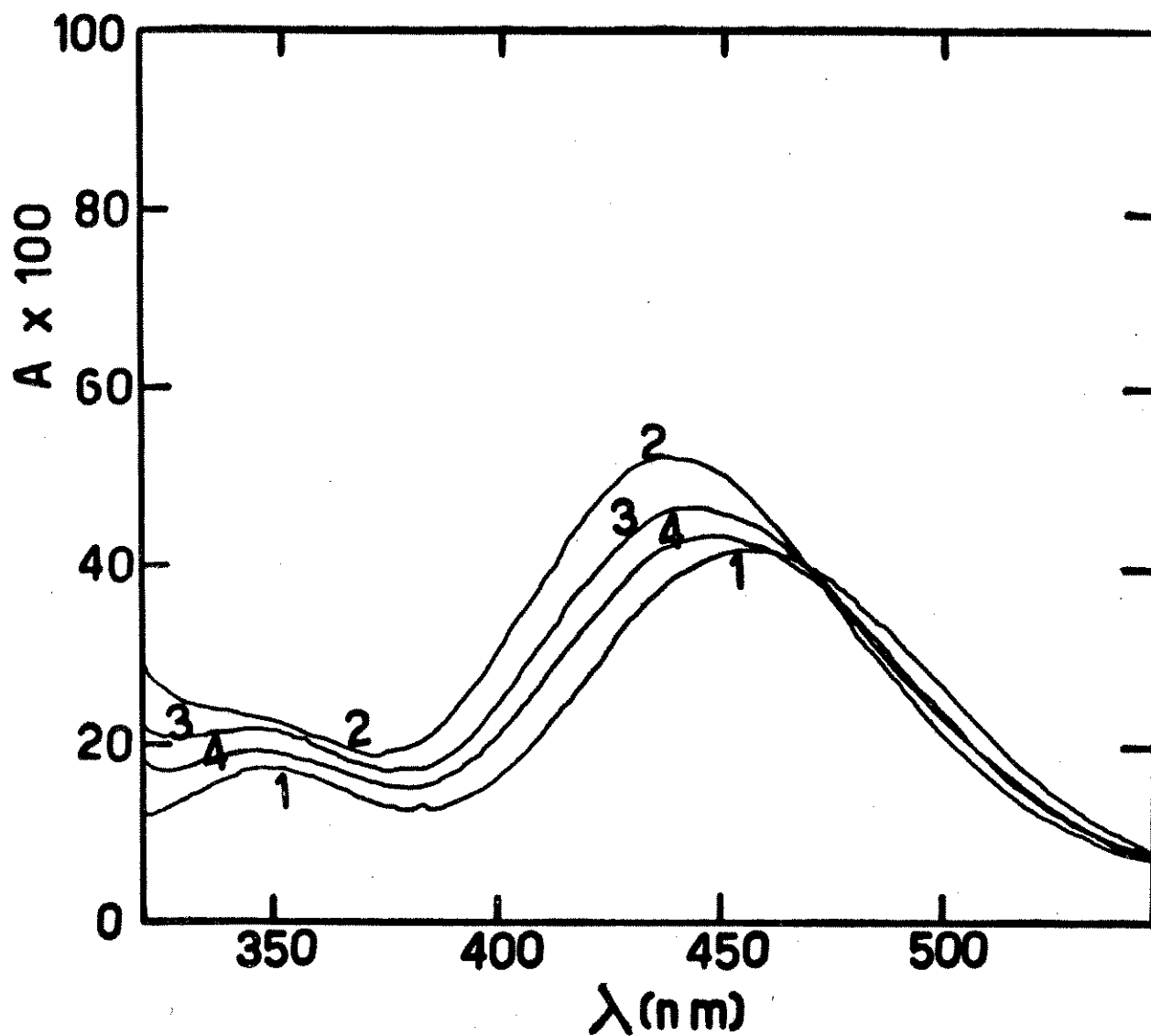


Fig. 22 - Espectros de absorção de iôdo $5,6 \times 10^{-5} \text{ M}$ em solução aquosa, pH = 2,0 (1) e na presença de: (2) histamina 0,2 M; (3) histamina 0,1 M; e (4) histamina 0,05 M. Na presença de histamina 0,01 M o espectro observado não se distingue do (1).

IV. DISCUSSÃO

1. Iodação da histamina e da N-acetil-histamina

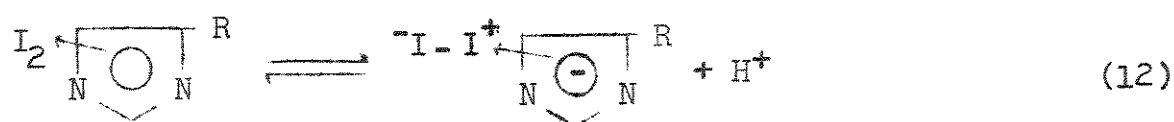
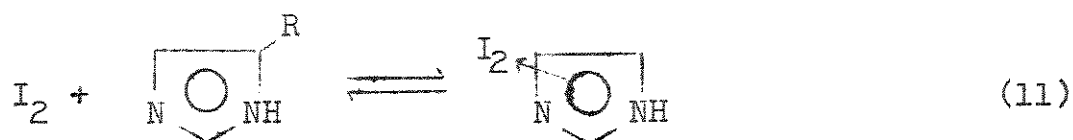
Os derivados mono- e diiodados da histamina e da N-acetil-histamina, que ainda não tinham sido descritos, foram por nós sintetizados. A análise elementar e o espectro de ressonância magnética nuclear permitiu caracterizar os produtos obtidos como: (1) dicloridrato de 5-iodohistamina; (2) 2,5-diiodohistamina; (3) N-acetil-5-iodohistamina; (4) e N-acetil-2,5-diiodohistamina. Verificamos, assim, que a iodação se dá preferentemente na posição 5 (ou 4) do anel imidazólico da histamina, de modo análogo ao que ocorre com o imidazol²⁶ e com a histidina^{13,35,37}. Este fato também está de acordo com o esperado teoricamente, pois os cálculos da densidade eletrônica nos átomos do anel imidazólico de imidazol³⁸ e da histamina³⁹ indicam que a posição 4 (ou 5) é energeticamente mais favorecida do que a posição 2 para a substituição eletrofílica.

O mecanismo da iodação de compostos imidazólicos tem sido estudado por vários autores, havendo concordância dos trabalhos mais recentes^{13,40,41} em que haja um ataque do iodo molecular ao anel imidazólico, na sua forma aniônica, formando-se intermediariamente um complexo sigma. O passo limitante da reação seria a remoção de um próton do complexo sigma com a formação do derivado iodado, e a catálise da iodação por bases se daria por interferência nesta etapa da reação. Os estudos cinéticos que levaram à proposta deste mecanismo foram realizados, em pHs próximos de 7.

Na tentativa de evidenciar a presença de um complexo molecular entre a histamina e o iodo, que precederia a formação do complexo sigma, realizamos um estudo espectrofotométrico da reação em pH mais baixo (entre 3,6 e 5,2) e em presença de baixa concentração de iodeto (os autores acima mencionados empregaram excesso de iodeto). Nestas condições a iodação se processou com suficiente lentidão para permitir a verificação de que parte da absorvância observada em 460 nm era de

vida a iôdo que não se encontrava livre para participar do equilíbrio $I_2 + I^- \rightleftharpoons I_3^-$. Admitindo que êsse iôdo se encontrasse ligado à histamina foi possível chegar-se a uma estimativa da concentração inicial do complexo (q_0), que se mostrou proporcional à velocidade inicial da reação (Tabela VIII e Fig. 20).

O efeito do pH e de q_0 sôbre a velocidade de iodação parece indicar ser a forma catiônica monovalente da histamina a espécie envolvida na formação do complexo com iôdo. Partindo desta premissa chegamos a uma estimativa de 96 ± 20 l/mol para a constante de equilíbrio de formação. Admitindo assim, que se forme inicialmente um complexo molecular da histamina com o iôdo, seguido de rearranjo para um "complexo interno" do tipo proposto para a complexação com outros doadores ⁴¹⁻⁴⁴, propomos o seguinte esquema para a iodação da histamina em meio ácido:



É possível que um mecanismo análogo ocorra na iodação em meio neutro e alcalino, onde a espécie atacada pelo iôdo poderia ser a forma aniônica da histamina, ou mesmo a própria forma monocatiônica.

Os nossos resultados mostram que a aparente resistência da histamina à iodação, observada anteriormente (de modo análogo ao relatado por Brunnings²⁴ para a histamina), não resulta da dificuldade de iodação mas sim de isolamento dos produtos e da ocorrência de reações colaterais⁴⁵. Assim, mesmo nas brandas condições em que se observou a inativação da histamina pelo iôdo²¹, ficou demonstrado que o principal produto é a monoiódohistamina.

2. Titulação da histamina

O valor por nós obtido para o pK_a do amino-grupo da histamina a 25°C (9,75) está de acordo com os valores citados na literatura^{13,46,49} (média: 9,76; limites: 9,69¹³-9,84⁵). Entretanto o nosso valor para o pK_a do grupo imidazólico (6,03) está 0,16 unidades acima da média dos valores obtidos na maioria das determinações anteriores⁴⁶⁻⁴⁹ embora concorde com o valor de 6,09 obtido por Schutte e cols.¹³ à temperatura ambiente. O desvio padrão calculado para 28 titulações da histamina, feitas por nós, foi de 0,02 para o pK_a do imidazol e de 0,07 para o do amino-grupo, e estimamos que o erro sistemático dessas medidas seja menor do que 0,02. Acreditamos que os instrumentos e métodos por nós empregados, em comparação com os dos trabalhos acima citados nos permitem confiar, dentro destes limites de erro, nos valores de pK_a que se encontram na tabela II.

3. Conformação da histamina

Os valores de pK_a do grupo imidazólico e do amino grupo da histamina são cerca de uma unidade mais baixos em relação, respectivamente, aos do imidazol ($pK_a=6,95$)⁵⁰ e da etilamina ($pK_a=10,67$)⁵¹. Este fato tem sido interpretado¹³ como evidência da existência de ponte de hidrogênio intramolecu

lar entre o grupo amônio da cadeia lateral e o nitrogênio piridínico do anel imidazólico. Todavia se tal existisse seria de se esperar um aumento do pK_a do amônio grupo e não um abaixamento. Além disto a diferença mencionada de uma unidade em ambos os valores de pK da histamina é esperada pelo efeito indutivo da cadeia lateral da etilamina protonada sobre o anel imidazólico e o deste sobre a acidez do grupo amônio. Para isto basta confrontarmos o efeito aqui observado com o efeito da cadeia $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+$ sobre o pK_a da piridina⁵² e com as diferenças de pK_a entre a alanina ($pK_{-\text{COOH}}=2,34$; $pK_{-\text{NH}_3^+}=9,69$) e a histamina ($pK_{-\text{COOH}}=1,82$; $pK_{-\text{NH}_3^+}=9,67$)⁵³. Outra evidência contra a

existência da ponte de hidrogênio é a comparação dos valores de $\Delta H=5,8$ kcal/mol. e de $\Delta S=-8$ cal/°mol. para a dissociação do grupo amônio da histamina (Ver tabela VI) com os obtidos para o caso do imidazol ($\Delta H=7,7$ kcal/mol. e $\Delta S=-6$ cal/°mol)⁵⁴. Estes dados sugerem que a diferença de pK entre os dois compostos é devida principalmente ao fator entálpico da variação de energia livre. Se aquela dissociação fosse acompanhada da formação de ponte de hidrogênio intramolecular seria de se esperar maior predominância do fator entrópico.

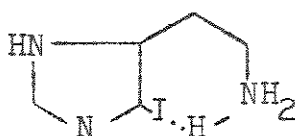
A ponte de hidrogênio intramolecular também não recebe apoio do recente trabalho teórico de Kier³⁹ que, a partir de cálculos de orbitais moleculares da molécula da histamina, chegou à proposta de duas conformações da cadeia lateral de energias aproximadamente iguais e correspondentes a dois mínimos. Nenhuma das duas conformações propostas acomoda a ponte de hidrogênio entre o grupo amônio e o nitrogênio do anel imidazólico.

Outro tipo de argumento em favor da existência da ponte de hidrogênio intramolecular é análogo ao apresentado por Brunnings²⁴ para o caso da histidina (Ver Introdução, p. 4). As tabelas III e IV mostram que a introdução de um e dois átomos de iodo no anel imidazólico da histamina leva à queda de 0,55 e de 1,55 unidades de pK , respectivamente. Estes valores são comparáveis aos de 0,55 e 0,99, respectivamente, observados no caso dos derivados iodados da histidina. Segundo

aquêle autor estas diferenças são muito grandes para serem explicadas por um efeito indutivo do iôdo através do anel imidazólico e dos dois carbonos da cadeia lateral. Este argumento parece ser de validade duvidosa, especialmente se lembrarmos que o pK_a do grupo amônio da diiodo-tirosina (onde não há possibilidade de mecanismo semelhante ao da ponte proposta para a histidina e a histamina) é 1,29 unidades mais baixo do que o da tirosina.

4. Conformação dos derivados iodados

Uma hipótese que merece discussão é a de que a ponte de hidrogênio intramolecular possa ocorrer apenas nos derivados iodados da histamina. Neste caso a participação do nitrogênio do anel imidazólico seria menos provável do que no caso da histamina, restando a possibilidade de ponte entre o grupo amônio e o iôdo em posição 5:



O exame de modelos moleculares mostra que o anel de sete elementos assim formado é estericamente possível. Na formação dêste anel, concomitante com a ionização do grupo imidazólico, a exclusão de água de solvatação da cadeia lateral daria uma contribuição positiva para o ΔS da ionização. Este efeito deve ser maior do que a contribuição negativa a perda de liberdade rotacional da cadeia lateral, resultando num efeito total positivo sobre o ΔS da dissociação do grupo imidazólico.

Entre os resultados da titulação da histamina e de seus derivados iodados (tabela VI) ressalta a observação de que a entropia da dissociação do grupo imidazólico, que é de $-8 \text{ cal/}^\circ\text{mol}$ para a histamina, é próxima de zero para a monoiodohistamina e é de $+7 \text{ cal/}^\circ\text{mol}$ para a diiodohistamina. Infelizmente não é possível uma confrontação quantitativa destes da

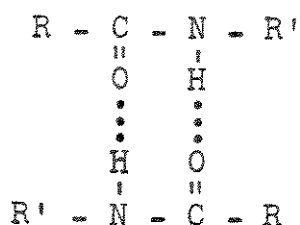
dos com a previsão do efeito da formação da ponte de hidrogênio sobre o valor de ΔS . Também não dispomos de dados para avaliar o efeito da substituição pelo iôdo sobre a diferença de solvatação entre as formas protonada e neutra do anel imidazólico. Entretanto, pela comparação com os dados disponíveis relativos a derivados halogenados de ácidos carboxílicos⁵⁵ pode-se fazer a previsão qualitativa de que a presença de iôdo no anel resulte em contribuição positiva para a ΔS de ionização do grupo imidazólico.

Por outro lado, espectros infra-vermelho dos derivados iodados da histamina e da N-acetil-histamina, apesar da sua complexidade, parecem indicar a possibilidade da ponte de hidrogênio nesses derivados, pelo menos na fase sólida. A comparação do espectro da diiodohistamina básica (Fig. 6) com o da histamina básica, obtido em condições semelhantes por Zarembowitch⁴⁹, mostra que a absorção devida ao estiramento da ligação N-H passa de 3410 cm^{-1} na histamina para 3395 cm^{-1} , com acentuado aumento de intensidade, na diiodohistamina. Um efeito semelhante levou Nyquist⁵⁶ a propôr a existência de ponte de hidrogênio entre o nitrogênio de amidas secundárias e átomos de halogênio substituídos em posição alfa⁵⁷. Além disto o espectro da diiodohistamina apresenta um alargamento e deslocamento para menor frequência do macisso de absorção de histamina na região de 3000 cm^{-1} onde há absorções atribuídas ao estiramento de N-H associado⁵⁸. Outra diferença marcada entre os dois espectros mencionados é o desaparecimento, na diiodohistamina das absorções de deformação do NH_2 em 813 cm^{-1} e em 920 cm^{-1} , que aparentemente se deslocaram para 847 cm^{-1} e 1220 cm^{-1} respectivamente. Estes deslocamentos se assemelham muito aos observados na complexação da histamina com o cobre, onde se verifica ligação do amino-grupo ao metal⁴⁹.

O espectro da monoiodohistamina foi obtido na sua forma diprotonada (Fig. 4) e deve ser comparada com o do dicloridrato de histamina (Fig. 3). Aquí também se nota o deslocamento do macisso de absorção de região de 3000 cm^{-1} para menor frequência e algum aumento da intensidade da absorção em

3400 cm^{-1} . A tentativa de interpretação de outras alterações do espectro torna-se difícil pela falta de atribuições seguras para os picos de absorção da histamina diprotonada.

O espectro da N-acetil-histamina no estado sólido apresenta a banda "Amida I" em 1645 cm^{-1} e a "Amida II" em 1580 cm^{-1} , fato interpretado por Lukton⁵⁹ como indicativo de associação intermolecular do tipo proposto por Mizushima⁶⁰ para amidas secundárias:



No espectro da N-acetil-monoiódohistamina as bandas Amida I e II afastam-se para 1650 cm^{-1} e 1550 cm^{-1} , respectivamente e desaparece a forte absorção observada em 3048 cm^{-1} - atribuída ao estiramento da ligação N-H do anel imidazólico associado⁶¹. Isto pode indicar que tanto o grupo N-H da amida como o do anel imidazólico possam formar pontes de hidrogênio com o iôdo.

O espectro da N-acetil-diiodohistamina apresenta um pequeno deslocamento da banda "Amida II" para 1560 cm^{-1} e um grande deslocamento da "Amida I" para 1625 cm^{-1} , além do reaparecimento de uma forte absorção em 3050 cm^{-1} . Isto poderia ser interpretado em favor da maior associação do tipo C=O...H-N (imidazólico) intermolecular e (amino)NH...I intramolecular.

5. Atividade biológica

O estudo do efeito farmacológico de compostos análogos da histamina, bem como de anti-histamínicos, levou à conclusão de que a histamina se liga ao seu "receptor" celular através de dois pontos da molécula¹⁰. Um desses pontos é o nitrogênio quaternário da cadeia lateral (grupo amônio) e o outro seria um dos nitrogênios do anel. Quanto a este último, Ackermann⁶² propôs que seja o nitrogênio pirrólico (trtrtrtr²),

mas o estudo dos requisitos estruturais para as substâncias com atividade histamínica mostrou a importância do fragmento:



Isto indica que o segundo ponto de ligação seja o nitrogênio piridínico (tr²trtrñ), que é um átomo com maior concentração de elétrons do anel imidazólico da histamina. Se aceitarmos este argumento, uma ponte de hidrogênio entre os nitrogênios da cadeia lateral e piridínico iria competir com a ligação da histamina aos receptores, ao contrário do que se esperaria da proposta de Niemann e Hays². Por outro lado, o exame da estrutura dos anti-histamínicos mais ativos sugere que, para interagir com o receptor, a histamina deva ter uma distância de cerca de 4,8 Å entre os dois hidrogênios referidos³⁹, os quais não poderiam formar ponte de hidrogênio entre si.

Estas considerações, juntamente com os nossos resultados e com os cálculos teóricos de Kier³⁹ levam-nos a propor que seja abandonada a idéia da existência da ponte de hidrogênio até agora geralmente aceita^{13,14}.

Quanto ao efeito da iodação sobre a atividade da histamina, a introdução de um átomo de iodo em posição 5 já é suficiente para eliminar a atividade histamínica. O exame e modelos moleculares mostrou que na monoiodohistamina as duas conformações da cadeia lateral favorecidas pelos cálculos de Kier³⁹ poderiam deixar de ser mínimos de energia; além disto há o efeito do iodo sobre a distribuição eletrônica no anel, com diminuição da negatividade do nitrogênio piridínico necessário à interação com o receptor. Ambos estes efeitos, portanto, devem ter importância para determinar a falta de atividade do derivado. A importância do fator estérico se confirma pela verificação de que também é inativa a 5-metil-histamina, que é o único outro derivado descrito com substituição nessa posição⁶³.

V. RESUMO E CONCLUSÕES

1. Foram sintetizados os seguintes compostos: dicloridrato de monoiódohistamina, diiodohistamina, N-acetil-monoiódohistamina e N-acetil-diiodohistamina.
2. Os novos compostos foram caracterizados pelos espectros infra-vermelho, no estado sólido, e pelos espectros de ressonância magnética nuclear. Demonstrou-se que nos monoiódoderivados o átomo de iôdo ocupa a posição 5 do anel imidazólico e que o segundo átomo de iôdo, nos diiododerivados ocupa a posição 2 do mesmo anel.
3. O estudo espectrofotométrico da cinética de iodação da histamina em pH 3,6-5,2, em presença de baixa concentração de iodeto, apresentou evidências da ocorrência de um complexo molecular entre o iôdo e a histamina. Foi proposto um esquema de iodação em que tal complexo precede a formação de um complexo sigma.
4. Demonstrou-se que quando a histamina é inativada pelo iôdo em meio neutro o principal produto formado é a monoiódohistamina.
5. Os quatro derivados iodados não apresentaram atividade do tipo histamínico sobre o íleo isolado de cobaia. A diiodohistamina apresentou baixa atividade anti-histamínica, que foi menor na N-acetil-diiodohistamina e não se observou com os demais derivados.
6. A histamina, a monoiódohistamina e a diiodohistamina foram tituladas eletrometricamente e determinaram-se os valores de pK_a , ΔH e ΔS para os seus grupos tituláveis. Os pK_a da N-acetil-histamina e de seus derivados iodados foram determinados a 25°C.
7. Dos resultados das titulações concluiu-se pela inexistência, em solução, de ponte de hidrogênio entre o nitrogênio da cadeia lateral e o nitrogênio piridínico do anel imidazólico da histamina.

8. Para os derivados iodados da histamina e da N-acetil-histamina foi sugerida a hipótese de formação de ponte de hidrogênio entre o grupo amônio e o átomo de iôdo em posição 5. Em favor da existência dessa ponte, no estado sólido, foram apresentados argumentos baseados nos espectros infra-vermelho.
9. Foi discutida a importância da conformação da histamina para sua atividade biológica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. A. Windaus, Über synthetische Versuche in der Imidazolgruppe, Ber.dent.chem.Gesellsch. 43 (1910) 2243.
2. C. Niemann e J.T. Hays, The relation between structure and histamine-like activity, J.Am.Chem.Soc. 64(1942)2288.
3. L.A. Walter, W.H. Hunt e R.J. Fosbinder, β -(2-and 4-piridil alkyl) amines, J.Am.Chem.Soc. 63 (1941) 2771.
4. H.M. Lee e R.G. Jones, Histamine activity of some β -aminoethyl heterocyclic nitrogen compounds, J.Pharmac.Exp. Ther. 95 (1949) 71
5. B. Garforth e F.L. Pyman, 4(5) β -alkylamino-ethylglyoxalines, J.Chem.Soc. (1935) 489.
6. A. Vartiainen, The action of certain new histamine derivatives, J.Pharmacol.Exp.Ther. 54 (1935) 265.
7. C.F. Huebner, R.A. Turner e C.R. Scholz, Studies of imidazole compounds.N-derivatives of 4-ethylimidazoles, J. Am.Chem.Soc. 71 (1949) 3942.
8. C.F. Huebner, Studies of imidazole compounds. V. A new and improved synthesis of 4-(2-substituted aminoethyl) -imidazoles, J.Am.Chem.Soc. 73 (1951) 4667.
9. R.B. Barlow, Introduction to chemical pharmacology, Methuen, Londres, 2^a ed (1964), p. 353.
10. R.B. Barlow, obra citada (9) p. 354.
11. K. Hoffman, Imidazole and its derivatives, Part I, Interscience Publishers, New York (1953), p. 168.
12. L. Schutte, De reactie van Histidine met Jodium, Tese, Rotterdam, 1964.
13. L. Schutte, P.P. Kluit e E. Havinga, The substitution reaction of histidine and some other imidazole derivatives with iodine, Tetrahedron Suppl. 7 (1966) 295.

14. M. Rocha e Silva, Action of histamine on the smooth muscle,
in Handbuch der experimentellen Pharmakologie, O. -
Eichler e A. Farah (eds.), vol 18/1, Springer-Verlag,
Berlin (1966) p. 233.
15. R.G. Jones, Chemistry isolation and occurrence of histamine,
in Handbuch der experimentellen Pharmakologie, vol
18/1, O. Eichler e A. Farah (eds.), Springer-Verlag,
Berlin (1966) p. 1.
16. P. van der Merwe, Über einige neue Derivate des Histamins,
Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 177 (1928) 301.
17. F.L. Pyman, 2 Thiol-4(5)- β -aminoethylglyoxaline, J. Chem.
Soc. (1930) 98.
18. Y. Tamamushi, Synthesis of homologs of histamine and their
pharmacological actions, J. Pharm. Soc. Japan 53 (1933)
1080; Chem. Abstr. 29 (1935) 7328.
19. R.G. Jones e M.J. Mann (1961), citado em 15, p. 20.
20. L. Kesztyus, Azo compounds of histamine, Naunyn-Schmiede-
berg's Arch exp. Path. Pharmac. 205 (1948) 287.
21. T.B. Paiva, A.C.M. Paiva e J.L. Prado, Inativação da hista-
mina pelo iôdo in vitro, Ciência e Cultura 5 (1953)
237
22. A.C.M. Paiva e T.B. Paiva, Mecanismo de inativação da hista
mina pelo iôdo, An. Acad. Bras. Ci. 30 (1958) XLVI.
23. H. Pauly e K. Gundermann, Über jodierte Abkömmlinge des Imi
dazols und des histidins, Ber deut. chem. Gesellsch.
43 (1910) 2243.
24. K.J. Brunnings, Preparation and properties of the iodohisti
dines, J. Am. Chem. Soc. 69 (1947) 205.
25. H. Pauly e E. Arauner, citado em 11, p. 124.
26. A. Grimison e J. H. Ridd, The kinetics of diazo-coupling and
iodination of glyoxaline and some deuteroglyoxalines,
J. Chem. Soc. (1959) 3019.

27. C.H. Li, Kinetics of reactions between iodine and histidine, J.Am.Chem.Soc. 66 (1944) 225.
28. L.F. Fieser, in Organic Chemistry, H. Gilman (ed.) John Wiley & Sons, Londres, 2^a ed. (1943) p. 174.
29. Reativos de coloración para cromatografía em capa fina y en papel, E. Merck, A.G., Darmstadt, p. 11.
30. R.G. Bates, Eletromeric pH determinations, John Wiley & Sons, New York (1954) p. 118.
31. N. Joop e H. Zimmermann, Nuclear magnetic resonance studies on proton exchange reactions with some azoles, Z.Elektrochem. 66 (1962) 541.
32. G.S. Reddy, R.T. Hotgood e J.H. Goldstein, N.M.R. studies of pyrimidine, imidazole and their monomethyl derivatives, J.Am.Chem.Soc. 84 (1962) 336.
33. C.C. McDonald e W.D. Phyllips, A.N.M.R. study of structure of cobalt (II) histidine complexes, J.Am.Chem.Soc. 85 (1963) 3736.
34. M.R. Bruce e R. Mathur, Analysis of N.M.R. spectra of cysteine and histidine and derivatives. Conformational equilibria, J.Am.Chem.Soc. 87 (1965) 1065.
35. H.B. Bensusan e M.S.R. Naider, The identification of 4(5)-iodohistidine as the product of the limited iodination of histidine, Biochemistry 6 (1967) 12.
36. H. Tabor e E. Mosettig, Isolation of acetylhistamine from urine following oral administration of histamine, J.Biol.Chem. 180 (1949) 703.
37. C.T. Holloway, R.P.M. Bond, I.G. Knight e R.B. Beechey, The alleged presence and role of moniodohistidine in mitochondrial oxidative phosphorylation, Biochemistry 6 (1967) 19.
38. W. Adam e A. Grimison, Extended Hückel theory applied to electrophilic substitution in imidazole, Tetrahedron 22 (1966) 835.

39. L.B. Kier, Molecular orbital calculations of the preferred conformations of histamine and a theory on its dual activity, J. Med. Chem. 11 (1968) 441.
40. D.G. Lambert e M.M. Jones, The iodination of coordinated imidazole, J. Am. Chem. Soc. 88 (1966) 5537.
41. C. Reid e R.S. Mulliken Molecular compounds and their spectra. IV. The pyridine-iodine system, J. Am. Chem. Soc. 76 (1954) 3869.
42. J.H. Lupinski, The charge-transfer complex between -carotene and iodine. II characterization of complex, J. Phys. Chem. 67 (1963) 2725.
43. C.D. Schmulbach e D.M. Hart, Molecular addition compounds of amines and iodine. Evidence for the existence of a 2:1 triethylamine-iodine complex, J. Am. Chem. Soc. 86 (1964) 2347.
44. M.A. Slifkin, Interaction of charge donors with iodine in water, Spectrochim. Acta 21 (1965) 1391.
45. L. Schutte e H. Havinga, The degradation reaction of histidine with iodine, Rec. Trav. Chin. des Pays. Bas, 86 (1967) 385.
46. M. Levy, A note on the titration constants of imidazole derivatives, J. Biol. Chem. 109 (1935) 361.
47. S.N.R. Schalien, Potentiometric studies on histamine and its metal chelates. I. Ionization constants of histamine in aqueous potassium chloride solutions, Suomen Kemistilichti, 31B (1958) 372; Chem. Abstr. 53 (1959) 12798.
48. F. Holmes e F. Jones, Metal complexes of histamine and some structural analogues. Part I., J. Chem. Soc. (1960) 2398.
49. J. Zarenbowitch, Étude par spectrographie infrarouge du complexe $\text{Cu}(\text{Histamine})_2(\text{ClO}_4)_2$, J. Chim. Phys. 63 (1966) 445.

50. A.H.M. Kirby e A. Neuberger, Glyoxalines: The determination of their pK values and the use of their salts as buffers, Biochem. J. 32 (1938) 1146.
51. W.S. Fyfe, Complex ion formation. Part III. The entropies of reaction of the silver and hydrogen ions with some - aliphatic amines, J.Chem.Soc. (1955) 1347.
52. J. Clark e D.D. Perrin, Prediction of the strengths of organic bases, Quart.Rev. 18 (1964) 295.
53. E.J. Cohn e J.I. Edsall, Proteins, Amino acids and peptides, Reinhold Publishing Corp., New York, (1943) p. 84.
54. Y. Nozaki, F.R.N. Gurd, R.F. Chein e J.T. Edsall, The association of 4-methyl imidazole with the ions of cupric copper and Zinc, with some, J.Am.Chem.Soc. 79 - (1957) 2123.
55. J. Christensen, R.M. Izatt e L.D. Hansen, Thermodynamics of proton ionization in dilute aqueous solution. VII. ΔH° and ΔS° values of proton ionization from carboxylic acids at 25°C, J.Am.Chem.Soc. 89 (1967) 213.
56. R.A. Nyquist, The structural configuration of some α -substituted secondary acetamides in dilute CCl_4 solution, Spectrochim.Acta 19 (1963) 509.
57. L.J. Bellamy, Advances in infrared group frequencies, Methuen, Londres (1968), p. 112.
58. A.M. Bellock, C. Perchard, A. Novak e M.L. Josien, Spectres de vibration de l'imidazole (D_3)-2,4,5 et de l'imidazole (D_4), J.Chim.Phys. 62 (1965) 1334.
59. A. Lukton, Participation of imidazole in intramolecular hydrogen bonding, Nature 192 (1961) 422.
60. Mizushima, The molecular structure of simple substances related to proteins, Adv.Prot.Chem. 9 (1954) 299.
61. D.M. Anderson, J.C. Duncan e F.J.C. Rossotti, The hydrogen bonding of imidazole in carbon tetrachloride solution J.Chem.Soc. (1961) 2185.

62. D.Ackermann, Zur Kenntnis des Histamins und seiner Beziehung zur Anaphylaxie, Naturwissenschaften 27 (1939) 515.
63. G.A. Alles, B.B. Wisegardner e M.A. Shull, Comparative physiological actions of some β -(imidazolyl-4) alkylamines, J.Pharmacol.Exp.Ther. 77 (1943) 54.