



UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
ÁREA DE CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**Iodo-funcionalização seletiva C3-H de 1*H*-indóis biocatalisada pelo sistema
lacase-mediador redox**

VINÍCIUS BERTONCELLO MOLON

CAXIAS DO SUL

2022

VINÍCIUS BERTONCELLO MOLON

**Iodo-funcionalização seletiva C3-H de 1*H*-indóis biocatalisada pelo sistema lacase-
mediador redox**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando o cumprimento dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, sob orientação do Professor Dr. Thiago Barcellos da Silva.

CAXIAS DO SUL

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
Sistema de Bibliotecas UCS - Processamento Técnico

M728i Molon, Vinícius Bertoncello

Iodo-funcionalização seletiva C3-H de 1*H*-indóis biocatalisada pelo sistema lacase-mediador redox [recurso eletrônico] / Vinícius Bertoncello Molon. – 2022.

Dados eletrônicos.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2022.

Orientação: Thiago Barcellos da Silva.

Modo de acesso: World Wide Web

Disponível em: <https://repositorio.ucs.br>

1. Biotecnologia. 2. Iodo. 3. Biocatálise. 4. Compostos orgânicos. 5. Indol. I. Silva, Thiago Barcellos da, orient. II. Título.

CDU 2. ed.: 57.08

Catalogação na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o)
Márcia Servi Gonçalves - CRB 10/1500

**Iodo-funcionalização seletiva C3-H de 1H-indóis biocatalisada pelo sistema lacase-
mediador redox**

Vinícius Bertoncello Molon

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando o cumprimento dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, sob orientação do Professor Dr. Thiago Barcellos da Silva.

Dissertação aprovada em 01 de julho de 2022.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Thiago Barcellos da Silva
Universidade de Caxias do Sul (UCS)

Prof. Dr^a. Angélica Venturini Moro
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Prof. Dr. Rogério Aparecido Gariani
Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC)

Prof. Dr. Sidnei Moura e Silva
Universidade de Caxias do Sul (UCS)

*“Nada pode o olvido
contra o sem sentido
apelo do Não.*

*As coisas tangíveis
tornam-se insensíveis
à palma da mão.*

*Mas as coisas findas,
muito mais que lindas,
essas ficarão.”*

Carlos Drummond de Andrade

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade de Caxias do Sul (UCS), em especial ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBIO), por possibilitarem a realização dessa pesquisa, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao meu orientador, professor Thiago Barcellos da Silva, pela orientação, ensinamentos, paciência e confiança para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Aos colegas e amigos que estão ou estiveram no Laboratório de Biotecnologia de Produtos Naturais e Sintéticos (LBIOP) da Universidade de Caxias do Sul, pelo apoio, conversas, risadas e ideias trocadas. Aos técnicos que contribuíram com a realização de ensaios apresentados nessa pesquisa, em especial a técnica Tainara Guizolfi.

As alunas de iniciação científica Bianca Stela Prigol e Luz Maria Manenti pela amizade, dedicação e auxílio para a realização desse trabalho.

E por fim, agradecer a minha família, em especial aos meus pais, Valdomiro Leonel Molon e Jovane Roberta Bertoncello pelo amor, carinho, incentivo e apoio. Muito obrigado, AMO vocês!

RESUMO

O 1*H*-indol é um composto de origem natural o qual apresenta uma estrutura bicíclica constituída de um anel benzênico fundido a um anel pirrólico. Este composto é naturalmente produzido por bactérias e fungos e está presente nas fezes humanas, sendo um dos componentes responsáveis pelo odor desagradável. Porém, em baixas concentrações apresenta um odor floral, e por isso, é empregado na indústria de perfumaria. O 1*H*-indol faz parte da estrutura química de importantes moléculas naturais com relevantes atividades biológicas, como exemplos o aminoácido triptofano, o neurotransmissor serotonina e o hormônio melatonina. Por ser amplamente encontrado como parte da estrutura de produtos naturais e com relevantes atividades biológicas, o 1*H*-indol é considerado uma estrutura privilegiada, e, portanto, uma estrutura largamente empregada na química medicinal. Prova disso é o número elevado de fármacos disponíveis para o tratamento de doenças como o câncer, depressão e hipertensão. Por outro lado, as enzimas lacases têm se destacado como importantes biocatalisadores em reações químicas que não são naturais a estas enzimas, proporcionando o desenvolvimento de metodologias sintéticas que vão ao encontro dos princípios da química verde. Assim, aliando a importância do 1*H*-indol e seus derivados como intermediários em processos sintéticos, e o poder da biocatálise como estratégia para a transformação químicas, buscou-se neste trabalho desenvolver uma abordagem biotecnológica, empregando o sistema lacase-mediador redox, para a iodo-funcionalização do 1*H*-indol e derivados. Os compostos indólicos iodo-funcionalizados na posição C3 são importantes compostos intermediários para a obtenção de derivados funcionalizados, principalmente a partir de reações de acoplamento cruzado. Nesse trabalho, a lacase de *Trametes versicolor* e o ABTS mostraram-se como um sistema lacase-mediador redox adequado para a oxidação do ânion iodeto, fornecido na forma de iodeto de potássio, gerando a espécie reativa de iodo, o ânion I_3^- . Por sua vez o I_3^- promove a iodo-funcionalização do 1*H*-indol com alta seletividade na posição C-3 e em excelente rendimento isolado de 99%. A metodologia foi estendida para outros dezesseis derivados do 1*H*-indol, em que foi observado também valores de conversão superiores a 97% e rendimentos acima de 89%. Devido aos altos valores de conversão e a simplicidade do meio reacional, a metodologia também se destaca pela simplificada etapa de isolamento dos produtos. Sendo assim, foi proposto e desenvolvido uma metodologia com abordagem biotecnologia para a iodo-funcionalização de 1*H*-indois com resultados comparáveis as metodologias já descritas na literatura.

Palavras-chave: 1*H*-indol, 3-iodo-1*H*-indol, iodo-funcionalização, biocatálise

ABSTRACT

1*H*-indole is a naturally occurring compound which has a bicyclic structure which consists of a benzene ring fused to a pyrrole ring. This compound is naturally produced by bacteria and fungi and is present in human feces, being one of the components responsible for the unpleasant odor. However, in low concentrations it has a floral odor, and therefore, it is used in the perfumery industry. 1*H*-indole is part of the chemical structure of important natural molecules with relevant biological activities, such as the amino acid tryptophan, the neurotransmitter serotonin and the hormone melatonin. Because it is widely found as part of the structure of natural products and with relevant biological activities, 1*H*-indole is considered a privileged structure, and therefore, a structure widely used in medicinal chemistry. Proof of this is the high number of drugs available for the treatment of diseases such as cancer, depression and hypertension. On the other hand, laccase enzymes have been highlighted as important biocatalysts in chemical reactions that are not natural to these enzymes, providing the development of synthetic methodologies that meet the principles of green chemistry. Thus, combining the importance of 1*H*-indole and its derivatives as intermediates in synthetic processes and the power of biocatalysis as a strategy for chemical transformation, this work aims to develop a biotechnological approach, using the laccase-redox mediator system, for iodine functionalization of 1*H*-indole and derivatives. The iodine-functionalized indole compounds at the C3 position are important intermediates, providing the obtaining of functionalized compounds, mainly from cross-coupling reactions. *Trametes versicolor* laccase and ABTS proved to be a suitable laccase-redox mediator system for the oxidation of the iodide anion, supplied in the form of potassium iodide, generating the reactive iodine species, I_3^- . In turn, I_3^- promotes iodine functionalization of 1*H*-indole with high selectivity at the C-3 position and an excellent yield of 99%. The methodology was extended to other sixteen derivatives of 1*H*-indole, in which conversion values above 97% and yields above 89% were also observed. Due to the high conversion values and the simplicity of the reaction medium, the methodology also stands out for the simplified isolation step of the products. Therefore, a methodology with a biotechnology approach was proposed and developed for the iodine functionalization of 1*H*-indoles with results comparable to the methodologies already described in the literature. However, with the benefits offered by biocatalysis.

Keywords: 1*H*-indole, 3-iodo-1*H*-indole, iodine-functionalization, biocatalysis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química do 1 <i>H</i> -indol e seus isômeros e a numeração respectiva a posição dos elementos de acordo com a nomenclatura IUPAC.....	16
Figura 2 – Esquema reacional representando a reação de oxidação do índigo (2) e posterior redução da isatina (3) e do oxindol (4)	17
Figura 3 – Reação de obtenção do 1 <i>H</i> -indol feita por Bayer e Emmerling	17
Figura 4 – Síntese industrial do 1 <i>H</i> -indol a partir da anilina e do etilenoglicol.....	18
Figura 5 – Compostos indólicos de ocorrência natural.....	18
Figura 6 – Alcaloides indólicos com importante atividade farmacológica.....	19
Figura 7 – Estrutura de medicamentos derivados da serotonina	20
Figura 8 – Fotografia da flor do <i>Catharanthus roseus</i> e estrutura química da vincristina.	21
Figura 9 – Moléculas com núcleo indólico presentes em medicamentos já comercializados, suas atividades biológicas e modo de ação.	22
Figura 10 – Exemplos de reações de acoplamento cruzado a partir de iodeto de arila.	23
Figura 11 – Valores de indóis iodo-funcionalizados disponíveis comercialmente	24
Figura 12 – Síntese do 3-iodo-1 <i>H</i> -indol proposta por Ermolenko, Budylin e Knost	25
Figura 13 – Síntese de compostos indólicos com a posição C3 substituída	25
Figura 14 – Iodo-funcionalização do 1 <i>H</i> -indol proposta por Hami <i>et al.</i> (2012).....	26
Figura 15 – Iodo funcionalização de compostos indólicos utilizando eletroquímica.....	27
Figura 16 – Síntese da espirotriptostatina A feita por Unsworth, Cuthbertson e Taylor.....	28
Figura 17 – Representação da estrutura cristalina da lacase de <i>T. versicolor</i> extraída do Protein Data Bank (a) e representação dos seus sítios de cobre.....	31
Figura 18 – Representação simplificada do mecanismo de oxidação da hidroquinona por uma lacase com a conversão do oxigênio em água.	32
Figura 19 – Mecanismo catalítico do sistema lacase-mediador	32
Figura 20 – Exemplos dos mediadores-redox utilizados com frequência em reações mediadas por lacases.	33
Figura 21 – Representação reacional da oxidação mediador-substrato pelas rotas: A) transferência de átomo de hidrogênio (HAT), B) transferência de elétron (ET) e C) Oxidação iônica.	34
Figura 22 – Reação de oxidação do ácido ferrúlico em meio contendo glicose e etanol em condições aeróbicas	35
Figura 23 – Biotransformação do ácido ferúlico utilizando lacase	36

Figura 24 – Obtenção de inonas utilizando o sistema mediador lacase/TEMPO.....	36
Figura 25 – Trimerização biocatalítica do 1 <i>H</i> -indol.....	37
Figura 26 – Formação de iodovanilina utilizando o sistema LMS lacase, ABTS.....	38
Figura 27 – Formação de compostos iodofenólicos utilizando o sistema LMS lacase, ABTS	39
Figura 28 – Reação de iodação do 1 <i>H</i> -indol utilizando o sistema redox lacase mediador.....	56
Figura 29 – Cromatogramas obtidos por GC-MS do 1 <i>H</i> -indol (a) e da respectiva reação de iodação empregando o sistema redox lacase/ABTS após 48 h (b).....	57
Figura 30 – Espectro de massas obtido por GC-MS da amostra padrão de 1 <i>H</i> -indol (a) e do 3-iodo-1 <i>H</i> -indol (b), obtido como produto da reação de iodação empregando o sistema redox lacase/ABTS.....	58
Figura 31 – Efeito do tempo reacional na conversão do 1 <i>H</i> -indol ao 3-iodo-1 <i>H</i> -indol nas temperaturas de 30 °C, 40 °C e 50 °C, empregando o sistema redox lacase/ABTS e iodeto de potássio como fonte de iodo.....	59
Figura 32 – Sobreposição dos espectros de RMN de ¹ H do 1 <i>H</i> -indol em vermelho, e do 3-iodo-1 <i>H</i> -indol em verde (a), expansão do espectro da sobreposição dos RMN de ¹ H.....	60
Figura 33 – Expansão do RMN de ¹ H do 3-iodo-1 <i>H</i> -indol na região entre 6,67 até 7,64 ppm.	61
Figura 34 – Espectro de RMN de ¹³ C do 3-iodo-1 <i>H</i> -indol	62
Figura 35 – Esquemas reacionais representando os experimentos controle para avaliar a dependência de cada um dos componentes reacionais na síntese do 3-iodo-1 <i>H</i> -indol.	65
Figura 36 – Efeito da variação de mediadores na reação de iodo funcionalização do 1 <i>H</i> -indol	69
Figura 37 – Espectro de varredura de comprimento de onda do iodeto de potássio em solução obtido por espectrofotometria de UV-VIS.....	74
Figura 38 – Sobreposição de gráficos referentes a varreduras no espectrofotômetro de UV-VIS para a observação da formação e consumo de triiodeto	75
Figura 39 – Espectro de massas referente ao KI solubilizado em solução tampão acetato 0,1 mol L ⁻¹ pH 5,0	76
Figura 40 – a) Espectro de massas da reação contendo KI, ABTS e lacase em solução tampão de acetato 0,1 mol L ⁻¹ pH 5,0. b) Espectro de fragmentação (MS2) do íon com <i>m/z</i> 380	76
Figura 41 – Mecanismo reacional proposto para a formação de I ₃ ⁻ pelo sistema redox lacase-	

ABTS	77
Figura 42 – Mecanismo reacional proposto para a iodo-funcionalização do 1 <i>H</i> -indol.....	78
Figura 43 – Espectro de RMN de ¹ H (300 MHz) do composto 3-iodo-1-metil-1 <i>H</i> -indol (i2) em DMSO- <i>d6</i>	84
Figura 44 – Espectro de RMN de ¹³ C (75 MHz) do composto 3-iodo-1-metil-1 <i>H</i> -indol (i2) em DMSO- <i>d6</i>	85
Figura 45 – Espectros de RMN de ¹ H (300 MHz) do composto 3-iodo-1-propil-1 <i>H</i> -indol (i3) em DMSO- <i>d6</i>	86
Figura 46 – Espectros de RMN de ¹³ C (75 MHz) do composto 3-iodo-1-propil-1 <i>H</i> -indol (i3) em DMSO- <i>d6</i>	87
Figura 47 – Espectros de RMN de ¹ H (a) (300 MHz) do composto 3-iodo-1-benzil-1 <i>H</i> -indol (i4) em DMSO- <i>d6</i>	88
Figura 48 – Espectro de RMN de ¹³ C (75 MHz) do composto 3-iodo-1-benzil-1 <i>H</i> -indol (i4) em DMSO- <i>d6</i>	89
Figura 49 – Espectros de RMN de ¹ H (300 MHz) do composto 3-iodo-1-alil-1 <i>H</i> -indol (i5) em DMSO- <i>d6</i>	90
Figura 50 – Espectros de RMN de ¹³ C (75 MHz) do composto 3-iodo-1-alil-1 <i>H</i> -indol (i5) em DMSO- <i>d6</i>	91
Figura 51 – Espectros de RMN de ¹ H (300 MHz) do composto 5-bromo-3-iodo-1 <i>H</i> -indol (i11) em DMSO- <i>d6</i>	92
Figura 52 – Espectros de RMN de ¹³ C (75 MHz) do composto 5-bromo-3-iodo-1 <i>H</i> -indol (i11) em DMSO- <i>d6</i>	93
Figura 53 – Espectros de RMN de ¹ H (300 MHz) do composto 5-metoxi-3-iodo-1 <i>H</i> -indol (i12) em DMSO- <i>d6</i>	94
Figura 54 – Espectros de RMN de ¹³ C (75 MHz) do composto 5-metoxi-3-iodo-1 <i>H</i> -indol (i12) em DMSO- <i>d6</i>	95
Figura 55 – Espectros de RMN de ¹ H (300 MHz) do composto 3-iodo-7-aza-1 <i>H</i> -indol (i14) em DMSO- <i>d6</i>	96
Figura 56 – Espectros de RMN de ¹³ C (75 MHz) do composto 3-iodo-7-aza-1 <i>H</i> -indol (i14) em DMSO- <i>d6</i>	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Influência da natureza da solução tampão bem como do respectivo pH na conversão do 1 <i>H</i> -indol ao 3-iodo-1 <i>H</i> -indol.....	63
Tabela 2 – Influência das variações de quantidades de KI, ABTS, solução tampão e lacase de <i>T. versicolor</i> empregados na reação para a conversão do 1 <i>H</i> -indol ao 3-iodo-1 <i>H</i> -indol.....	67
Tabela 3 – Influência da variação de cossolventes empregados na reação para avaliação de conversão do 1 <i>H</i> -indol para o 3-iodo-1 <i>H</i> -indol.....	68
Tabela 4 – Reação de iodação de derivados do 1 <i>H</i> -indol utilizando o sistema redox lacase/ABTS.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS, ACRÔNIMOS E SIGLAS

ABTS	Sal de amônio do ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
Anti-UV	Anti raios ultravioleta
ATR-FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier com reflectância total atenuada do inglês <i>Attenuated total reflectance Fourier-transform infrared spectroscopy</i>
Boc	<i>tert</i> -butiloxicarbonila
Boc ₂ O	Dicarbonato de di- <i>tert</i> -butila
Ceto-ABNO	9-azabicyclo[3,3,1]nonan-3-ona-9-oxil
DEPT	Aprimoramento sem distorção por transferência de polarização
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
EC	Comissão de enzimas do inglês <i>Enzyme Commission</i>
ET	Transferência de elétrons
GC-MS	Cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas do inglês <i>Gas chromatography coupled with mass spectrometry</i>
HAT	Transferência de átomo de hidrogênio
HPLC-MS	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas do inglês <i>high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry</i>
LMS	Sistema lacase mediador do inglês <i>Laccase Mediator System</i>
PDB	Banco de dados de proteínas do inglês <i>Protein Data Bank</i>
RMN de ¹ H	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN de ¹³ C	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono
TBAF	Fluoreto de tetra- <i>n</i> -butilamonio do inglês <i>tetra-<i>n</i>-butylammonium fluoride</i>
TEMPO	2,2,6,6-tetrametilpiperidi-1-niloxi
THF	Tetrahidrofurano
UV-Vis	Espectroscopia de absorção molecular na região do ultravioleta e do visível do inglês <i>Molecular absorption spectroscopy in the ultraviolet and visible region</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	OBJETIVO GERAL.....	15
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	COMPOSTOS INDÓLICOS	16
2.2	COMPOSTOS ORGÂNICOS CONTENDO IODO	22
2.2.1	Compostos indólicos iodo-funcionalizados na posição C3	23
2.3	BIOCATÁLISE E ENZIMAS	28
2.3.1	Lacases	29
2.4	APLICAÇÕES DAS LACASES EM SÍNTESE ORGÂNICA	34
3	MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1	MATERIAIS	40
3.2	MÉTODOS	40
3.2.1	Técnicas e metodologias para a caracterização química	40
3.2.2	Preparo das soluções tampão	41
3.2.3	Ensaio de atividade enzimática para a lacase de <i>T. versicolor</i>	41
3.2.4	Síntese dos substratos derivados do 1<i>H</i>-indol	42
3.2.4.1	Síntese do 1-metil-1 <i>H</i> -indol (43)	42
3.2.4.2	Síntese do 1-propil-1 <i>H</i> -indol (44)	43
3.2.4.3	Síntese do 1-benzil-1 <i>H</i> -indol (45)	44
3.2.4.4	Síntese do 1-alil-1 <i>H</i> -indol (46)	44
3.2.4.5	Síntese do 1-(prop-2-in-1-il)-1 <i>H</i> -indol (47).....	45
3.2.4.6	Síntese do 1-Boc-1 <i>H</i> -indol (48)	46
3.2.4.7	Síntese do 1-tosil-1 <i>H</i> -indol (49).....	47
3.2.4.8	Síntese do 1-(<i>tert</i> -butildimetilsilil)-1 <i>H</i> -indol (50)	48
3.2.4.9	Síntese do di(1 <i>H</i> -indol-1-il)metano (51)	48
3.2.5	Iodo-funcionalização do 1<i>H</i>-indol e derivados	49
3.2.5.1	3-iodo-1<i>H</i>-indol (i1)	50
3.2.5.2	1-metil-3-iodo-1 <i>H</i> -indol (i2)	50
3.2.5.3	1-propil-3-iodo-1 <i>H</i> -indol (i3)	51
3.2.5.4	1-benzil-3-iodo-1 <i>H</i> -indol (i4)	51
3.2.5.5	1-alil-3-iodo-1 <i>H</i> -indol (i5)	52
3.2.5.6	5-bromo-3-iodo-1 <i>H</i> -indol (i11).....	52
3.2.5.7	5-metoxi-3-iodo-1 <i>H</i> -indol (i12)	53

3.2.5.8	3-iodo-7-aza-1 <i>H</i> -indol (i14)	53
3.2.5.9	2-metil-3-iodo-1 <i>H</i> -indol (i15).....	54
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES REACIONAIS	55
4.1.1	Efeito da solução tampão e pH na conversão do 1 <i>H</i> -indol	62
4.1.2	Efeito da variação de KI, ABTS, solução tampão e lacase na conversão da reação	64
4.1.3	Efeito da variação de cossolventes na conversão da reação	67
4.1.4	Efeito do mediador redox na conversão da reação	69
4.2	IODO-FUNCIONALIZAÇÃO DE DERIVADOS DO 1 <i>H</i> -INDOL	70
4.3	INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO REACIONAL	73
5	CONCLUSÕES	79
	REFERÊNCIAS	80
	APÊNDICE A – ESPECTROS DE RMN DE ¹H E ¹³C DOS IODO-INDOIS	84

1 INTRODUÇÃO

O 1*H*-indol é um importante sistema heterocíclico presente em uma variedade de moléculas biologicamente ativas. Devido a isso, a pesquisa dessa privilegiada estrutura tem despertado o interesse para triagem de diferentes moléculas com atividades farmacológicas. Vários compostos naturais contêm o 1*H*-indol como núcleo parental, por exemplo, triptofano e a melatonina.

Moléculas funcionalizadas com iodo, por sua vez, possuem ampla utilização como compostos empregados em reações de acoplamento cruzado, como por exemplo, os acoplamentos de Mizokori-Heck, Sonogashira, Suzuki-Miyaura, Negishi e Migita-Kosugi-Stille. Um fato interessante sobre os compostos iodados é que estes são extremamente raros na natureza. Até 2014, eram conhecidos cerca de 290 compostos, atuando como recicladores de iodo em feromônios e hormônios ou como substâncias de defesa química, como antimicrobianos, anti-UVs e anti-incrustantes.

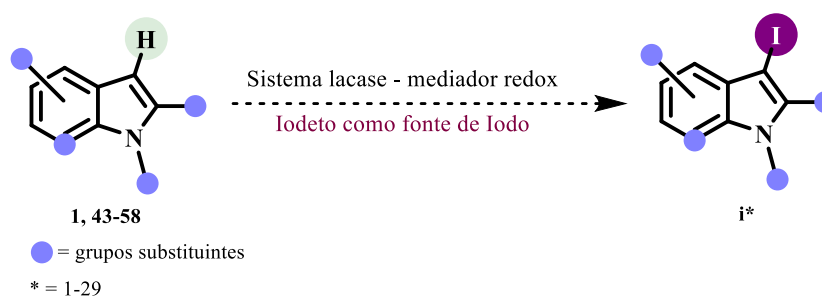
O desenvolvimento de processos biotecnológicos está ligado aos princípios da *Química Verde* e da *Engenharia Verde*, possibilitando o desenvolvimento de metodologias ecologicamente e economicamente atrativas para obtenção de compostos químicos de interesse comercial e social. Os processos biocatalíticos, nos quais são empregadas enzimas isoladas ou ainda presentes em micro-organismos como catalisadores naturais em reações orgânicas, fornecem soluções "limpas" quando comparadas aos processos químicos tradicionais, incluindo uma considerável redução do uso de solventes orgânicos, empregando condições reacionais mais brandas, como temperaturas elevadas ou criogênicas, e em muitos casos altas pressões, e principalmente a ausência de metais considerados tóxicos como catalisadores.

Dentre as diferentes classes de enzimas empregadas em processos químicos e biotecnológicos, as enzimas oxirredutases (EC 1) tornaram-se uma alternativa interessante, passando de uma curiosidade experimental para a realidade das empresas farmacêuticas e da química fina, como por exemplo o emprego de oxirredutases pelas empresas Codexis e Pfizer na produção do fármaco atorvastatina. As oxirredutases compreendem a maior classe das seis classes de enzimas definidas pelo comitê de nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular e entre elas podemos destacar as enzimas lacases, as quais são um grupo de enzimas contendo átomos de cobre na sua estrutura e que são pouco específicas, atuando principalmente na oxidação de compostos aromáticos. As lacases são encontradas em fungos e foram desenvolvidas principalmente para degradação de material lignocelulósico.

Deste modo, esse plano de trabalho objetiva o estudo da reação de iodo-funcionalização empregando *1H*-indol e derivados, biocatalisada pelo sistema redox lacase-ABTS utilizando sais de iodo simples, como o iodeto de potássio.

1.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma nova metodologia baseada em biotecnologia, empregando a biocatálise, para a iodo-funcionalização do *1H*-indol e derivados por meio de um sistema catalítico lacase-mediador redox.



1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- O desenvolvimento de uma metodologia alternativa as já descritas na literatura para a iodo-funcionalização do *1H*-indol empregando a biocatálise.
- empregar sais simples de iodo como fonte deste elemento na reação de iodo-funcionalização biocatalisada pela lacase de *Trametes versicolor*.
- investigar o papel do sistema lacase-mediador redox, bem como o papel do sistema de solventes, em diferentes condições de iodo-funcionalização.
- estender a metodologia para derivados do *1H*-indol e observar o efeito dos grupos substituintes na conversão, seletividade e rendimento nas reações de iodo funcionalização.
- propor um mecanismo reacional para iodo-funcionalização dos *1H*-indóis.

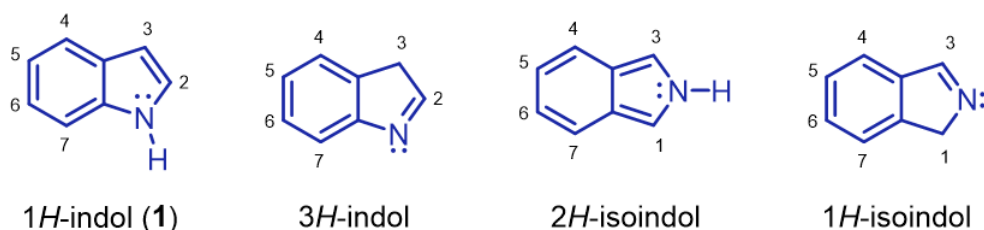
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo será abordada na forma de revisão bibliográfica a importância dos compostos indólicos, bem como a importância e exemplos de reações de iodo-funcionalização destes compostos para a síntese de moléculas de relevante atividade biológica. Adicionalmente, será abordado o estado da arte da biocatálise, com foco nas enzimas lacases, nos sistemas biocatalíticos lacase-mediador redox, além dos recentes estudos em que as enzimas lacases foram empregadas em reações de iodo-funcionalização.

2.1 COMPOSTOS INDÓLICOS

O *1H*-indol (**1**), também conhecido como 2,3-benzopirrol, é uma molécula aromática planar, com todos os átomos com hibridização sp^2 e cada um deles possuindo um orbital p não hibridizado. Esses orbitais p se sobrepõem para gerar um orbital π molecular contendo 10 elétrons (Figura 1). O *1H*-indol é uma substância que embora seja sólida a temperatura ambiente, possui um baixo ponto de fusão, de 52,5 °C. Uma das características organolépticas marcante do *1H*-indol é o odor relacionado ao odor de fezes, uma vez que o *1H*-indol é decorrente do metabolismo do aminoácido triptofano. Porém, em baixas concentrações possui aroma floral, e por isso é utilizado na indústria de perfumes (Lakhdar et al., 2006).

Figura 1 – Estrutura química do *1H*-indol e seus isômeros e a numeração respectiva a posição dos elementos de acordo com a nomenclatura IUPAC.

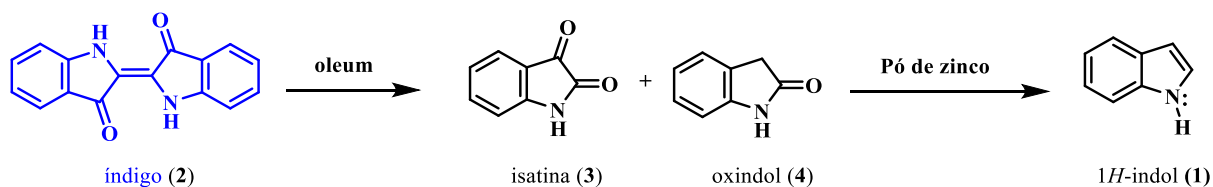


Fonte: o autor (2022).

O primeiro registro da elucidação de um composto indólico data de 1866, quando Baeyer e Knop, no decorrer de um estudo para elucidar a estrutura molecular do corante índigo (**2**), realizou a oxidação do composto índigo com *oleum*, uma mistura de ácido sulfúrico concentrado e SO_3 , forneceu dois produtos, a isatina (**3**) e o oxindol (**4**), que após sofrerem uma redução utilizando pó de zinco produziu como produto da reação o *1H*-indol (Figura 2). Os

autores denominaram este último de “*indigo*”, sendo a junção das palavras *indigo* e *oleum* (Baeyer, 1866).

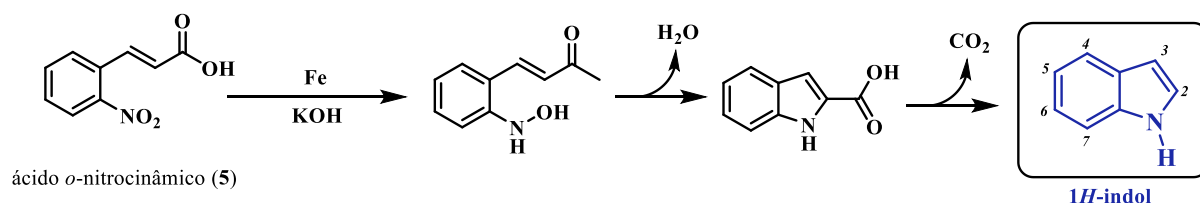
Figura 2 – Esquema reacional representando a reação de oxidação do índigo (2) e posterior redução da isatina (3) e do oxindol (4)



Fonte: o autor (2021).

O trabalho foi continuado por Baeyer e Emmerling, que, visando a síntese do 1H-indol desenvolveram um método utilizando ácido *o*-nitrocinâmico (5), limalha de ferro e hidróxido de sódio. A partir dessa reação, o 1H-indol foi isolado e sua estrutura foi confirmada em 1869 pelos mesmos autores (Figura 3) (Baeyer and Emmerling, 1869; Van Order and Lindwall, 1942).

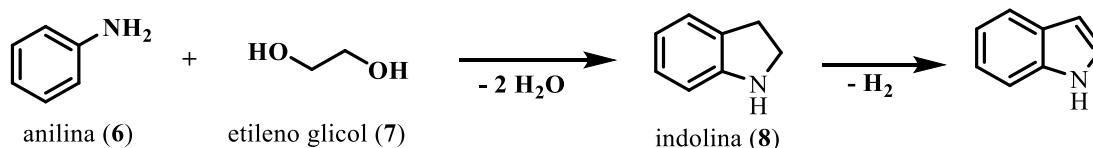
Figura 3 – Reação de obtenção do 1H-indol feita por Bayer e Emmerling



Fonte: adaptado de Van Order e Lindwall (1942).

Atualmente, dentre os processos industriais consolidados o 1H-indol é obtido majoritariamente de duas maneiras: a primeira, a partir do alcatrão de ulha em que está presente em uma concentração de 0,2%, sendo separado da fração de óleo de lavagem por destilação azeotrópica ou fusão alcalina; a segunda, por síntese química, empregando como matéria prima a anilina (6) e o etileno glicol (7). Nesse processo, ocorre inicialmente a condensação da anilina e do etileno glicol levando a formação da indolina (8), o qual é posteriormente reduzida ao 1H-indol. O rendimento global neste processo é reportado com sendo em torno de 70% (Figura 4) (Bartle, 1988).

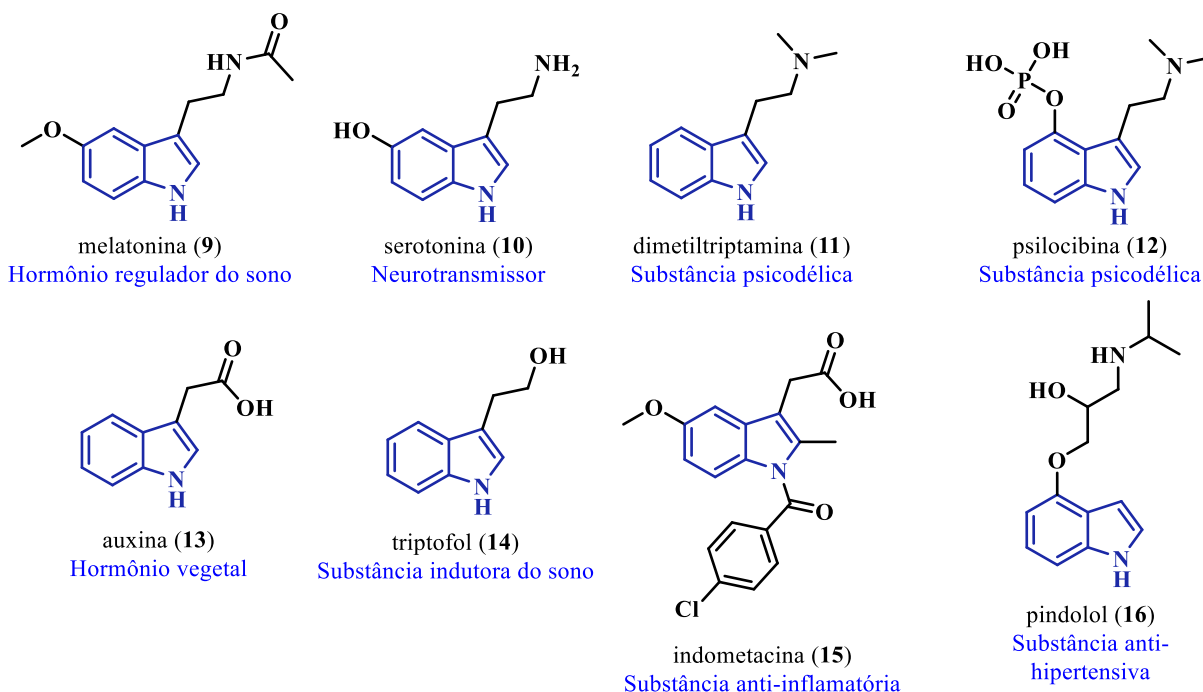
Figura 4 – Síntese industrial do 1*H*-indol a partir da anilina e do etilenoglicol.



Fonte: adaptado de Bartle (1988).

Moléculas com núcleos indólicos são compostos amplamente distribuídos na natureza, sendo que muitas apresentam importante atividades biológicas. Além disso, um vasto número de indóis naturais e sintéticos são aplicados como produtos farmacêuticos e produtos químicos agrícolas. Portanto, a síntese e as transformações de anéis indólicos têm sido objeto de pesquisa por mais de um século e meio (Shiri, 2012). Dentre os compostos indólicos destacam-se os alcalóides triptamínicos, que incluem neurotransmissores de melatonina (9) e serotonina (10), bem como drogas psicodélicas de ocorrência natural como a dimetiltriptamina (11) e a psilocibina (12). Outros compostos indólicos incluem a auxina (13), triptofol (14), indometacina (15) e o betabloqueador pindolol (16) (Figura 5) (Lee and Lee, 2010).

Figura 5 – Compostos indólicos de ocorrência natural

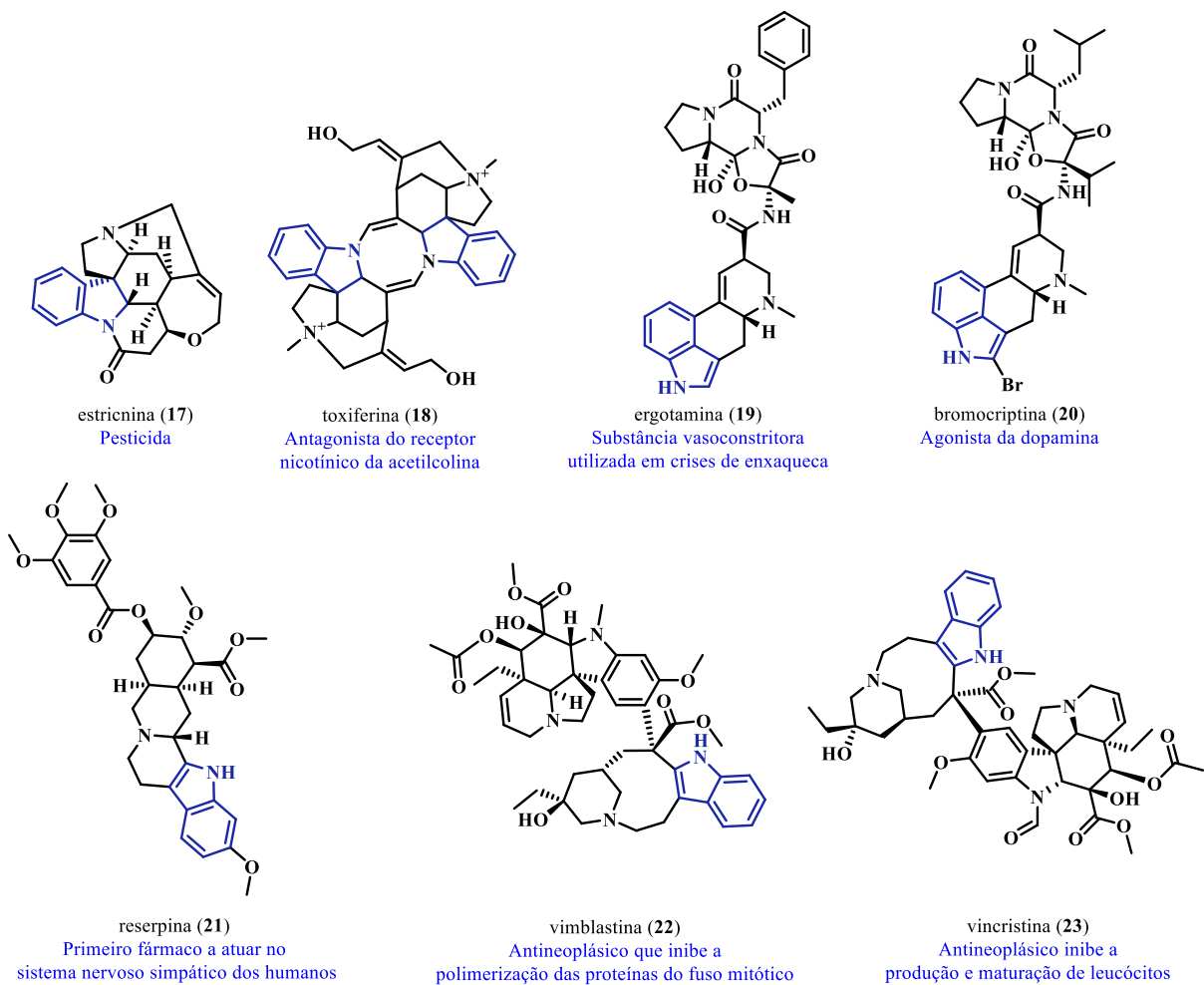


Fonte: o autor (2021).

Outra classe de indóis que se destaca, são os alcalóides indólicos, que além de exercerem atividade farmacológica considerável também possuem outras aplicações, como por exemplo o alcalóide estricnina (**17**) que atua causando contração muscular, enquanto as toxiferinas (**18**) atuam como relaxantes musculares (Figura 6) (Kaushik et al., 2013).

Dos alcalóides indólicos clinicamente úteis, três grupos se destacam: (a) os alcalóides do Ergot: ergotamina (**19**), para o alívio da enxaqueca e o alcalóide modificado bromocriptina (**20**), que suprime a lactação e tem aplicação no tratamento de carcinoma mamário; (b) alcalóides de Rauwolfia: reserpina (**21**), precursora de tranquilizantes; (c) os alcalóides antileucêmicos de *Catharanthus*, vimblastina (**22**) e vincristina (**23**) (Figura 6) (Kaushik et al., 2013).

Figura 6 – Alcaloides indólicos com importante atividade farmacológica

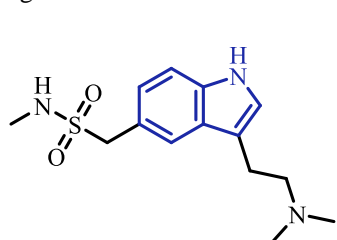


Fonte: o autor (2022)

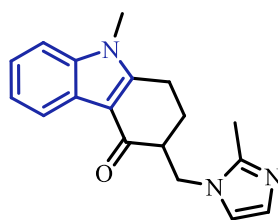
Em animais, a serotonina (**10**), é um importante neurotransmissor nos sistemas nervoso central, cardiovascular e gastrointestinal. A estrutura se assemelha com a melatonina (**9**), o qual é um importante hormônio que atua como mediadora entre o ciclo claro-escuro ambiental e bem como os processos regulatórios fisiológicos (Figura 5) (Scott Chilton et al., 1979).

Estudos e classificações de receptores de serotonina resultaram no *design* e síntese de medicamento altamente seletivos, como o sumatriptano (**24**), para o tratamento de enxaqueca, a ondansetrona (**25**), para a diminuição de náusea e vômitos durante o tratamento de câncer e radioterapia e a alosetrona (**26**), para o tratamento síndrome do intestino irritável (Figura 7) (Freidank-Mueschenborn and Fox, 2005).

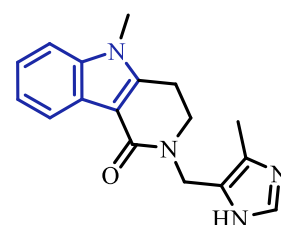
Figura 7 – Estrutura de medicamentos derivados da serotonina



sumatriptano (**24**)
Tremitemex[®] (Pernix Therapeutics)
tratamento de enxaqueca



ondansetrona (**25**)
Zofran[®] (Novartis)
Vonau[®] (Biolab)
redução de náuseas e vômitos

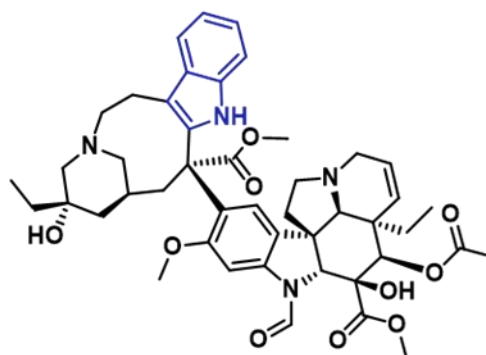


alossetrona (**26**)
Lotronex[®] (Sebela Pharma)
tratamento da síndrome do
intestino irritável

Fonte: o autor (2021).

No passado, as potentes propriedades fisiológicas de compostos de origem natural contendo o núcleo indólico acarretaram os seus usos como medicamentos. Porém, na maioria dos casos foram substituídos por substâncias sintéticas. Dentre os compostos naturais, destaca-se a vincristina (**23**), um alcalóide indólico “dimérico”, que é encontrada em apocináceas, como a *Catharanthus roseus*. A vincristina (**23**) foi reconhecida em 1965 como um inibidor de polimerização de tubulina, sendo um dos primeiros antitumorais a ser utilizado no tratamento da leucemia, e segue sendo utilizado atualmente (Figura 8) (Legha, 1986).

Figura 8 – Fotografia da flor do *Catharanthus roseus* e estrutura química da vincristina.



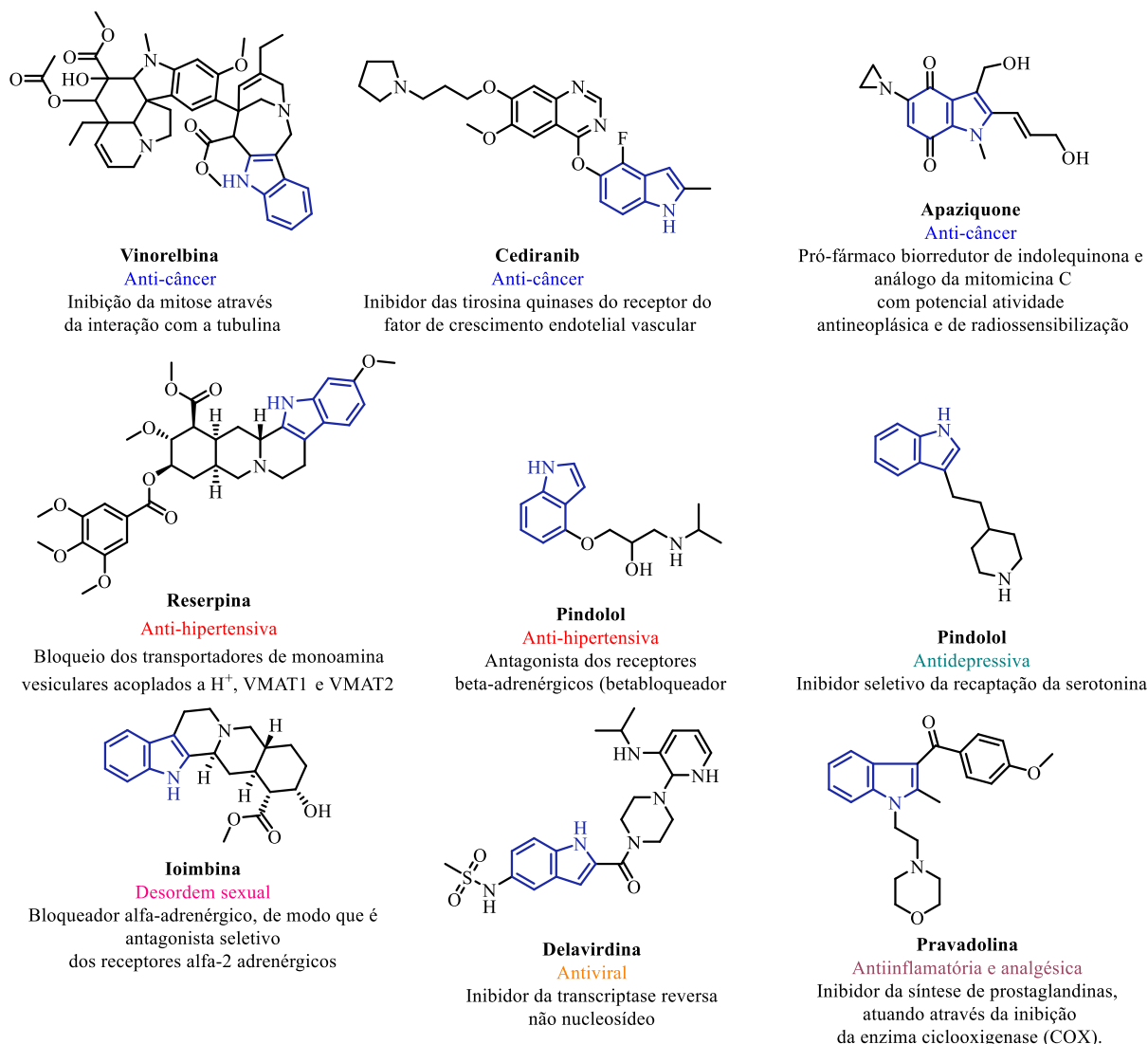
vincristina (23)

Fonte: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Catharanthus_roseus_\(Apocynaceae\).jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Catharanthus_roseus_(Apocynaceae).jpg).

Imagem obtida da base de dados do Wikipedia com livre direito de uso.

Na procura para a síntese de novos medicamentos, os indóis atraem grande atenção devido a sua aplicação terapêutica. A Figura 9 demonstra importantes moléculas contendo o anel indólico em medicamentos já comercializados e sua atividade biológica associada, confirmando a importância desta privilegiada estrutura química.

Figura 9 – Moléculas com núcleo indólico presentes em medicamentos já comercializados, suas atividades biológicas e modo de ação.



Fonte: adaptado de Kaushik *et al.* (2013).

2.2 COMPOSTOS ORGÂNICOS CONTENDO IODO

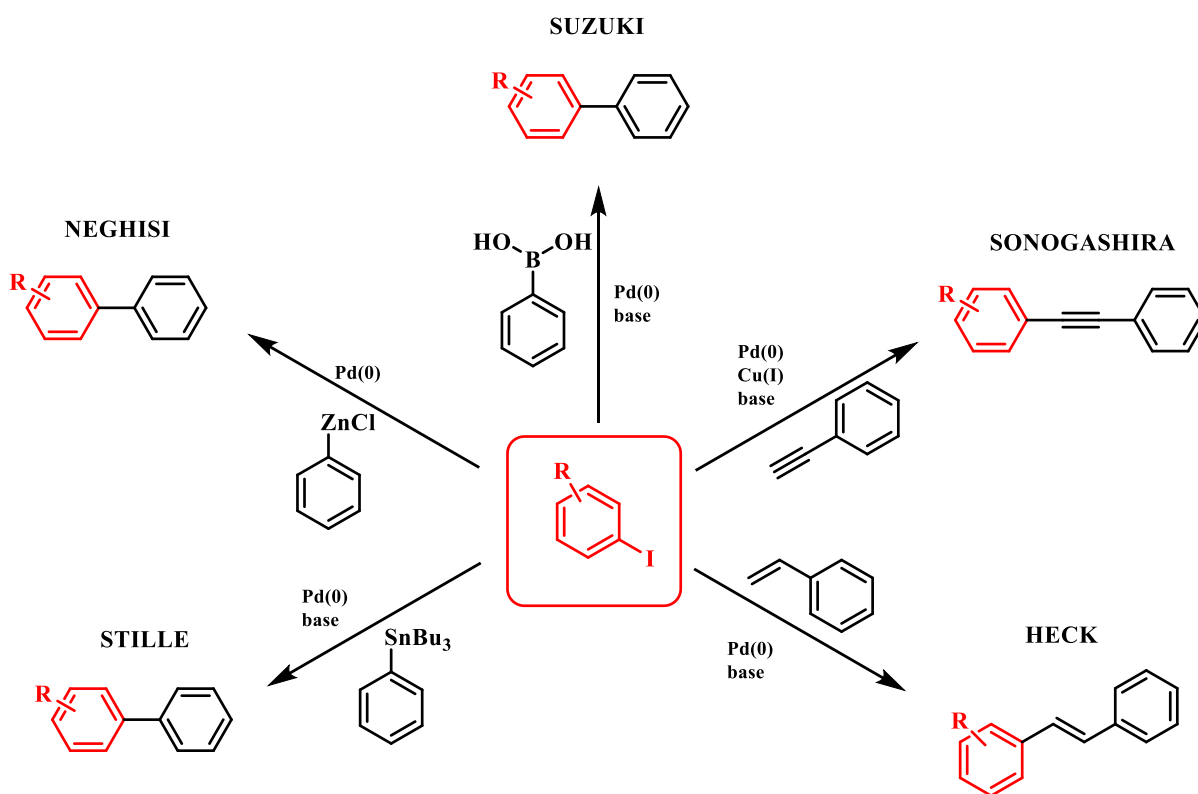
Compostos orgânicos naturais contendo iodo na sua estrutura são raros. O trabalho de revisão publicado em 2014 cita que até aquele momento eram conhecidos 182 moléculas. Em geral, a iodo-funcionalização é possível devido a ação de enzimas oxidativas, que empregam o ânion iodeto presente no solo (Wang *et al.*, 2014).

Na síntese orgânica, a utilização de compostos iodados se dá principalmente como intermediários nas rotas sintéticas e em geral como substratos em reações de acoplamento cruzado que são reações que promovem a formação de ligações carbono-carbono empregando

como substratos um haleto de arila, ou vinila, e um compostos organometálico. Essas reações são catalisadas por sais ou complexos de metais de transição como por exemplo o paládio. Exemplos destas reações são o acoplamento de Heck, acoplamento de Negishi, acoplamento de Suzuki, acoplamento de Sonogashira e acoplamento de Stille (Figura 10) (Maciel et al., 2012).

Considerando o substrato halogenado, compostos contendo iodo são mais interessantes do que os respectivos brometos e cloretos devido a força de ligação. Por exemplo, a ligação carbono(sp^2)-iodo no iodobenzeno possui uma energia de dissociação homolítica (D^0) de 280 kJ mol^{-1} . Já para o bromobenzeno, a ligação $C(sp^2)\text{-Br}$ possui um $D^0 = 346 \text{ kJ mol}^{-1}$. No clorobenzeno, a ligação $C(sp^2)\text{-Cl}$ possui um $D^0 = 407 \text{ kJ mol}^{-1}$. Por fim, a ligação $C(sp^2)\text{-F}$ no fluorbenzeno possui um $D^0 = 533 \text{ kJ mol}^{-1}$. Neste caso, fluoretos de arila nunca são empregados como substratos nestas reações (Sheppard, 2009).

Figura 10 – Exemplos de reações de acoplamento cruzado a partir de iodeto de arila.



Fonte: Adaptado de Maciel, Raminelli e Pizzuti (2012).

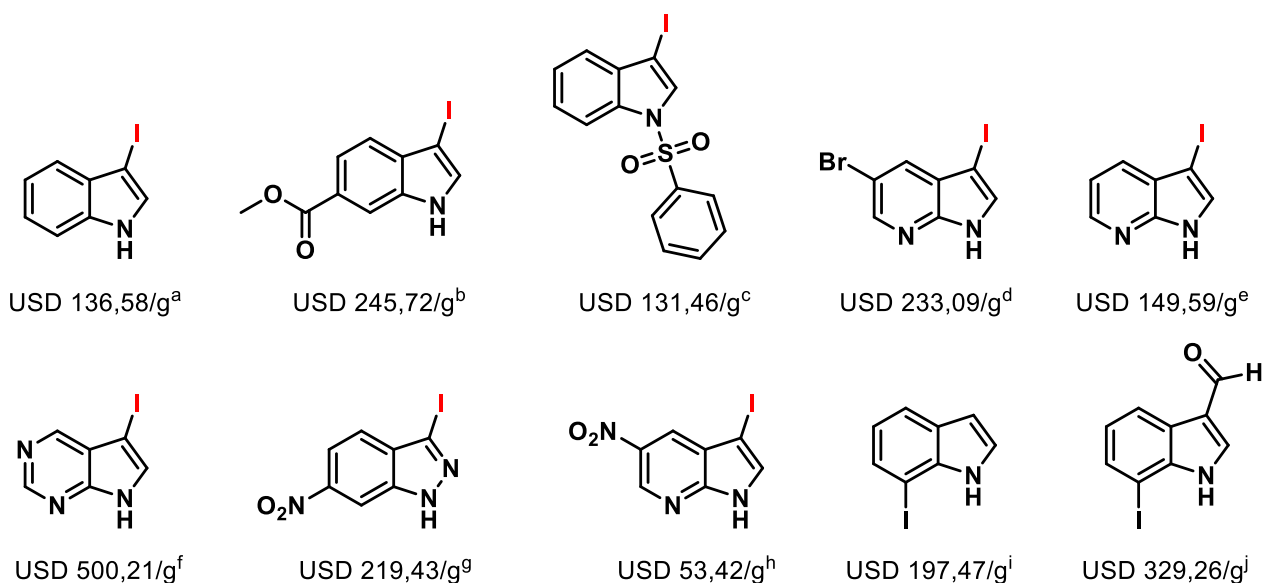
2.2.1 Compostos indólicos iodo-funcionalizados na posição C3

O anel indólico é considerado por vários autores como uma estrutura privilegiada devido a relevante participação do anel indólico na estrutura de compostos naturais e bioativos. Assim,

é natural que o núcleo indólico seja empregado com frequência na estrutura de moléculas que serão posteriormente avaliadas para algum efeito biológico (Shiri, 2012).

Como mencionado, a funcionalização do indol com iodo permite a formação de uma nova ligação carbono-carbono a partir de reações de acoplamento cruzado e, portanto, indóis iodo-funcionalizados são moléculas interessantes. Fato esse que é observado pela disponibilidade destes compostos por diferentes fontes comerciais. Na Figura 11 são apresentados exemplos de indóis iodo-funcionalizados disponíveis comercialmente.

Figura 11 – Valores de indóis iodo-funcionalizados disponíveis comercialmente



^a Apollo Scientific, valor informado considerado a quantidade de 5 g (£ 560,00). ^b Fischer Scientific, valor obtido considerando a quantidade de 0,5 g (€ 58,80). ^c Fischer Scientific, valor obtido considerando a quantidade de 1 g (€ 125,84). ^d Merck do Brasil, valor obtido considerando a quantidade de 1 g (R\$ 1178,00). ^e Merck do Brasil, valor obtido considerando a quantidade 1 g (R\$ 756,00). ^f Merck do Brasil, valor obtido considerando a quantidade 1 g (R\$ 2528,00). ^g Merck do Brasil, valor obtido considerando a quantidade 1 g (R\$ 1109,00). ^h Merck do Brasil, valor obtido considerando a quantidade 1 g (R\$ 270,00). ⁱ Merck do Brasil, valor obtido considerando a quantidade 1 g (R\$ 998,00). ^j Merck do Brasil, valor obtido considerando a quantidade de 0,5 g (R\$ 832,00).

Valores obtidos dos sites: <https://store.apolloscientific.co.uk/>, <https://www.fishersci.fi/> e <https://www.sigmaaldrich.com/>, no dia 27 de maio de 2022.

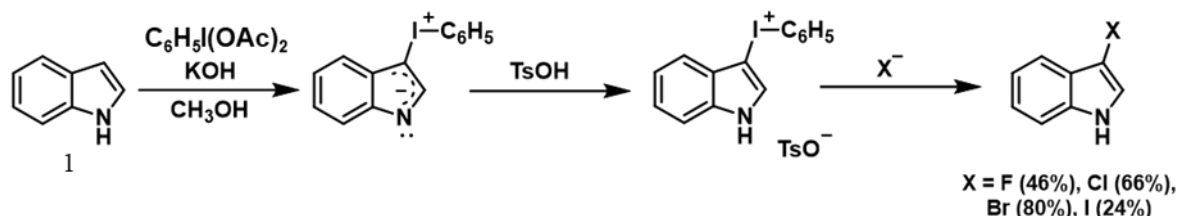
Cotação do dólar: USD 1,00 equivalente a R\$ 5,05.

Focando nas metodologias de obtenção do 3-iodo-1*H*-indol, desde meados do século de 20 estratégias para a halogenação do 1*H*-indol foram desenvolvidas, particularmente na posição C3-H, que se demonstra o local mais reativo do anel indol (Sun et al., 2018).

Ermolenko, Budylin e Knost reportaram em 1978 um dos primeiros trabalhos para a obtenção do 3-iodo-1*H*-indol a partir da reação de substituição eletrofílica envolvendo sais de (3-indolil)feniliodônio. O produto foi obtido com um rendimento de 59% e uma baixa

seletividade, uma vez que o produto da iodação na posição C2 também foi observado (Ermolenko et al., 1978).

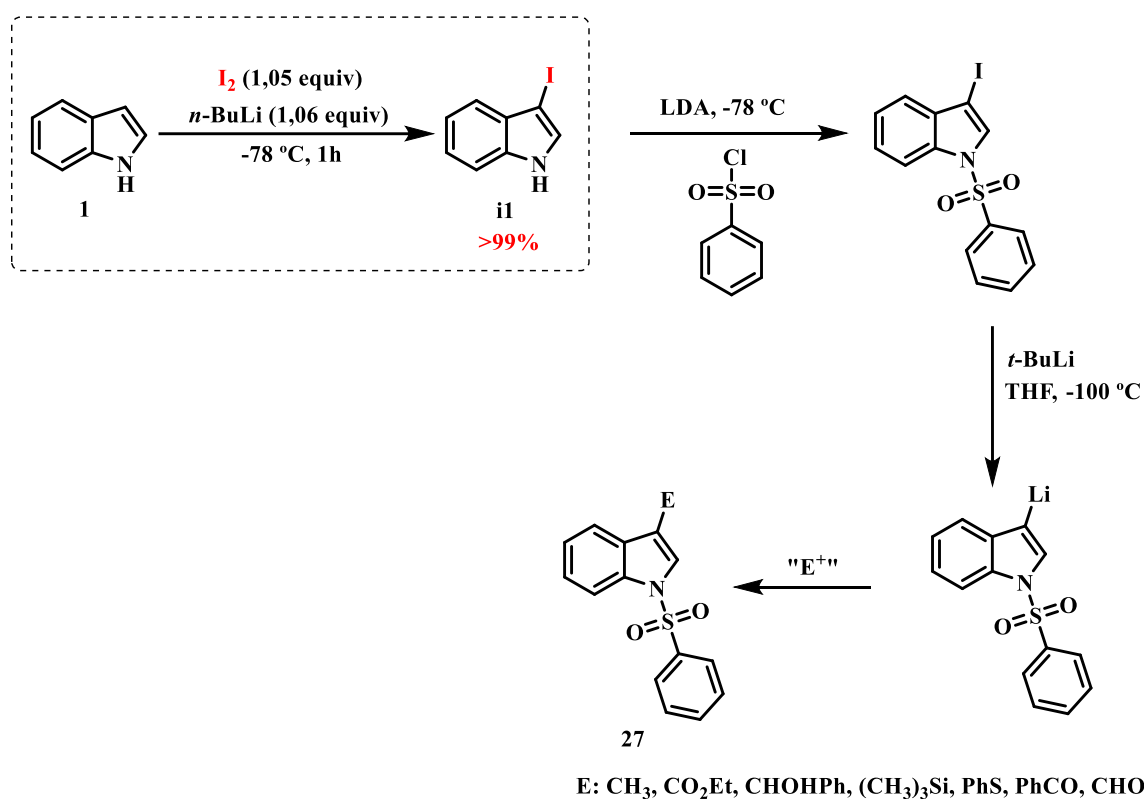
Figura 12 – Síntese do 3-iodo-1*H*-indol proposta por Ermolenko, Budylin e Knost



Fonte: Ermolenko, Dubylin e Knost (1978).

Cinco anos mais tarde, em 1982, Saulnier e Gribble empregaram como metodologia o uso da base *n*-butil lítio e iodo molecular, empregando THF como solvente e sob atmosfera inerte e temperatura de $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, para obter o 3-iodo-1*H*-indol com um rendimento de $>99\%$. O nitrogênio indólico no 3-iodo-1*H*-indol foi posteriormente protegido com o grupo benzenossulfonila, grupo retirador de elétrons, para posterior funcionalização da molécula com lítio no lugar do iodo, e por fim, inseriram grupos eletrofílicos na mesma posição, **27** (Figura 13) (Saulnier and Gribble, 1982).

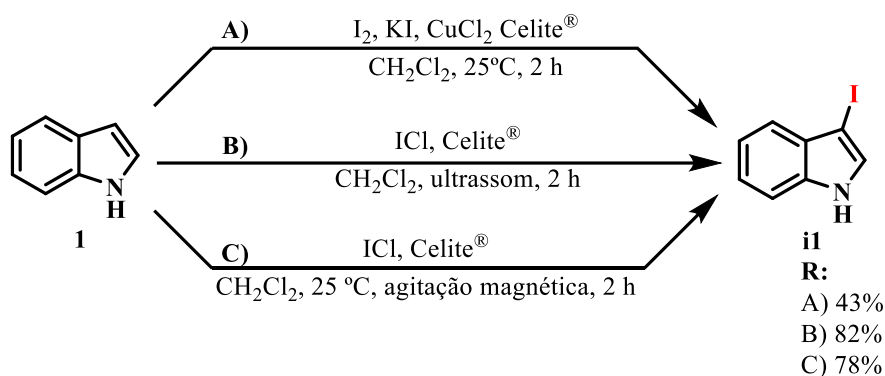
Figura 13 – Síntese de compostos indólicos com a posição C3 substituída



Fonte: adaptado de Saulnier e Gribble (1982).

Com o intuito de desenvolver metodologias mais brandas para a síntese de iodoindóis, novas metodologias passaram a ser investigadas. Um exemplo é a reportada por Hamri et al., 2012, os autores reportaram duas metodologias, em que na primeira a fonte de iodo é I_2 e KI (Figura 14A), sendo a formação da ligação C-I promovida por $CuCl_2$ suportada em Celite. A partir desta metodologia foi observado que a reação não apresentou um bom rendimento (43%). Quando foi utilizado o monocloreto de iodo (ICl) como fonte de iodo, a iodo-funcionalização teve um aumento de rendimento para 78%. Também foi reportado um acréscimo no rendimento (82%) quando a reação foi promovida por ultrassom (Figura 14B), quando comparada a agitação magnética (78%) (Figura 14C).

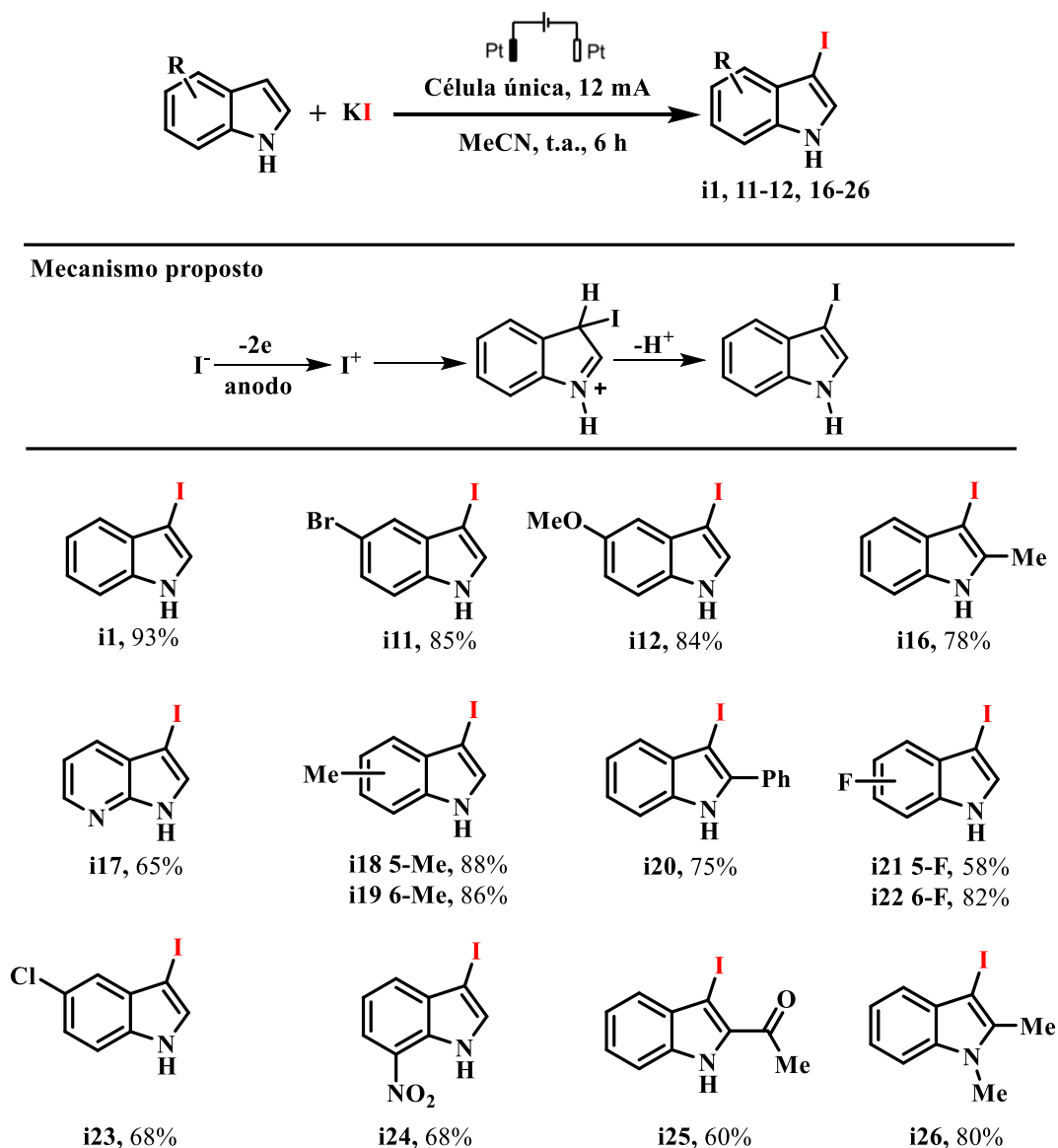
Figura 14 – Iodo-funcionalização do 1*H*-indol proposta por Hami *et al.* (2012)



Fonte: adaptado de Hami *et al.* (2013).

Mais recentemente, a eletroquímica foi empregada como estratégia para a obtenção do 3-iodo-1*H*-indol e derivados (**i1**, **i11-12**, **i16-26**, Figura 15) (Sun et al., 2018). Os autores utilizaram iodeto de potássio, como fonte de iodo, em acetonitrila, obtendo conversão de 93% para o 3-iodo-1*H*-indol e rendimentos variando de 58% a 88% para os derivados. O mecanismo proposto para a reação é iniciado pela oxidação anódica do ânion iodo, levando a formação do iodônio pela perda de dois elétrons. Em seguida, a dupla ligação ataca o íon iodônio capturando-o na posição C3 para formar o cátion intermediário, que, por sua vez, libera um próton para a obtenção do produto desejado, 3-iodo-1*H*-indol.

Figura 15 – Iodo funcionalização de compostos indólicos utilizando eletroquímica



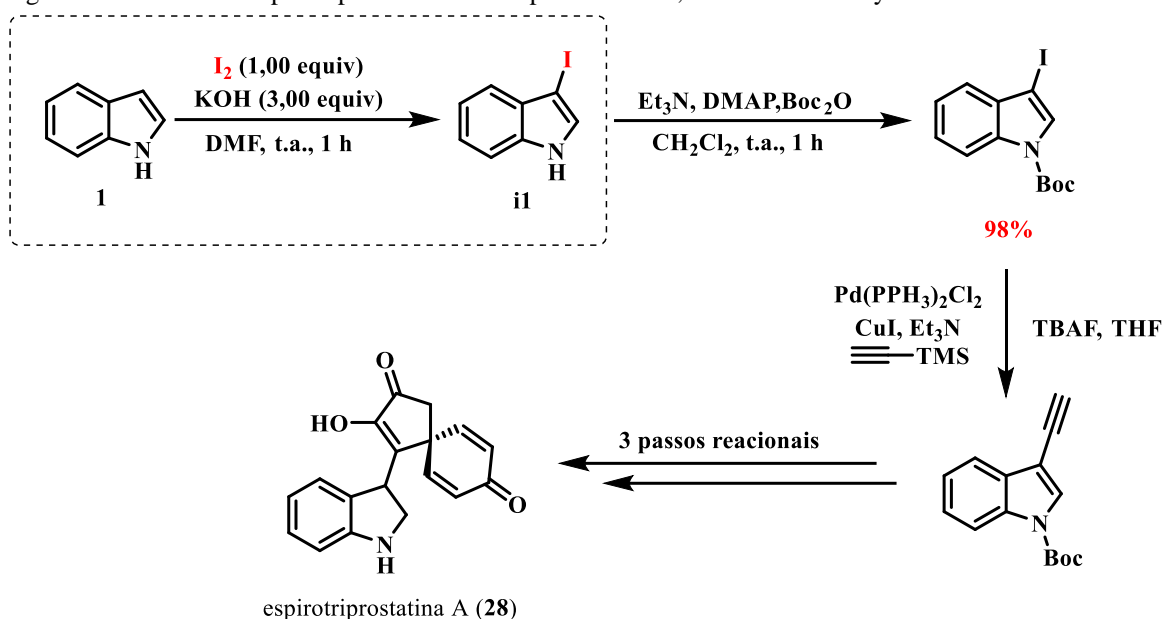
Fonte: adaptado de Sun *et al.* (2018).

A aplicação do 3-iodo-1*H*-indol como intermediário sintético é exemplificada no trabalho de Unsworth, Cuthbertson e Taylor (2013) com a síntese do alcaloide indólico espirotriptostatina A (**28**). Esse alcaloide foi isolado dos fungos *Aspergillus fumigatus* e possui atividade antimitótica e, portanto, a avaliação da sua ação anticâncer é de grande interesse.

Na publicação em questão, o 3-iodo-1*H*-indol não é isolado, o produto é diretamente submetido a reação de proteção do nitrogênio indólico com Boc_2O , obtendo-se um rendimento de 98%. Para a síntese do 3-iodo-1*H*-indol, os autores empregaram uma metodologia utilizando um equivalente de iodo molecular e 3 equivalentes de hidróxido de potássio. A reação foi realizada no solvente DMF, em temperatura ambiente durante 1 h. O alcaloide indólico **28** foi

obtido após 4 passos reacionais (Figura 16) (Unsworth et al., 2013).

Figura 16 – Síntese da espirotriptostatina A feita por Unsworth, Cuthbertson e Taylor



Fonte: adaptado de Unsworth, Cuthbertson e Taylor (2013).

2.3 BIOCATALÍSE E ENZIMAS

A biocatálise se desenvolveu nas últimas duas décadas em uma tecnologia bastante madura e amplamente utilizada. No início dos anos 2000, manteve-se como uma técnica focada em aplicações síntese ou resolução de compostos opticamente ativos (Wu et al., 2021).

Atualmente, a biocatálise evoluiu para uma ferramenta amplamente aplicável em síntese química e fabricação, dentre eles fornecer reagentes e condições não naturais e biocatalisadores em evolução permitindo uma infinidade de opções para criar novas transformações e, assim, abrir novos e curtos caminhos para as moléculas alvo desejadas, desenvolvimento de inteligência artificial, automação e tecnologia de alto rendimento oferecendo infinitas possibilidades para a descoberta de novas enzimas e mecanismos enzimáticos (Bell et al., 2021).

As enzimas, por sua vez, são macromoléculas que evoluíram durante 3,5 bilhões de anos para catalisar a maioria das reações químicas centrais para a vida, atuando como catalisadores altamente eficazes e acelerando reações com alta especificidade. A sua evolução ocorreu não somente para serem ótimos catalisadores, mas também para atender requisitos evolutivos do organismo em que residem, bem como as condições ambientais que esses organismos se encontram (Arcus and Mulholland, 2020).

Por definição, as enzimas são catalisadores biológicos que operam em condições de pH,

temperatura e pressões específicas, proporcionando reações com alta quimio, régio e estereosseletividade (Hall and Bommarium, 2011).

Segundo a União Internacional de Bioquímica e Biológica Molecular (IUBMB) as enzimas são classificadas em seis grupos (ou classes), sendo eles (Tipton and McDonald, 2018):

1 - Óxido-redutases: Enzimas que catalisam reações de oxido-redução, as quais são classificadas em 22 sub-classes devido aos grupos doadores e aceptores. No caso das lacases, uma acceptora de O₂, são chamadas de oxidases.

2 - Transferases: Enzimas que catalisam a transferência de grupos entre duas moléculas

3 - Hidrolases: Enzimas que catalisam a reação de hidrólise de ligações covalentes.

4 - Liases: Enzimas que catalisam a quebra de ligações químicas por meios que não envolvem hidrólise. A oxidação, geralmente forma uma nova ligação dupla ou uma nova estrutura de anel. A reação reversa também é possível (adição de Michael), sendo assim chamadas de sintases.

5 - Isomerasas: Enzimas que catalisam reações envolvendo um rearranjo estrutural de uma molécula, como racemização e epimerização.

6 - Ligases: Enzimas que catalisam reações envolvendo a conservação de energia química, formando a ligação de duas moléculas produzindo uma nova molécula.

As enzimas também possuem um número de classificação, denominado de “E.C.” (*Enzyme Commission of the IUBMB*), o qual é composto por 4 dígitos (E.C. a,b,c,d) (Monti et al., 2011). Se tratando das lacases, alvo de estudo desse trabalho, a classificação se dá por:

a – Classe da enzima: Número “1”, indicando uma óxido-redutase;

b – Grupo funcional que é oxidado ou reduzido: Número “10”, pelo fato do fenol ser um substrato natural de lacases;

c – Tipo de acceptor de elétrons: Número “3”, por utilizar oxigênio molecular;

d – Determina a enzima dentro do subgrupo c: Número “2”, segunda enzima dentro do subgrupo de enzimas que oxidam fenol e tem oxigênio molecular como acceptor. Sendo assim o número de classificação de lacases é E.C.1.10.3.2.

2.3.1 Lacases

As lacases (EC 1.10.3.2 – benzenodiol:oxigênio oxidoreductase) são constituídas de uma estrutura glicoproteica monomérica e com massas molares que variam entre 50 à 130 kDa. A porção formada de carboidratos tem a função de contribuir para a estabilidade destas enzimas.

São enzimas pertencente ao grupo das azul multi-cobre oxidases, que têm a capacidade de catalisar a oxidação de diversos substratos (Witayakran and Ragauskas, 2009).

A descoberta das lacases se deu inicialmente na seiva da árvore japonesa *Rhus vernicifera* (Yoshida, 1883). A partir de então, tem sido encontradas em variados fungos, em sua maioria com a função para promoverem o apodrecimento de madeira e plantas (Bao et al., 1993; Sato et al., 2001). Também foram encontradas as enzimas lacases em bactérias, com funções na morfogênese, na proteção ao esporo frente à luz UV e na homeostase de cobre (Dittmer et al., 2004).

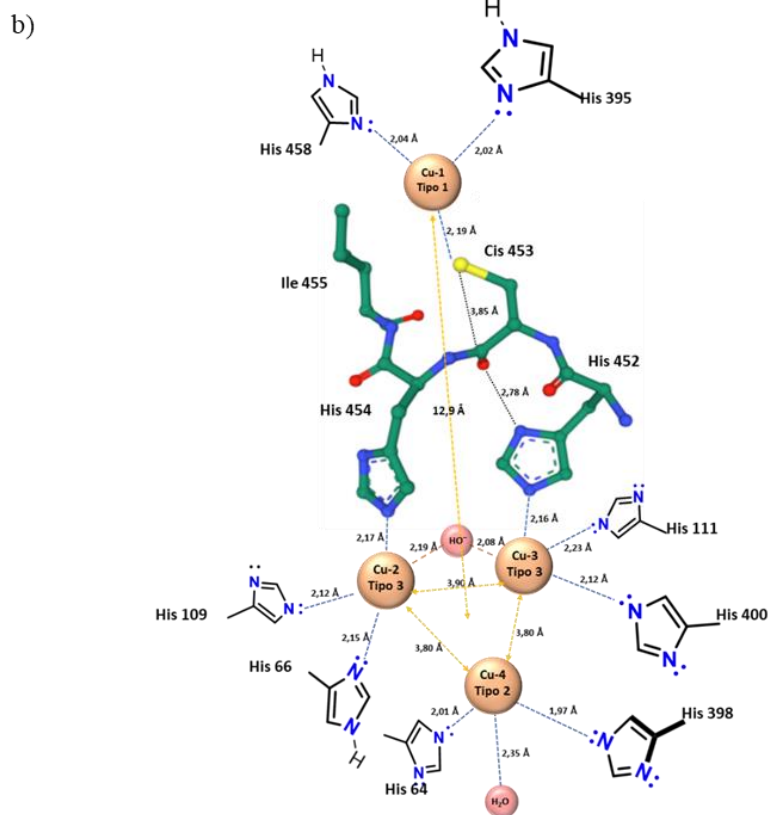
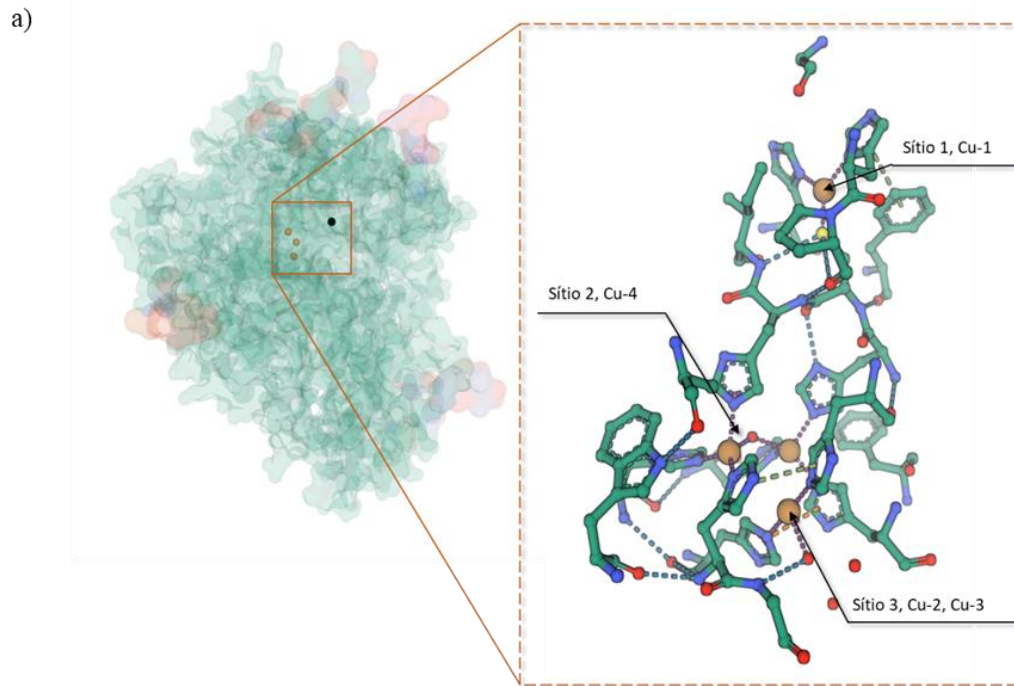
As lacases incorporam quatro átomos de cobre distribuídos em três sítios-redox, os quais são denominados sítios (ou tipos) T1, T2 e T3. O cobre do sítio 1 (Cu-1) é cercado por uma molécula de cisteína e duas histidinas como ligantes, a quarta posição pode ser variável, sendo algumas vezes a metionina. A coloração azul da enzima, com absorção de banda a 614 nm, é devido à ligação covalente do cobre com a cisteína, sendo esse o sítio responsável pela oxidação do substrato. Após a oxidação no sítio T1, os elétrons disponíveis são enviados para os sítios T2 e T3, onde o oxigênio molecular é reduzido à água (Baldrian, 2006; Christopher et al., 2014; Strong and Claus, 2011).

O cobre do sítio 2 (Cu-4), coordenado por duas histidinas e uma molécula de água, é um sítio em ressonâncias de elétrons paramagnéticos. Por possuir propriedades paramagnéticas, também é caracterizado pela sua fraca absorção no espectro visível. Os cobres do sítio 3 (Cu-3 e Cu-2), ligados a três histidinas, com absorção de banda UV em 330 nm fazem parte do centro binuclear da enzima, que, diferente do Cu-4, não existe ressonância magnética devido à junção antiferromagnética dos dois íons de cobre, mediada pelo grupo hidroxila (Baldrian, 2006; Christopher et al., 2014; Strong and Claus, 2011).

A lacase de *T. versicolor* foi representada por sua estrutura cristalina pela primeira vez por Piontek e colaboradores (2002), depositada no banco de dados de proteínas e codificada como 1GYC (10.2210/pdb1GYC/pdb).

Diferente da maioria das proteínas de cobre azul, o cobre tipo 1 na lacase de *T. versicolor* não possui ligante axial e é coordenado três vezes (Figura 17).

Figura 17 – Representação da estrutura cristalina da lacase de *T. versicolor* extraída do Protein Data Bank (a) e representação dos seus sítios de cobre.

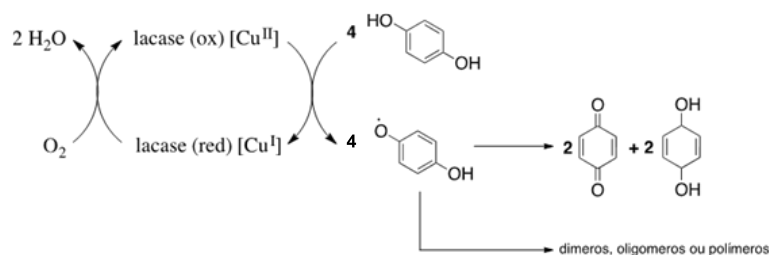


Fonte: <https://www.rcsb.org/structure/1gyc>

As lacases se destacam frente as outras enzimas quando o quesito é variedade de substratos, além de ter o oxigênio molecular como acceptor final de elétrons, produzindo

somente água como subproduto da reação (Claus, 2004). O ciclo catalítico (Figura 18) é finalizado com a redução de uma molécula de oxigênio produzindo duas moléculas de água, bem como a oxidação de quatro moléculas do substrato, resultando em quatro íons radicalares (Riva, 2006).

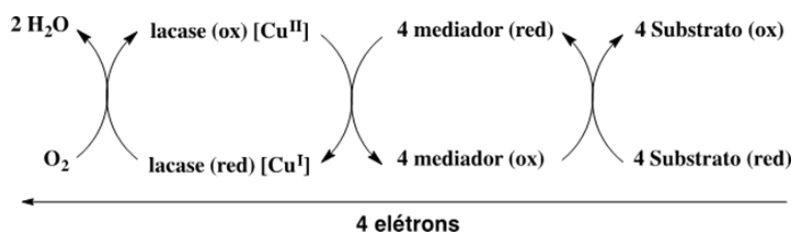
Figura 18 – Representação simplificada do mecanismo de oxidação da hidroquinona por uma lacase com a conversão do oxigênio em água.



Fonte: Adaptado de Witayakrana e Ragauskas, 2009.

Nas reações em que o substrato a ser oxidado tem um potencial redox superior ao da lacase ou o substrato é muito volumoso, é necessária a presença de um mediador químico de baixa massa molecular para facilitar as reações oxidativas. Assim, esse mediador reage primeiramente com a lacase, formando um reagente oxidativo intermediário que em seguida oxida o substrato alvo, como demonstrado na Figura 199. Essa técnica é chamada de sistema LMS (*Laccase Mediator System*) (Witayakran and Ragauskas, 2009).

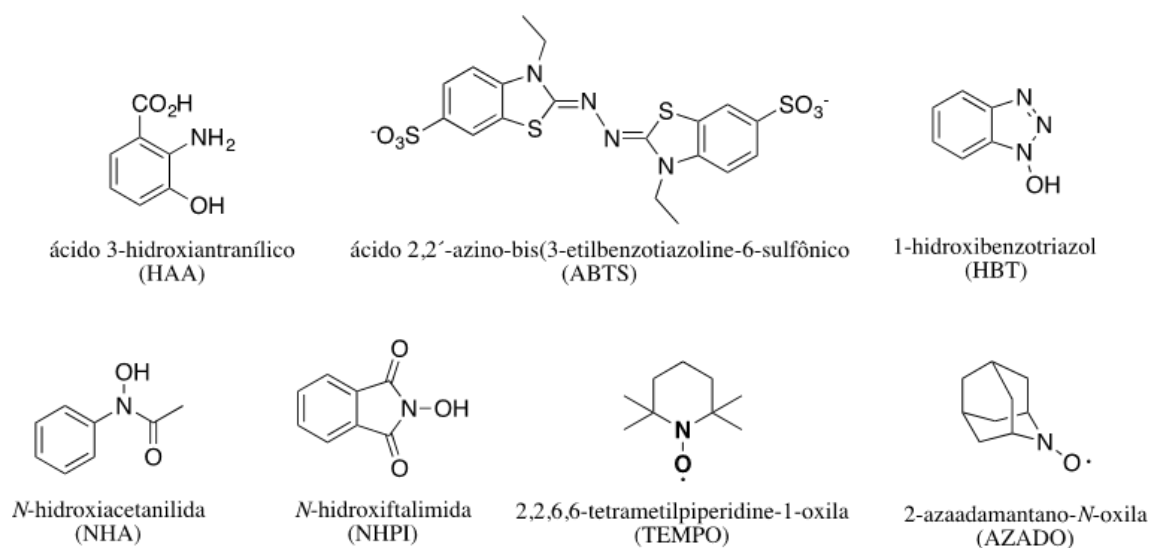
Figura 19 – Mecanismo catalítico do sistema lacase-mediador



Fonte: Adaptado de Witayakrana e Ragauskas, 2009.

Variados compostos mediadores foram descritos até hoje, sendo o sal de amônio do ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazoline-6-sulfônico) (ABTS) o mais empregado e frequentemente utilizado como substrato na medida da atividade enzimática as lacases (Branchi et al., 2005). Outros mediadores também podem ser empregados em reações orgânicas, conforme demonstrado na Figura 20, tendo assim, uma ampla gama de possibilidades em reações orgânicas envolvendo lacases.

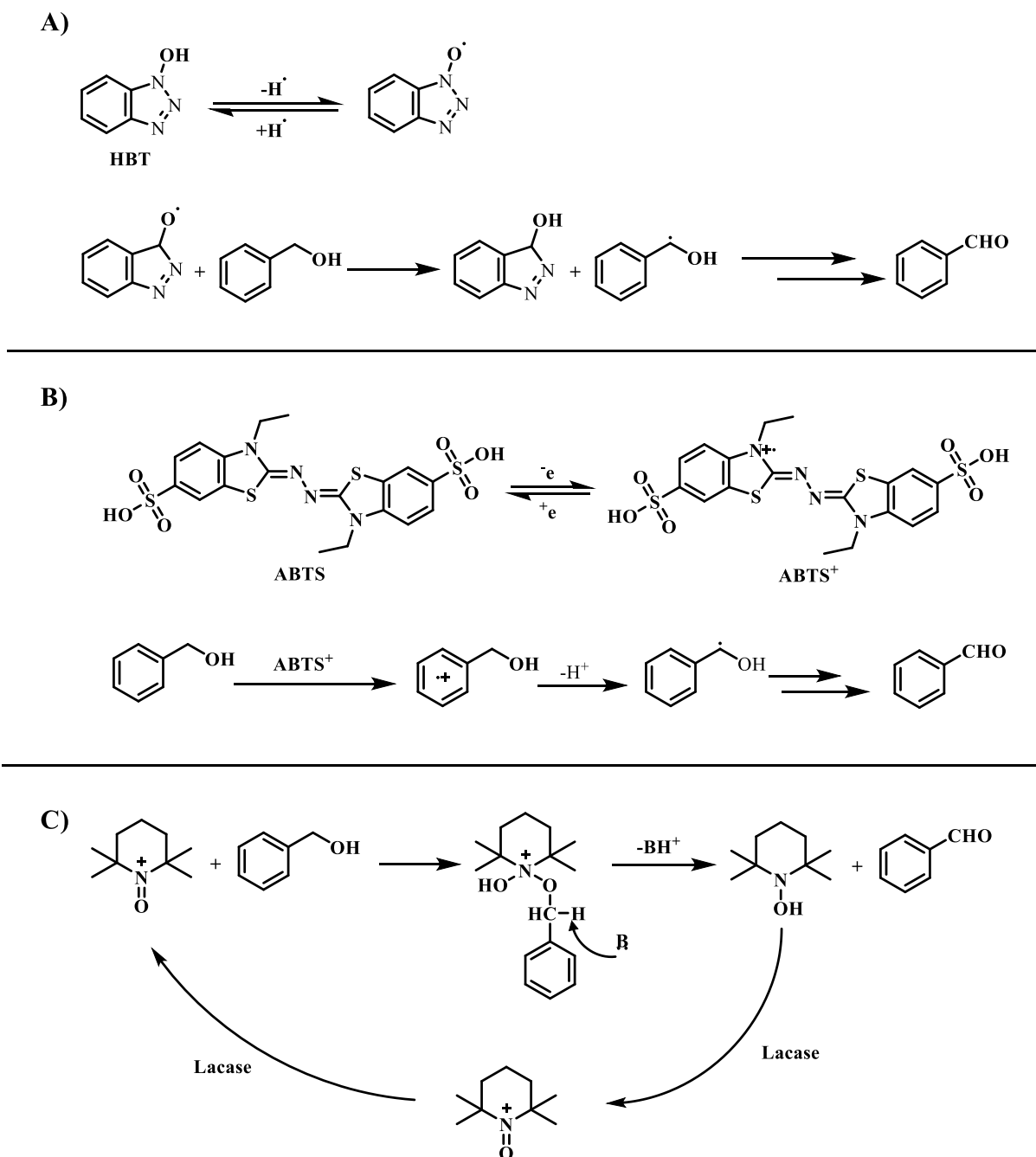
Figura 20 – Exemplos dos mediadores-redox utilizados com frequência em reações mediadas por lacases.



Fonte: Adaptado de Witayakrana e Ragauskas, 2009.

O mecanismo para a oxidação do substrato pode ocorrer por três maneiras, a depender do mediador que será utilizado, sendo elas: transferência de átomo de hidrogênio (HAT), transferência de elétron (ET) ou oxidação iônica. Mediadores que possuem em sua estrutura o grupamento *N*-hidroxila (*N*-OH), como por exemplo o HBT, reagem via o mecanismo HAT (Figura 21A). Já o ABTS, por sua vez, atua em um mecanismo do tipo ET (Figura 21B). Por fim, os mediadores contendo o grupo *N*-oxila (*N*-O[•]), como por exemplo o TEMPO, reagem via o mecanismo de transferência de elétron (Figura 21C) (Zampieri, 2013).

Figura 21 – Representação reacional da oxidação mediador-substrato pelas rotas: A) transferência de átomo de hidrogênio (HAT), B) transferência de elétron (ET) e C) Oxidação iônica.



Fonte: adaptado de Zampieri, 2013.

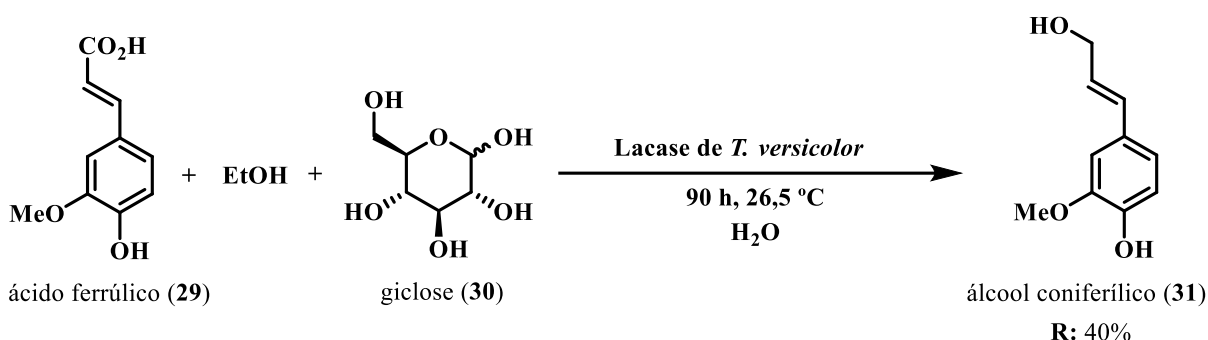
2.4 APLICAÇÕES DAS LACASES EM SÍNTESE ORGÂNICA

Devido a sua atividade oxidativa, as lacases são amplamente utilizadas em diversas aplicações industriais, incluindo modificação de polímeros, branqueamento têxtil, processamento de alimentos, síntese orgânica, indústria cosmética e transformação e

biorremediação de uma infinidade de compostos xenobióticos incluindo hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, pesticidas, corantes sintéticos e produtos farmacêuticos. Devido a extensa aplicação e utilização dessas enzimas, elas podem ser consideradas um dos biocatalisadores mais importantes e com aplicações industriais divergentes, como o potencial de polimerizar e despolimerizar (Bilal et al., 2019).

Um dos primeiros relatos do uso de lacases para fins de transformação química, buscando assim por compostos de interesse comercial, foi a decomposição oxidativa da lignina com o emprego de micélios do fungo *T. versicolor*, o qual é um conhecido fungo causador da podridão branca da madeira (Nishida and Fukuzumi, 1978). Neste estudo os autores empregaram o ácido ferúlico (**29**) como um substrato modelo para as reações enzimáticas em um meio contendo glicose (**30**) e etanol, sob condições aeróbicas. Como resultado da redução obteve-se álcool coniferílico (**31**) como principal produto e com um rendimento de 40%.

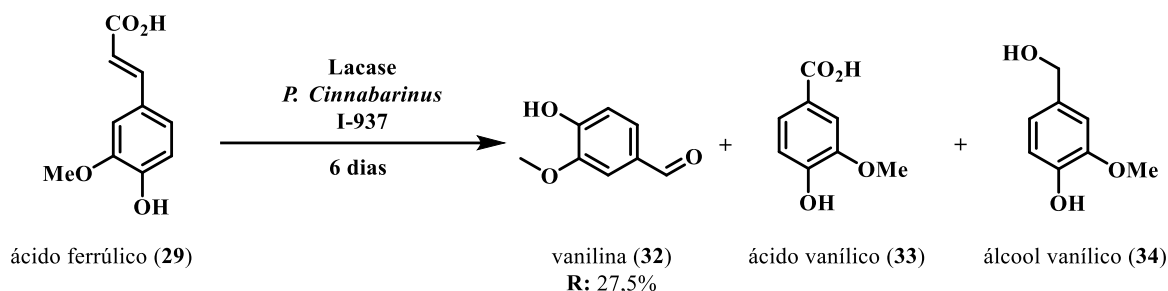
Figura 22 – Reação de oxidação do ácido ferúlico em meio contendo glicose e etanol em condições aeróbicas



Fonte: adaptado de Nishida e Fukuzumi (1978).

Em outro estudo envolvendo a decomposição oxidativa do ácido ferúlico (**29**), agora utilizando o fungo *Pycnoporus cinnabarinus* I-937, o qual também é um conhecido fungo da podridão branca, possibilitou a formação da vanilina (**32**) como o produto majoritário, com um rendimento de 27,5%. Também foram obtidos como coprodutos da decomposição oxidativa o ácido vanílico (**33**) e o álcool vanílico (**34**) (Figura 23)(Falconnier et al., 1994).

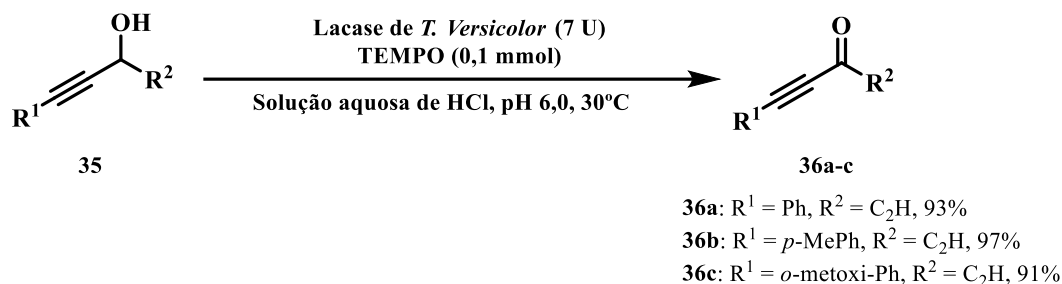
Figura 23 – Biotransformação do ácido ferúlico utilizando lacase



Fonte: adaptado de Falconnier *et al* (1978).

Também fora relatado a obtenção de inonas (**35**), conhecidas por serem blocos de construção da indústria química, através da oxidação aeróbia de álcoois propargílicos (**36**) em meio aquoso catalisada por lacase/TEMPO com rendimentos superiores a 90% (Silva *et al.*, 2020).

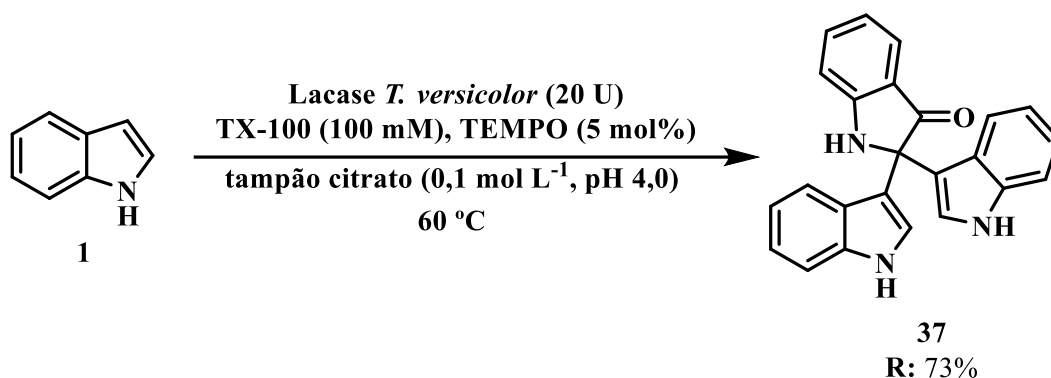
Figura 24 – Obtenção de inonas utilizando o sistema mediador lacase/TEMPO.



Fonte: adaptado de Silva *et al.* (2020).

Para as reações de despolimerização de ligninas foi empregada a lacase de *T. versicolor* e os três tipos mais abundantes de lignina (lignina organossolv insolúvel em água, lignina Kraft e lignossulfonato de sódio solúvel em água). Obteve-se uma mistura de quatro compostos com uma faixa de pesos moleculares entre 1500 e 550 Da, como metodologia empregou-se o sistema LMS, sendo ABTS o mediador empregado e cossolvente (25% de 1,4-dioxano) para o aumento da solubilidade das ligninas (Dillies *et al.*, 2020).

Foi descrita também a trimerização biocatalítica do 1*H*-indol por Azimi e colaboradores (2016) utilizando a lacase de *T. versicolor* com a formação de um centro quaternário. A partir da reação, utilizando TEMPO como mediador redox, surfactante TX-100, tampão citrato pH 4,0 a 60 °C, foi possível obter um rendimento de 73% para o produto trimerizado 2,2-bis(3-indolil)-indoxila (**37**).

Figura 25 – Trimerização biocatalítica do 1*H*-indol.

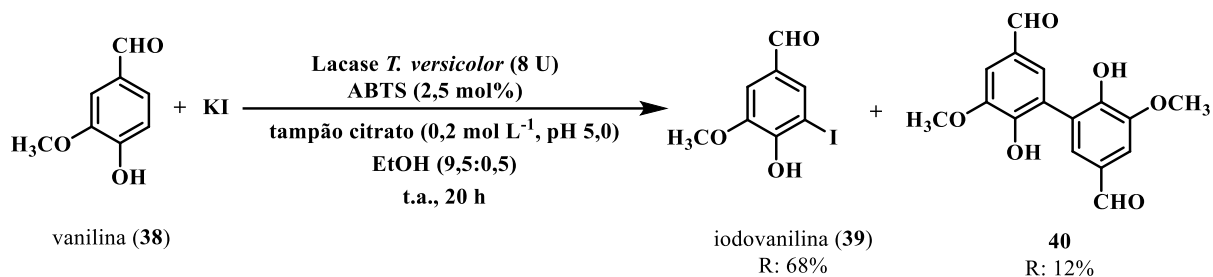
Fonte: Azimi *et al.* (2016).

O primeiro relato da capacidade de lacases serem capazes de oxidarem iodetos foi feito por Xu em 1996, que, ao utilizar a lacase de *Myceliophthora thermophila* em soluções aeradas catalisou a oxidação do iodeto a iodo e a concomitante redução de dioxigênio a água em pH 3,4. A catálise foi intensificada quando utilizado o mediador ABTS.

Em 2013, Seki e colaboradores em 2013 avaliaram a sorção de iodeto e a atividade da lacase em 2 tipos de solo japonês para avaliar o possível envolvimento desta enzima na sorção de iodeto. O estudo demonstrou que a lacase microbiana está envolvida na sorção de iodeto em solo através da oxidação do iodeto, visto que o experimento de sorção em lote usando traçador de iodeto radioativo (¹²⁵I⁻) demonstrou que a sorção foi significativamente inibida por autoclavagem (121 °C, 40 min), tratamento térmico (80 e 100 °C, 10 min), irradiação γ (30 kGy), lavagem com gás N₂ e adição de agentes redutores e inibidores gerais de lacase.

Foi investigado por Ihssen e colaboradores em 2014 se compostos fenólicos como a vanilina (**38**), que se assemelham a subestruturas da lignina de madeira macia, poderiam ser iodados diretamente pela reação com lacase e iodeto, resultando em compostos com atividade antifúngica. Por meio de análise de HPLC-MS foi demonstrado que a vanilina foi convertida em iodovanilina por catálise de lacase em excesso de iodeto de potássio, e, com a adição de mediadores redox em concentrações catalíticas foi aumentada em dez vezes a taxa de oxidação de iodeto e o rendimento de iodovanilina obtido foi de 68% (**39**), porém, também foi relatada a formação do dímero da vanilina (12%, **40**) (Figura 26). Além disso, produtos fenólicos iodados foram detectados quando *o*-vanilina, etil vanilina, acetovanilona e metil-baunilha foram incubados com lacase e iodeto. Por fim, foi testada a atividade fungicida da iodovanilina e da iodo-etil vanilina, para a *T. versicolor*, foi observada inibição quase completa do crescimento e efeito biocida parcial em placas de ágar. Testes enzimáticos indicaram que os compostos iodados atuaram como materiais antimicrobianos responsivos a enzimas.

Figura 26 – Formação de iodovanilina utilizando o sistema LMS lacase, ABTS.



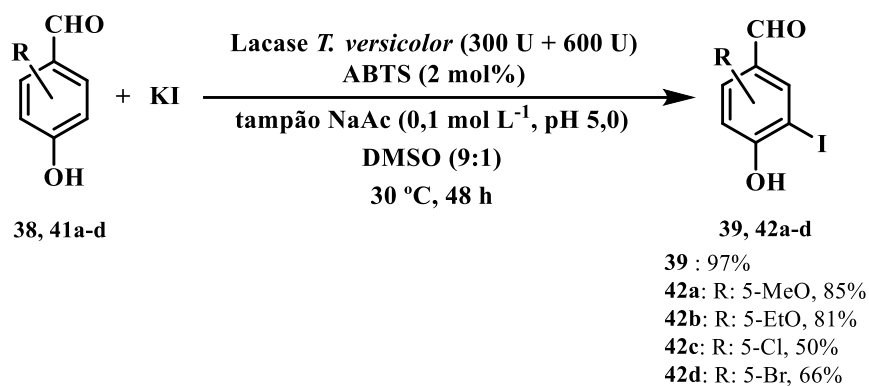
Fonte: Ihssen *et al.* (2014)

A iodação de compostos catalisados por lacase também foi reportada utilizando substratos derivados de *p*-hidroxiarilcarbonil e *p*-hidroxiarilcarboxílico (**41**) empregando KI como fonte de iodo e oxigênio atmosférico como oxidante. Utilizando o método otimizado utilizando a vanilina como modelo foi possível obter iodofenóis (**42**) com alta eficiência e sustentabilidade com rendimentos de até 93%. A utilização de KI ao invés de I₂ resultou em um aumento de economia de átomo de 72% para 85%. Pela escolha adequada das condições de reações o acoplamento fenólico oxidativo foi suprimido, resultando em uma relação de formação de produto:dímero de 198:1 (Sdahl *et al.*, 2019).

Dentre os 12 princípios da química verde o autor demonstra que o trabalho contempla 8 deles, dentre eles, a prevenção (princípio 1), pelo fato da iodação catalisada por lacase com o uso de KI, ABTS e oxigênio proveniente do ar atmosférico ser uma reação de alta seletividade, permitindo a síntese de compostos iodo fenólicos com alto rendimento e nenhum subproduto tóxico, além disso, o oxigênio molecular, empregado como oxidante é convertido em água. Outro princípio que se destaca, é referente a síntese química menos perigosa (princípio 3), visto que em comparação com outros métodos o procedimento descrito evita o uso de reagentes, como metais pesados, bases fortes, oxidantes e/ou solventes tóxicos. O iodo elementar, por exemplo, que forma gases tóxicos e irritante para olhos e pele, foi substituído por iodetos fáceis de manusear, como o KI. (Sdahl *et al.*, 2019).

Na descrição do procedimento, a vanilina (15 mmol) é solubilizada em 500 mL de uma mistura contendo solução tampão acetato de sódio (0,1 mol L⁻¹, pH 5,0) e 10% de DMSO, na presença 3 equivalentes de iodeto de potássio (45 mmol) e 2 mol% de ABTS, foi colocada em contato com 300 U de lacase, e durante 48 horas adicionadas lentamente mais 600 U de lacase de *T. versicolor* (Figura 27).

Figura 27 – Formação de compostos iodofenólicos utilizando o sistema LMS lacase, ABTS.



Fonte: adaptado de Sdahl, Braunberger e Beifuss (2019).

Nesse contexto, encontra-se promissora a possibilidade de lacase de *T. Versicolor* para a iodo-funcionalização de derivados do 1*H*-indol. Com esse objetivo, por meio de métodos biocatalíticos utilizando o sistema redox lacase-ABTS, tem-se a oportunidade de substituir metodologias utilizando bases fortes, temperaturas baixas ou excesso de bases.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

Os reagentes 1*H*-Indol (99%, Sigma Aldrich), 5-bromo-1*H*-indol (99%, Sigma Aldrich), 2-metil-1*H*-indol (98%, Sigma Aldrich), 3-metil-1*H*-indol (98%, Sigma Aldrich), 5-metoxi-1*H*-indol (99%, Sigma Aldrich), tianafteno (98%, Sigma Aldrich), iodeto de potássio (99%, InCasa), ABTS (99%, Sigma Aldrich), tiosulfato de sódio (99%, Synth), cloreto de sódio (99%, Nuclear), TEMPO (99%, Sigma-Aldrich), foram utilizados sem purificação prévia. Nas reações enzimáticas foram utilizados solventes grau HPLC. A água utilizada para a preparação dos tampões utilizada é ultrapura do tipo Milli-Q®.

A enzima de *Trametes versicolor* foi obtida comercialmente (>0,5 U/mg, Sigma Aldrich) e mantida a 4 °C. A atividade enzimática foi avaliada previamente de acordo com o procedimento descrito no item 3.2.2.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Técnicas e metodologias para a caracterização química

As análises de cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas (GC-MS) foram realizadas em um cromatógrafo Hewlett Packard 6890, equipado com um detector seletivo de massas Hewlett Packard 6890/MSD5973, equipado com software HP Chemstation e espectroteca Wiley 275. Foi utilizada uma coluna capilar HP-5MS (30 m x 250 µm), 0,25 µm espessura de filme. Temperatura da coluna, 60 °C (2 min) para 300 °C a 20 °C/min, 300 °C (4 min); temperatura de injetor 300 °C; *splitless*, volume de injeção: 1 µL diluído em acetato de etila; gás de arraste He (72 kPa); razão de fluxo: 1,2 mL/min.; energia de ionização 70 eV.

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN de ¹H e ¹³C) foram registrados em um Espectrômetro Bruker®, modelo Fourier 300, de campo magnético de 9,4 Tesla, que opera a 300,18 MHz para o núcleo de ¹H e 75,48 MHz para o núcleo de ¹³C. Para a aquisição, as amostras foram analisadas em tubos de 5 mm, na temperatura de 300 K, no solvente deuterado apropriado.

Análises de infravermelho foram realizadas utilizando o espectrômetro de infravermelho, com acessório de refletância total atenuada (ATR-FTIR) empregando um cristal de diamante. Os espectros foram obtidos na faixa de 4000-600 cm^{-1} . Com resolução de 4 cm^{-1} e 64 varreduras para o branco (*background*, cristal limpo e vazio) e 64 varreduras para a amostra. As análises de espectrofotometria no UV/Visível (UV/Vis) foram feitas em um equipamento da marca Beckman modelo Du[®]530, utilizando uma cubeta de quartzo com 1 centímetro de diâmetro.

3.2.2 Preparo das soluções tampão

As soluções tampão de acetato, citrato e fosfato na concentração de 0,1 mol L⁻¹ foram preparadas em balões volumétricos de 250 mL.

Para a solução de acetato foram solubilizados em água deionizada 0,10 g (para pH 3,6), 1,34 g (para pH 5,0), 1,93 g (para pH 5,6) de acetato de sódio e 1,43 g (para pH 3,6), 0,49 g (para pH 5,0), 0,09 (para pH 5,6) de ácido acético.

Para a solução de citrato foram solubilizados em água deionizada 0,69 g (para pH 3,0), 4,28 g (para pH 5,0), 6,43 (para pH 6,2) de citrato de sódio dihidratado e 4,36 g (para pH 3,0), 2,01 (para pH 5,0), 0,61 (para pH 6,2) de ácido cítrico.

Para a solução de fosfato de potássio foram solubilizados em água deionizada 0,25 g (para pH 5,8), 3,03 g (para pH 7,4) de fosfato de potássio dibásico e 3,20 g (para pH 5,8), 1,04 g (para pH 7,4) de fosfato de potássio monobásico.

O valor do pH foi aferido em pHmetro de bancada da marca Kasvi, sendo que, quando necessário o valor de pH foi ajustado com soluções de NaOH ou HCl (0,1 mol L⁻¹). As soluções tampão foram armazenadas em frasco âmbar e acondicionadas sob refrigeração.

3.2.3 Ensaios de atividade enzimática para a lacase de *T. versicolor*

O ensaio de atividade enzimática foi realizado a partir da técnica de espectrofotometria, empregando o ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazoline-6-sulfônico) (ABTS) como substrato. Para isso foram inicialmente preparadas duas soluções: Solução A compreendendo 1 mL de uma solução tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 5,0) e 1 mg da lacase, e a Solução B constituída de uma solução aquosa de ABTS com concentração de 1,0 mol L⁻¹.

Em uma cubeta de quartzo de 3,0 mL, foram adicionados 1,980 mL da solução tampão

acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 5,0), 20 µL da Solução A e 200 µL da Solução B. Logo após a adição da solução B a absorbância foi monitorada em 420 nm no período de 1 min. Os ensaios foram realizados em triplicata e o valor para a atividade enzimática foi obtida a partir da Equação 1.

$$Atividade (U) = \left(\frac{\Delta Abs}{\epsilon \times l} \right) \times 10^6 \times \frac{V_{total}}{V_{amostra}} \quad (1)$$

Sendo que:

ΔAbs : Inclinação da curva obtida por regressão linear a partir da absorbância *versus* tempo.

ϵ : Absortividade molar do ABTS (36000 L mol⁻¹ cm⁻¹);

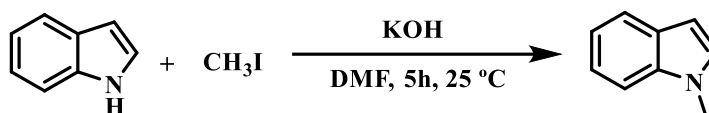
l : Caminho óptico (cm).

V : volume (L)

Por definição, uma unidade de atividade enzimática (1 U) corresponde a quantidade de enzima que converte 1 µmol do substrato por minuto e nas condições estabelecidas no ensaio.

3.2.4 Síntese dos substratos derivados do 1H-indol

3.2.4.1 Síntese do 1-metil-1H-indol (**43**)



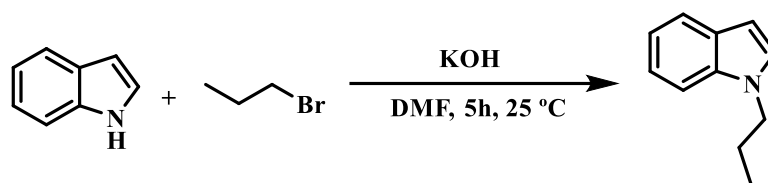
A síntese do composto **43** foi realizada de acordo com o procedimento reportado por Turnu *et al.* (2019), com modificações. Em um balão de 25 mL, foi adicionado hidróxido de potássio (4 mmol, 224 mg) e DMF (10 mL). A mistura foi agitada a 25 °C por 5 min e, após, foi adicionado o 1H-indol (2 mmol, 0,234 mg). A mistura foi mantida sob agitação por 45 min e após resfriada a 0 °C. Na sequência, o CH₃I (3 mmol, 0,426 mg) foi adicionado lentamente, e a mistura resultante trazida a 25 °C e mantida sob agitação por mais 5 h. Após, foram adicionados 10 mL de água e o produto extraído com acetato de etila (3 x 10 mL). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ e o solvente evaporado sob pressão reduzida. O produto foi purificado por coluna cromatográfica de sílica gel, utilizando hexano e acetato de etila (9:1) como eluente, e obtido como um líquido levemente amarelado e com rendimento de 80% (208 mg).

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 7,62 (dt, $J = 7,8 \text{ Hz}$, $J = 0,9 \text{ Hz}$, 1H), 7,33-7,07 (m, 3H), 7,03 (d, $J = 3,3 \text{ Hz}$, 1H), 6,48 (dd, $J = 3,1 \text{ Hz}$, $J = 0,78 \text{ Hz}$, 1H), 3,75 (s, 3H).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 136,8; 128,8; 128,5; 121,5; 120,9; 119,3; 109,2; 100,9; 32,8.

MS(EI) m/z (intensidade %): 131,05 (100%) [M^+], 116,05 (8,35%), 103,05 (9,08%), 89,05 (14,57%).

3.2.4.2 Síntese do 1-propil-1H-indol (**44**)

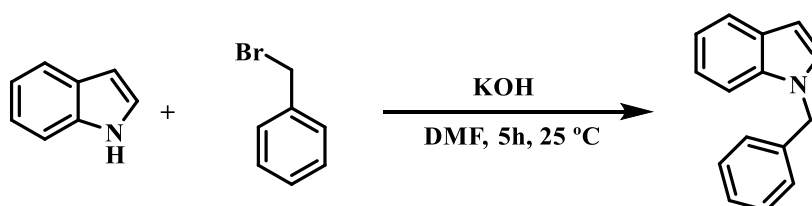


A síntese do composto **44** foi realizada de acordo com o procedimento reportado por Qi *et al.* (2018), com modificações. Em um balão de 25 mL, foi adicionado hidróxido de potássio (4 mmol, 224 mg) e DMF (10 mL). A mistura foi agitada a 25 °C por 5 min e, após, foi adicionado o 1H-indol (2 mmol, 0,234 mg). A mistura foi mantida sob agitação por 45 min e após resfriada a 0 °C. Na sequência, o bromopropano (3 mmol, 0,366 mg) foi adicionado lentamente, e a mistura resultante trazida a 25 °C e mantida sob agitação por mais 5 h. Após, foram adicionados 10 mL de água e o produto extraído com acetato de etila (3 x 10 mL). A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 e o solvente evaporado sob pressão reduzida. O produto foi purificado por coluna cromatográfica de sílica gel, utilizando hexano e acetato de etila (9:1) como eluente, e obtido como um líquido levemente amarelado e com rendimento de 74% (235 mg).

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 7,63 (dt, $J = 7,8 \text{ Hz}$, $J = 0,9 \text{ Hz}$, 1H), 7,37-7,05 (m, 4H), 6,48 (dd, $J = 3,1 \text{ Hz}$, $J = 0,78 \text{ Hz}$, 1H), 4,08 (t, $J = 7,0 \text{ Hz}$, 2H), 1,86 (sex, $J = 7,3 \text{ Hz}$, 2H), 0,92 (t, $J = 7,3 \text{ Hz}$, 3H).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 136,4; 128,7; 128,3; 121,1; 120,5; 119,6; 109,1; 100,7; 58,9; 22,9; 11,7.

MS(EI) m/z (intensidade %): 159,15 (42,28%) [M^+], 130,15 (100%), 116,05 (5,07%), 103,05 (6,37%), 89,05 (7,93%).

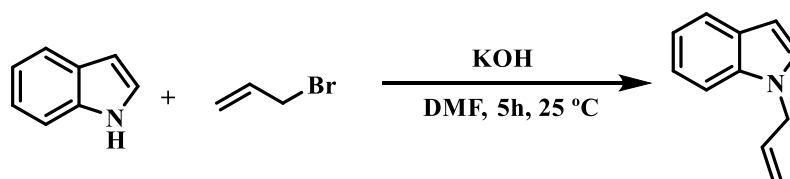
3.2.4.3 Síntese do 1-benzil-1*H*-indol (**45**)

A síntese do composto **45** foi realizada de acordo com o procedimento reportado por Turnu *et al.* (2019), e sem modificações. Em um balão de 25 mL, foi adicionado hidróxido de potássio (4 mmol, 224 mg) e DMF (10 mL). A mistura foi agitada a 25 °C por 5 minutos e, após, foi adicionado o 1*H*-indol (2 mmol, 0,234 mg). A mistura foi mantida sob agitação por 45 min e após resfriada a 0 °C. Na sequência, o brometo de benzila (3 mmol, 0,513 mg) foi adicionado lentamente, e a mistura resultante trazida a 25 °C e mantida sob agitação por mais 5 h. Após, foram adicionados 10 mL de água e o produto extraído com acetato de etila (3 x 10 mL). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ e o solvente evaporado sob pressão reduzida. O produto foi purificado por coluna cromatográfica de sílica gel, utilizando hexano e acetato de etila (9:1) como eluente, e obtido como um sólido levemente marrom e com rendimento de 42% (173 mg).

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ: 8,06 (dd, *J* = 7,8, ⁵*J* = 0,7 Hz, 1H), 7,82-7,73 (m, 1H), 7,69 (m, 3H), 7,67-7,62 (m, 1H), 7,61-7,55 (m, 1H), 7,55-7,46 (m, 3H), 7,03-6,91 (m, 1H), 5,72 (s, 2H).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ: 137,5; 136,2; 128,7; 128,2; 127,5; 126,7; 121,6; 120,9; 119,4; 109,6; 101,6; 50,0.

MS(EI) *m/z* (intensidade %): 207,15 (100%) [M⁺], 116,05 (7,05%), 92,15 (7,21%), 91,15 (80,95%), 89,15 (10,15%).

3.2.4.4 Síntese do 1-alil-1*H*-indol (**46**)

A síntese do composto **46** foi realizada de acordo com o procedimento reportado por Turnu *et al.* (2019), e sem modificações. Em um balão de 25 mL, foi adicionado hidróxido de

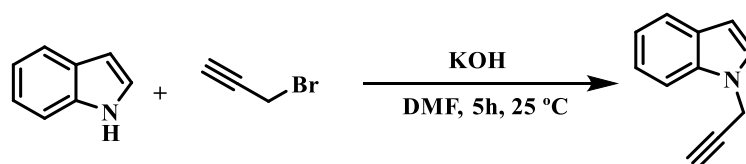
potássio (4 mmol, 224 mg) e DMF (10 mL). A mistura foi agitada a 25 °C por 5 minutos e, após, foi adicionado o 1*H*-indol (2 mmol, 0,234 mg). A mistura foi mantida sob agitação por 45 min e após resfriada a 0 °C. Na sequência, o brometo de alila (3 mmol, 0,363 mg) foi adicionado lentamente, e a mistura resultante trazida a 25 °C e mantida sob agitação por mais 5 h. Após, foram adicionados 10 mL de água e o produto extraído com acetato de etila (3 x 10 mL). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ e o solvente evaporado sob pressão reduzida. O produto foi purificado por coluna cromatográfica de sílica gel, utilizando hexano e acetato de etila (9:1) como eluente, e obtido como um líquido amarelado com rendimento de 62% (195 mg).

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ: 7,67-7,53 (m, 1H), 7,23 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 7,15 (dd, *J* = 9,6, *J* = 4,6 Hz, 1H), 7,10-7,04 (m, 1H), 6,96 (d, *J* = 2,9 Hz, 1H), 6,46 (d, *J* = 2,2 Hz, 1H), 5,91-5,78 (m, 1H), 5,12-5,06 (m, 1H), 5,02-4,91 (m, 1H), 4,57-4,51 (m, 2H);

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ: 135,9; 133,3; 128,5; 127,6; 121,3; 120,8; 119,3; 116,9; 109,4; 101,2; 48,5.

MS(EI) *m/z* (intensidade %): 156,05 (100%) [*M*⁺], 130,05 (57,72%), 116,05 (36,75%), 89,05 (38,27%), 77,05 (20,62%), 63,05 (22,08%).

3.2.4.5 Síntese do 1-(prop-2-in-1-il)-1*H*-indol (**47**)



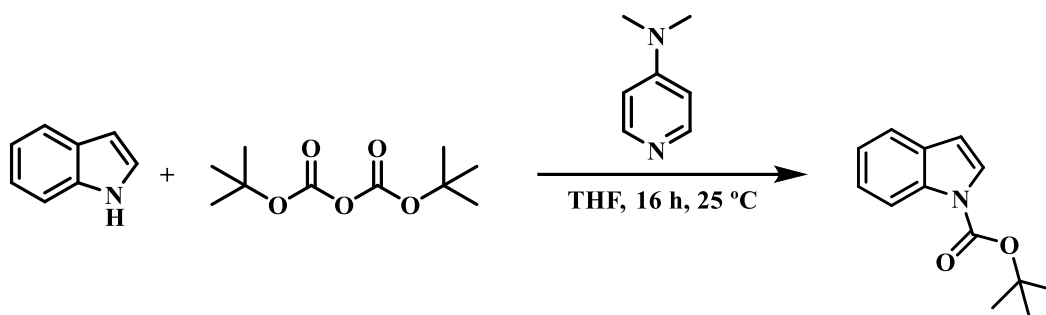
A síntese do composto **47** foi realizada de acordo com o procedimento reportado por Turnu *et al.* (2019) e sem modificações. Em um balão de 25 mL, foi adicionado hidróxido de potássio (1,1 mmol, 62 mg) e DMF (10 mL). A mistura foi agitada a 25 °C por 5 minutos até a adição de 1*H*-indol (1 mmol, 117 mg), a agitação é continuada por mais 45 minutos. Após, a mistura reacional é resfriada a 0 °C para a adição lenta de uma solução 80% (m/m) de brometo de propargila em tolueno (1,3 mmol, 155 mg), a reação é aquecida a 25 °C e agitada por mais 5 horas. Após, a mistura é diluída com 10 mL de água e extraída com acetato de etila (3 x 10 mL), as porções orgânicas foram combinadas e secas com Na₂SO₄ e o solvente evaporado sob pressão reduzida. O produto foi purificado por cromatografia de sílica gel, utilizando hexano e acetato de etila (9:1) como eluente, e obtido como um líquido levemente marrom com rendimento de 74% (229 mg).

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 7,56 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H), 7,31 (t, $J = 7,2$ Hz, 1H), 7,19- 7,14 (m, 1H), 7,11 (d, $J = 3,2$ Hz, 1H), 7,09-7,03 (m, 1H), 6,45 (d, $J = 3,1$ Hz, 1H), 4,76 (d, $J = 2,5$ Hz, 2H), 2,32-2,27 (m, 1H).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 135,8; 128,9; 127,3; 121,9; 121,2; 119,9; 109,4; 102,1; 77,8; 73,6; 35,8.

MS(EI) m/z (intensidade %): 155,15 (71,94%) [M^+], 154,15 (100%), 127,15 (9,87%), 116,15 (24,48%), 89,15 (21,88%).

3.2.4.6 Síntese do 1-Boc-1H-indol (**48**)

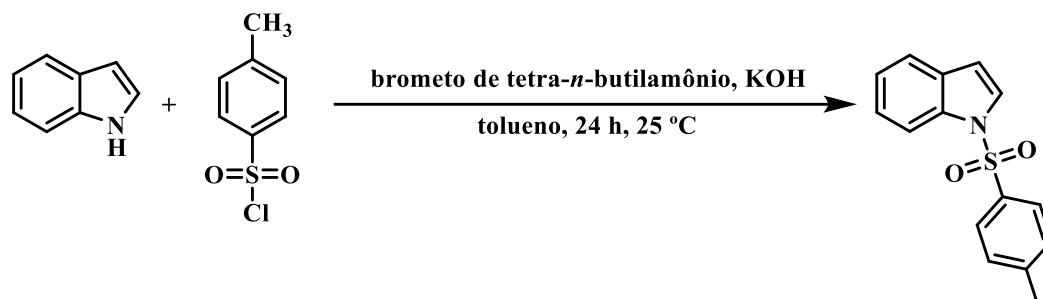


A síntese do composto **48** foi realizada de acordo com o procedimento reportado por Turnu *et al.* (2019) e sem modificações. Em um balão de 25 mL, duas bocas, seco e sob atmosfera de nitrogênio foi adicionado o 1H-indol (1 mmol, 117 mg), dicarbonato de di-*terc*-butila (1,1 mmol, 240 mg), 4-dimetilaminopiridina (0,01 mmol, 1 mg) e 8 mL de THF anidro. A mistura reacional foi mantida sob agitação e a 25 °C por 16 horas. Após, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida e o produto purificado por coluna cromatográfica de sílica gel utilizando hexano e acetato de etila (9:1) como eluente, e obtido como um líquido levemente amarelado com rendimento de 84% (182 mg).

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 8,15 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H), 7,59 (d, $J = 3,5$ Hz, 1H), 7,55 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H), 7,30 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H), 7,21 (t, $J = 7,4$ Hz, 1H), 6,55 (d, $J = 3,7$ Hz, 1H), 1,66 (s, 9H).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 149,7; 130,5; 125,8; 124,1; 122,5; 120,8; 115,1; 107,2; 83,5; 30,3; 28,1.

MS(EI) m/z (intensidade %): 217,20 (22,76%) [M^+], 161,10 (57,26%), 117,10 (100%), 89,10 (19,43%), 57,10 (54,54%)

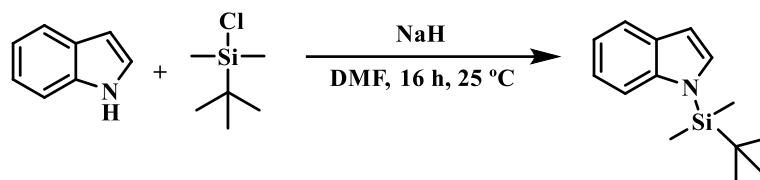
3.2.4.7 Síntese do 1-tosil-1*H*-indol (**49**)

A síntese do composto **49** foi realizada de acordo com o procedimento reportado por Turnu *et al.* (2019) e sem modificações. Em um balão de 25 mL, foi adicionado 1*H*-indol (1 mmol, 117 mg), brometo de tetra-*n*-butilamônio (0,025 mmol, 8 mg), 5 mL de solução aquosa 50% de KOH e 10 mL de tolueno, após, lentamente adicionou-se cloreto de tosila (1,1 mmol, 210 mg). A mistura foi mantida a 25 °C durante 24 horas sob agitação magnética. Após o término da reação a fase orgânica foi separada e lavada com solução aquosa de HCl 1 mol L⁻¹ (3x10 mL), solução saturada de NaHCO₃ (3x10 mL) e solução saturada de NaCl (2x10mL), seca com Na₂SO₄ e evaporada sob pressão reduzida. O produto foi obtido como um sólido branco por meio de recristalização utilizando MeOH quente e com rendimento de 50% (135 mg)

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ: 7,97 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,76 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H), 7,56 (d, *J* = 4,0 Hz, 1H), 7,52 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,32-7,28 (m, 1H), 7,5-7,19 (m, 3H), 6,64 (d, *J* = 4,0 Hz, 1H), 2,32 (s, 3H).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ: 144,9; 135,4; 134,8; 130,7; 129,8; 126,8; 126,3; 124,5; 123,2; 121,3; 113,5; 109,0; 21,5.

MS(EI) *m/z* (intensidade %): 271,10 (100%) [M⁺], 155,10 (52,91%), 166,10 (48,22), 91,10 (79,13%), 89,10 (27,23%).

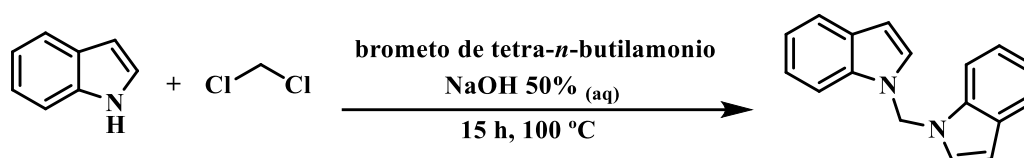
3.2.4.8 Síntese do 1-(*tert*-butildimetilsilil)-1*H*-indol (**50**)

A síntese do composto **50** foi realizada de acordo com o procedimento reportado por Grenet *et al.* (2018) e sem modificações. Em um balão de 25 mL, foi adicionado hidreto de sódio (1,1 mmol, 26 mg) e DMF (10 mL). A mistura foi agitada a 25 °C por 5 minutos até a adição de 1*H*-indol (1 mmol, 117 mg), a agitação é continuada por mais 45 minutos. Após, a mistura reacional é resfriada a 0 °C para a adição lenta de cloreto de *tert*-butil-cloro-dimetilsilano (1,5 mmol, 226 mg), a reação é aquecida a 25 °C e agitada por mais 16 horas. Após, a mistura é diluída com 10 mL de água e extraída com acetato de etila (3 x 10 mL), as porções orgânicas foram combinadas e secas com Na₂SO₄ e o solvente evaporado sob pressão reduzida. O produto foi purificado por cromatografia de sílica gel, utilizando hexano e acetato de etila (9:1) como eluente, e obtido como um sólido levemente amarelado com rendimento de 43% (99 mg).

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ: 7,58 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H), 7,43 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H), 7,10 (d, *J* = 3,4 Hz, 1H), 7,11 – 7,00 (m, 2H), 6,52 (d, *J* = 2,7 Hz, 1H), 0,86 (s, 9H), 0,53 (s, 6H).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ: 141,4; 132,5; 131,9; 122,1; 120,5; 119,4; 113,8; 106,5; 27,3.

MS(EI) *m/z* (intensidade %): 231,25 (46,33%) [M⁺], 174,25 (100%), 117,15 (5,67%), 89,15 (2,32%), 73,15 (7,95%).

3.2.4.9 Síntese do di(1*H*-indol-1-il)metano (**51**)

A síntese do composto **51** foi realizada de acordo com o procedimento reportado por (R and Greenhouse, 1985), com algumas modificações. Em um vial de 15 mL, foi solubilizado 1*H*-indol (2 mmol, 234 mg) e brometo de teta-*n*-butilamonio (2 mmol, 644 mg) em 7,5 mL de

diclorometano. Após serem solubilizados, foi adicionado 2 mL de uma solução aquosa de NaOH (50% m/v). O vial foi selado e a mistura aquecida até 100 °C durante 15 h sob agitação. Em seguida, a mistura foi resfriada para à temperatura ambiente e diluída com água destilada, então, a mistura foi extraída utilizando diclorometano (3x10 mL). As frações orgânicas foram juntadas e lavadas com água destilada (5x10 mL), após, a fração orgânica foi seca com Na₂SO₄ e evaporada sob pressão reduzida. O produto purificado por coluna cromatográfica de sílica gel utilizando hexano e acetato de etila (7:3) como eluente, e obtido como um sólido branco com rendimento de 40% (196 mg).

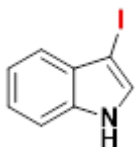
RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ: 7,61 (d, ³J = 7,9 Hz, 1H), 7,44 (d, ³J = 8,2 Hz, 1H), 7,27 – 7,10 (m, 6H), 6,52 (dd, 2H, ³J = 3,35 Hz, ⁵J = 0,85), 6,28 (s, 2H).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ: 135,9; 129,1; 127,2; 122,6; 121,4; 120,5; 109,4; 103,4; 56,3,
MS(EI) m/z (intensidade %): 246,15 (33,71%) [M⁺], 130,15 (100%), 116,15 (8,62%), 103,15 (11,29%), 89,15 (10,62%), 77,15 (15,27%).

3.2.5 Iodo-funcionalização do 1H-indol e derivados

As reações de iodo-funcionalização foram realizadas em vials de vidro para *headspace* com volume de 20 mL em um agitador orbital termostaticado (KASVI, modelo K80200). No vial foram adicionados o indol correspondente (0,1 mmol) e 0,5 mL do cossolvente. Após a completa solubilização do indol, 5 mL da solução tampão acetato adicionados seguido do iodeto de potássio (0,3 mmol, 50 mg) e ABTS (2 mol%, 1,0 mg). Por fim, a lacase de *T. versicolor* (7 U) foi adicionada e o vial fechado com um septo de silicone. Para permitir a aeração do sistema reacional o septo foi perfurado com uma agulha hipodérmica (13 mm x 0,44 mm). A mistura reacional foi mantida sob constante agitação a 30 °C, e no tempo reacional estabelecido para cada substrato. Após, foi adicionado tiosulfato de sódio (20 mg) para a redução das espécies de iodo e a mistura agitada por 5 min. Na sequência, o produto foi extraído com éter etílico (3 x 5 mL) e posteriormente as fases orgânicas combinadas foram lavadas com água (3 x 5 mL), seguida de uma solução saturada de NaCl (3 x 5 mL). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro e o solvente evaporado sob pressão reduzida. Os produtos foram purificados por coluna cromatográfica de sílica gel utilizando hexano e acetato de etila como eluente.

3.2.5.1 3-iodo-1*H*-indol (**i1**)



Obtido como um sólido levemente marrom, com 99% (24 mg) de rendimento.

Os dados espectrais obtidos estão de acordo com os reportados na literatura (Sun et al., 2018).

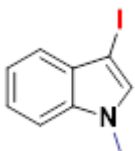
RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 11,45 (sl, 1H), 7,56 (d, $^3J = 2,49$ Hz, 1H), 7,43 (d, $J = 7,71$ Hz, 1H), 7,30 (d, $^3J = 7,65$ Hz, 1H), 7,07-7,21 (m, 2H).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 61,2; 117,2; 125,0; 127,4; 134,5; 134,8; 134,9; 141,1.

(EI) m/z (intensidade %): 243,00 (100%) $[\text{M}]^+$, 116,10 (39.64%)

EMAR [APCI (+)]: Calculado para $[\text{C}_8\text{H}_6\text{IN}^+]$: 242,9545, encontrado 242,9527.

3.2.5.2 1-metil-3-iodo-1*H*-indol (**i2**)



Obtido como um sólido levemente marrom, com 93% (24 mg) de rendimento.

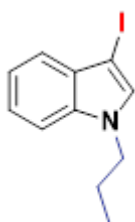
Os dados espectrais obtidos estão de acordo com os reportados na literatura (Boochi and Palla, 1982).

RMN de ^1H (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 7,54 (s, 1H), 7,46 (dt, $^3J = 8,12$ Hz, $^4J = 0,85$ Hz, 1H), 7,30 – 7,31 (m, 3H), 3,80 (s, 3H).

RMN de ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 136,6; 133,5; 129,8; 122,2; 120,1; 120,0; 110,3; 54,5; 32,8.

MS(EI) m/z (intensidade %): 256.90 (100%) $[\text{M}]^+$, 241.90 (5.65%), 130.00 (14.29%)

EMAR [APCI (+)]: Calculado para $[\text{C}_9\text{H}_8\text{IN}^+]$: 256,9701, encontrado 256,9715.

3.2.5.3 1-propil-3-iodo-1*H*-indol (**i3**)

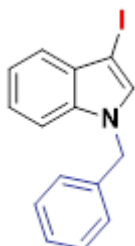
Obtido como um líquido levemente marrom, com 99% (25 mg) de rendimento.

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 7,60 (s, 1H), 7,52 (dt, $^3J = 8,10$ Hz, $^4J = 0,89$ Hz, 1H), 7,32 – 7,08 (m, 3H), 4,20 – 4,11 (t, $^3J = 7$ Hz, 2H), 1,76 (sex, $^3J = 7,22$ Hz, 2H), 0,82 (t, $^3J = 7,39$ Hz, 3H).

RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 136,4; 130,0; 130,2; 122,6; 120,7; 120,4; 110,8; 55,4; 47,8; 23,6; 11,6.

MS(EI) m/z (intensidade %): 284,90 (88,87%) $[\text{M}]^+$, 255,90 (100%), 241,90 (8,98%), 129,00 (36,87%), 158,00 (3,45%)

EMAR [APCI (+)]: Calculado para $[\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{IN}^+]$: 285,0014, encontrado 285,0083.

3.2.5.4 1-benzil-3-iodo-1*H*-indol (**i4**)

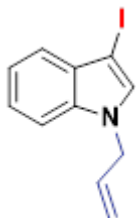
Obtido como um líquido marrom, com 94% (31 mg) de rendimento.

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 7,76 (s, 1H), 7,51 (d, $^3J = 7,8$ Hz, 1H), 7,39 – 7,08 (m, 10H), 5,44 (s, 2H).

RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 138,3; 136,3; 133,4; 130,1; 128,7; 127,6; 127,2; 122,4; 120,3; 120,3; 110,7; 55,8; 49,4.

MS(EI) m/z (intensidade %): 332,90 (52,18%) $[\text{M}^+]$, 241,90 (4,65%), 206,00 (6,90%), 115,00 (8,05%), 91,00 (100%).

EMAR [APCI (+)]: Calculado para $[\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{IN}^+]$: 333,0014, encontrado 333,0002.

3.2.5.5 1-alil-3-iodo-1*H*-indol (i5)

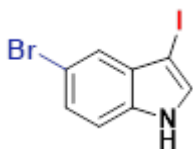
Obtido como um líquido marrom, com 97% (27 mg) de rendimento.

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 7,56 (s, 1H), 7,45 (d, $^3J = 7,95$ Hz, 1H), 7,31 – 7,10 (m, 3H), 5,97 (ddt, $^3J_{trans} = 17,02$ Hz, $^3J_{cis} = 10,19$ Hz, $^3J = 5,46$ Hz, 1H), 5,14 (dq, $^3J_{cis} = 10,16$ Hz, $^2J_{gem} = 1,5$ Hz, 1H), 5,03 (dq, $^3J_{trans} = 17,06$ Hz, $^2J_{gem} = 1,6$ Hz), 4,84 (dt, $J = 5,48$ Hz, $^3J = 1,5$ Hz, 2H).

RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 135,9; 134,2; 123,7; 129,9; 122,4; 120,3; 120,2; 117,2; 110,6; 55,5; 48,4.

MS(EI) m/z (intensidade %): 282,90 (100%) [M] $^+$, 255,80 (8.54%), 241,80 (44.99%), 156,00 (40.38%), 115,00 (36.18%)

EMAR [APCI (+)]: Calculado para [$\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{IN}^+$]: 282,9858, encontrado 282,9902.

3.2.5.6 5-bromo-3-iodo-1*H*-indol (i11)

Obtido como um sólido marrom avermelhado, com 92% (29 mg) de rendimento.

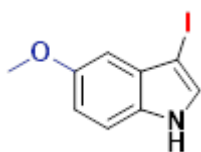
Os dados espectrais obtidos estão de acordo com os reportados na literatura (Sun et al., 2018).

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 11,76 (sl, 1H), 7,62 (d, $^3J = 2,55$ Hz, 1H), 7,43 – 7,36 (m, 2H), 7,27 (dd, $^3J = 8,62$ Hz, $^4J = 1,86$ Hz, 1H)

RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 134,8; 131,4; 131,3; 124,8; 122,0; 114,1; 112,5; 55,2.

MS(EI) m/z (intensidade %): 320,90 (100%) [M] $^+$, 241,90 (5,96%), 193,90 (16,42%).

EMAR [APCI (+)]: Calculado para [$\text{C}_8\text{H}_5\text{BrNI}^+$]: 320,8650, encontrado 320,8739.

3.2.5.7 5-metoxi-3-iodo-1*H*-indol (**i12**)

Obtido como um sólido levemente marrom, com 96% (26 mg) de rendimento.

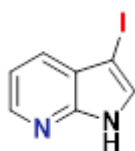
Os dados espectrais obtidos estão de acordo com os reportados na literatura (Sun et al., 2018).

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 11,40 (bs, 1H), 7,49 (d, $^3J = 2,56$ Hz, 1H), 7,30 (d, $^3J = 8,73$ Hz, 1H), 6,79 (dd, $^3J = 8,88$ Hz, $^4J = 2,48$ Hz, 1H), 6,71 (d, $^3J = 2,14$ Hz), 3,78 (s, 3H).

RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 154,2; 130,9; 130,1; 129,8; 112,8; 112,6; 101,0; 55,5; 55,3.

MS(EI) m/z (intensidade %): 272,90 (100%) [M^+], 257,90 (46,06%), 229,90 (26,68%), 146,00 (6,78%).

EMAR [APCI (+)]: Calculado para [$\text{C}_9\text{H}_8\text{INO}^+$]: 272,9651, encontrado 272,9638.

3.2.5.8 3-iodo-7-aza-1*H*-indol (**i14**)

Obtido como um sólido levemente amarelado, com 97% (23 mg) de rendimento.

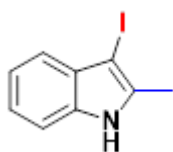
Os dados espectrais obtidos estão de acordo com os reportados na literatura (Sun et al., 2018).

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 12,12 (bs, 1H), 8,25 (dd, $^3J = 4,68$ Hz, $^4J = 1,48$ Hz, 1H), 7,71 (d, $^3J = 2,03$ Hz, 1H), 7,68 (dd, $^3J = 7,90$ Hz, $^4J = 1,43$ Hz, 1H), 7,15 (dd, $^3J = 7,89$ Hz, $^3J = 4,68$ Hz, 1H).

RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 148,0; 143,8; 130,5; 128,1; 122,0; 116,5; 54,4.

MS(EI) m/z (intensidade %): 243,95 (100%) [M^+], 117,05 (36,63%), 90,05 (21,95%), 63,05 (20,95%).

EMAR [APCI (+)]: Calculado para [$\text{C}_7\text{H}_5\text{IN}_2^+$]: 243,9497, encontrado 243,9531.

3.2.5.9 2-metil-3-iodo-1*H*-indol (**i15**)

Obtido como um sólido marrom, com 89% (23 mg) de rendimento.

MS(ED) *m/z* (intensidade %): 257,00 (100%) [M]⁺, 130,10 (33.99%).

EMAR [APCI (+)]: Calculado para [C₉H₈IN⁺]: 256,9701, encontrado 256,9649.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo, estão apresentados os estudos para a otimização das condições reacionais para a iodo-funcionalização do 1*H*-indol, com a respectiva discussão sobre os efeitos das condições reacionais na conversão e seletividade da reação. São também apresentados e discutidos a aplicação da metodologia para derivados do 1*H*-indol e o efeito de grupos substituintes no átomo de nitrogênio bem como o efeito de substituintes presentes no anel benzênico ou na dupla ligação presentes entre as posições C2 e C3. E por fim, é discutida uma proposta para o mecanismo reacional com base em experimentos controle e a identificação dos intermediários reativos.

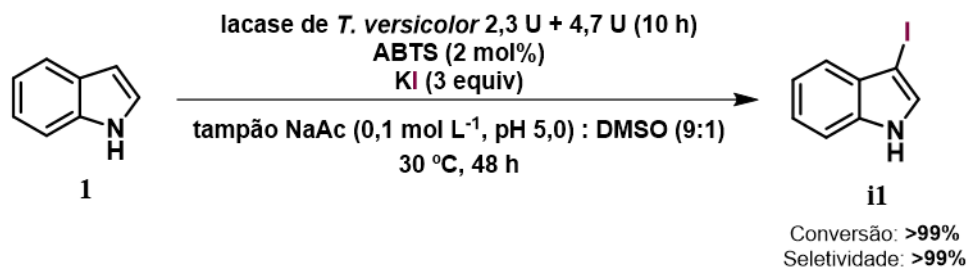
4.1 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES REACIONAIS

Inspirados no trabalho reportado por Sdahl e colaboradores (2019), o qual foi detalhado na revisão bibliográfica, idealizamos que o sistema lacase-mediador redox seria uma estratégia complementar as metodologias já descritas na literatura, bem como uma versão biocatalítica para a iodo-funcionalização do 1*H*-indol (**1**) e derivados.

No trabalho de Sdahl e colaboradores, é descrito que nas condições otimizadas é necessário adicionar a lacase em duas porções para atingir o melhor rendimento, que no caso foi de 93%, uma vez que a lacase sofre iodação parcial, o que resulta em sua desativação parcial.

Assim, em um primeiro ensaio o 1*H*-indol (**1**) foi submetido nas mesmas condições reacionais, ou seja, 1*H*-indol (**1**, 0,1 mmol), 3 equivalentes de iodeto de potássio (0,3 mmol) e 2 mol% de ABTS (0,002 mmol) foram solubilizados em 5 mL de uma mistura contendo 10% (v/v) de DMSO em solução tampão de acetato de sódio (0,1 mol L⁻¹, pH 5,0). A mistura reacional mantida sob agitação por 48 horas a 30 °C apenas na presença do O₂ atmosférico. Neste primeiro ensaio, a lacase de *T. versicolor* (7 U) foi adicionada em duas porções, a primeira consistindo de um terço de lacase no início da reação e o restante em um intervalo de 10 horas sob gotejamento (Figura 28).

Figura 28 – Reação de iodação do 1*H*-indol utilizando o sistema redox lacase mediador.



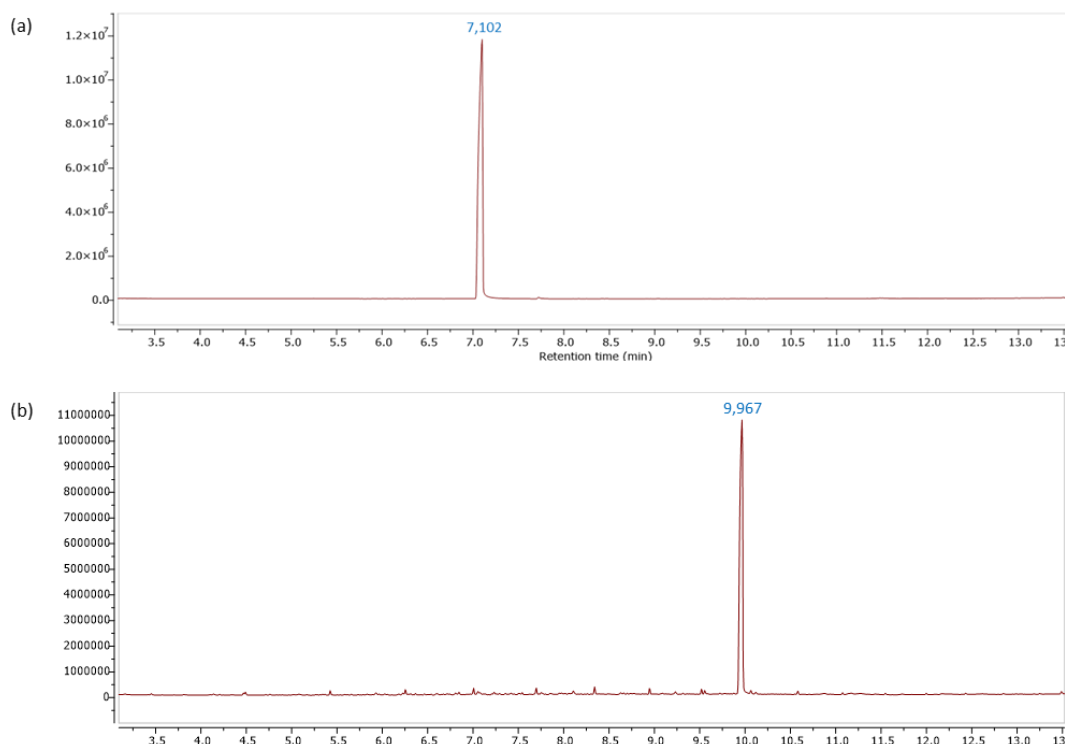
Após o tempo reacional de 48 h, uma alíquota foi analisada por GC-MS, e foi observado a completa conversão do 1*H*-indol a um único produto iodado. Após, foi variado o modo com que seria adicionado a enzima e o substrato, visto que de acordo com o trabalho de Sdahl e colaboradores (2019), a reação inicia com a adição de um terço das quantidades estabelecidas para a enzima e o substrato, o restante é gotejado lentamente durante o curso da reação para não haver formação de dímeros da vanilina, composto que utilizaram para a otimização da reação.

Diante desta informação, e para avaliar a possibilidade de formação de outros produtos, ou a inativação da enzima, foram realizados três ensaios, o primeiro consistindo em adicionar um terço da enzima no início da reação e o restante durante o curso da reação, o segundo com adição de um terço de iodeto de potássio no início da reação e o restante durante o seu curso, e o terceiro com a adição de todos os componentes da reação no início.

Diferente do trabalho citado, não foi necessária a adição em porções, visto que, mesmo quando adicionados todos os componentes no início da reação, a conversão do 1*H*-indol foi total e não houve formação de nenhum tipo de dímero.

Na Figura 29, o cromatograma (a) é resultante da análise do substrato 1*H*-indol que apresenta um tempo de retenção (t_R) de 7,10 min. Já o cromatograma (b) é resultante da análise da reação após 48 h, e sem purificação prévia, apresentando um único pico com t_R de 9,97 min.

Figura 29 – Cromatogramas obtidos por GC-MS do 1*H*-indol (a) e da respectiva reação de iodação empregando o sistema redox lacase/ABTS após 48 h (b)

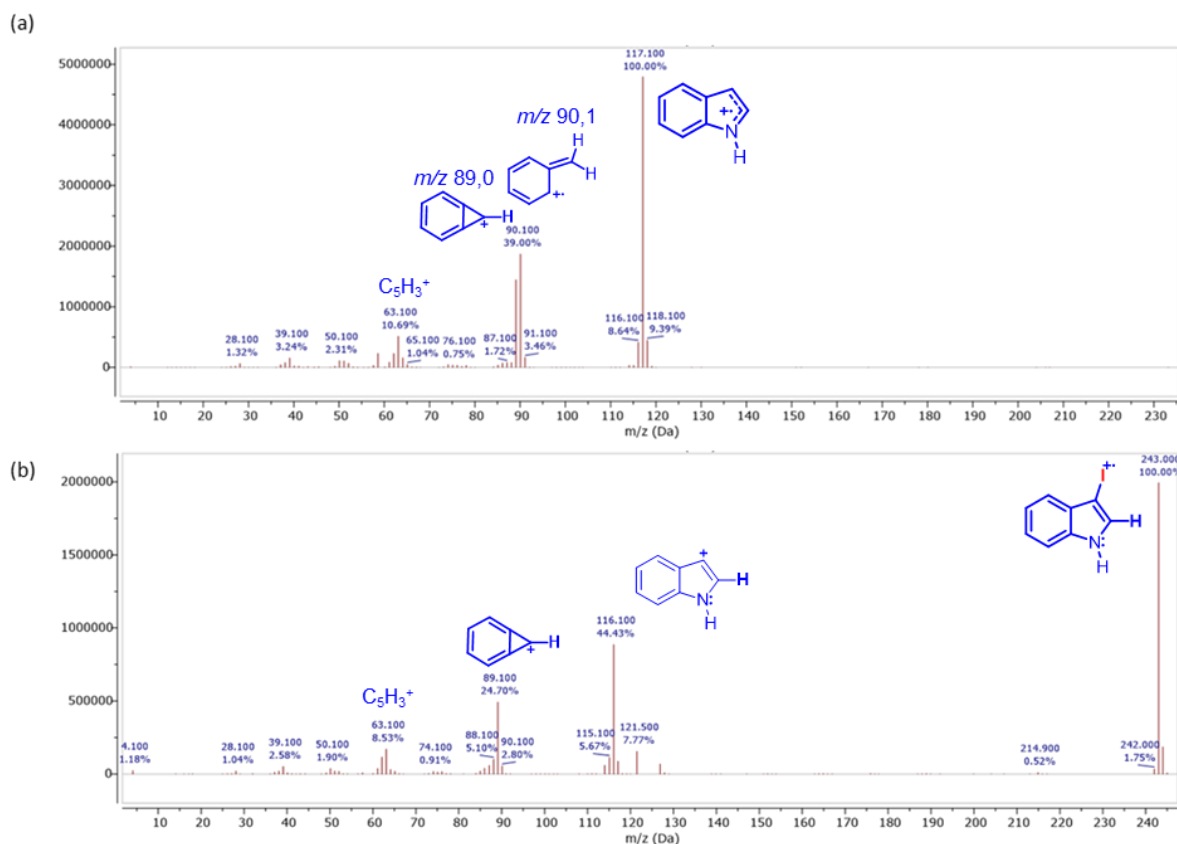


Para a confirmação da identidade química do 3-iodo-1*H*-indol na análise por GC-MS, foi também empregada a análise do perfil de fragmentação do íon molecular nos espectros de massas, como mostrado na Figura 30.

No fragmentograma do 1*H*-indol (a), observa-se a presença do íon molecular $[M]^+$, com m/z 117 (pico base). A primeira fragmentação com a perda de HCN leva ao fragmento m/z 90 $[C_7H_6]^+$. Na fragmentação do 1*H*-indol também é típico o fragmento de m/z 89 $[C_7H_5]^+$, o qual é decorrente da perda do fragmento neutro H_2CN . Os íons m/z 90 e m/z 89 aparecem com abundância relativa de 39% e 27% respectivamente. O qual está de acordo com o relatado. Por fim, o fragmento com m/z 63 referente ao íon $[C_5H_3]^+$ (Powers, 1967).

Já no fragmentograma (b), referente ao pico com t_R de 9,97 min, e que foi atribuído ao produto 3-iodo-1*H*-indol, observa-se a m/z 243 para o $[M]^+$ (pico base), seguido do fragmento com m/z 116, o qual foi atribuído ao íon $[M-I]^+$. Também observa-se o fragmento com m/z 89 referente ao íon $[C_7H_5]^+$ e, por fim, o fragmento com m/z 63, o qual é atribuído ao fragmento $[C_5H_3]^+$.

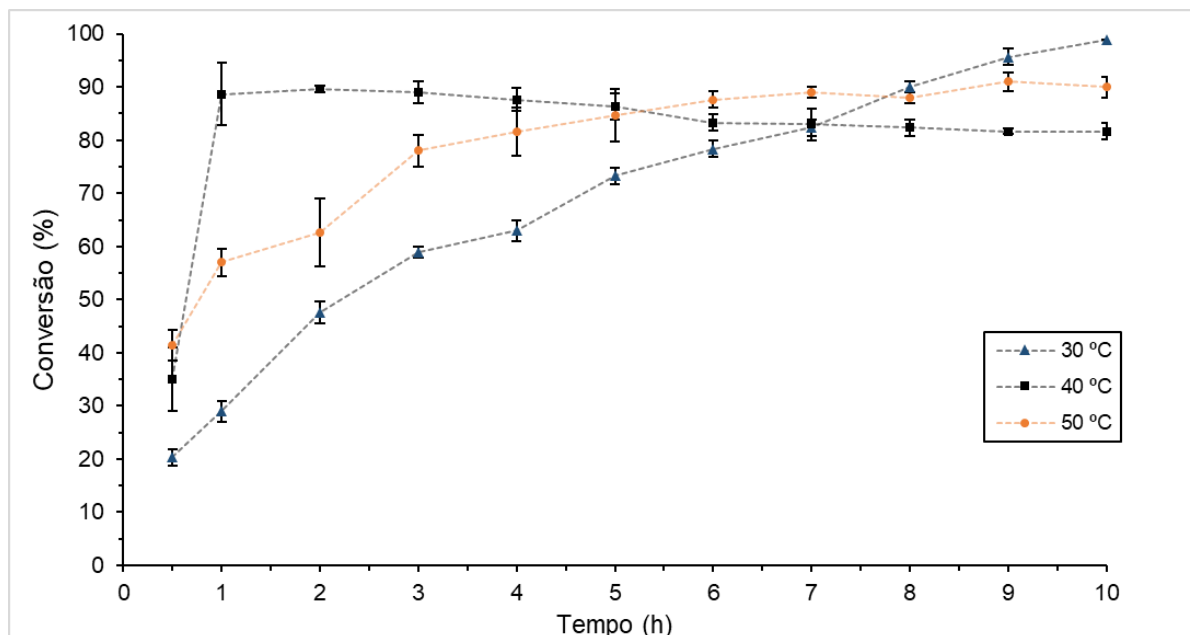
Figura 30 – Espectro de massas obtido por GC-MS da amostra padrão de 1*H*-indol (a) e do 3-iodo-1*H*-indol (b), obtido como produto da reação de iodação empregando o sistema redox lacase/ABTS



Pela constatação de que apenas um único pico no cromatograma foi observado, e este sendo atribuído ao produto de interesse 3-iodo-1*H*-indol, assume-se que a reação ocorreu com conversão e seletividade superior a 99%.

Uma vez que foi observada a conversão completa do 1*H*-indol ao 3-iodo-1*H*-indol no tempo reacional de 48 h, buscou-se otimizar o tempo reacional. Assim, foram avaliadas as conversões ao longo do tempo nas temperaturas de 30 °C, 40 °C e 50 °C, e mantendo as demais condições reacionais (Figura 31). Os ensaios foram realizados em triplicata. Quando as reações foram realizadas nas temperaturas de 30 °C e 50 °C observou-se que a formação do 3-iodo-1*H*-indol ocorreu rapidamente nas 3 primeiras horas. Na temperatura de 30 °C foram necessárias 10 h para alcançar a conversão total. Já na temperatura de 50 °C observa-se que a conversão estabiliza entorno de 85% ± 3% após 6 h de reação, sendo que nas demais 4 horas não houve alteração. Quando a reação foi realizada na temperatura de 40 °C, observou-se um aumento rápido da conversão na primeira hora, chegando a 88 ± 6% e permanecendo estável nas 5 primeiras horas. Após, foi observado um pequeno decréscimo na conversão para 83% ± 2%, a qual se manteve nas demais análises até o tempo de total de 10 horas de reação.

Figura 31 – Efeito do tempo reacional na conversão do 1*H*-indol ao 3-iodo-1*H*-indol nas temperaturas de 30 °C, 40 °C e 50 °C, empregando o sistema redox lacase/ABTS e iodeto de potássio como fonte de iodo.

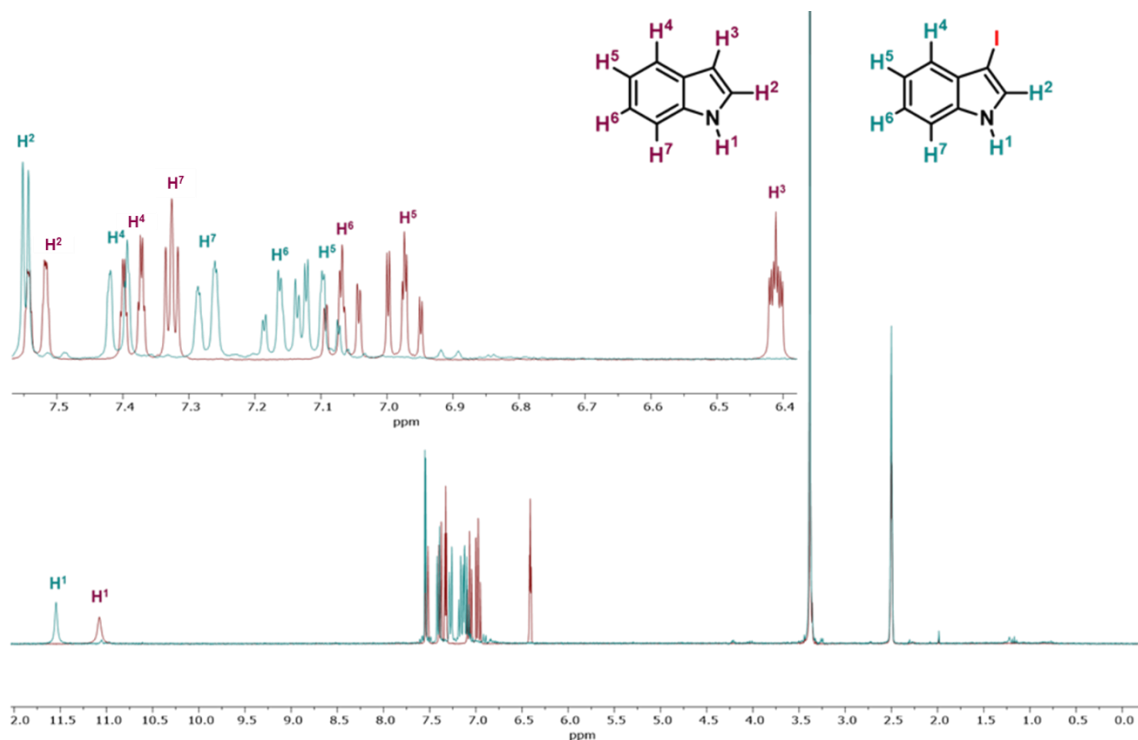


Fonte: o autor (2021).

Assim, considerando a temperatura de 30 °C e o tempo reacional de 10 h como ideal para atingir a conversão e seletividade >99%, foi analisado por ressonância magnética nuclear RMN de ^1H e ^{13}C no bruto de uma das reações, sem purificação prévia, para confirmar a conversão e seletividade observadas por GC-MS.

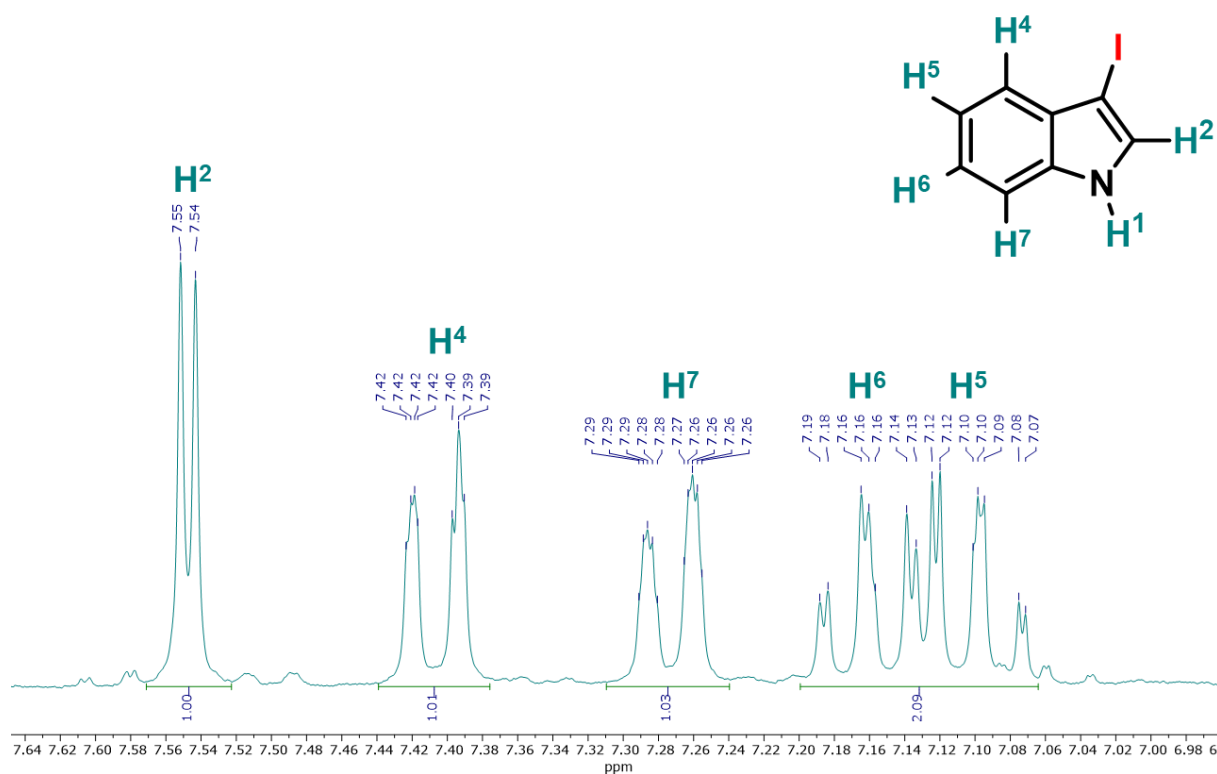
A Figura 32 representa a sobreposição dos espectros de RMN de ^1H do substrato 1*H*-indol (espectro em vermelho) e do bruto da reação contendo o produto 3-iodo-1*H*-indol (espectro em azul). Na sobreposição dos espectros é possível observar que o desaparecimento do sinal em $\delta = 6,43$ ppm, o qual é referente ao hidrogênio H^3 do 1*H*-indol, indicando a conversão do 1*H*-indol ao respectivo produto iodado.

Figura 32 – Sobreposição dos espectros de RMN de ^1H do $1H$ -indol em vermelho, e do 3-iodo- $1H$ -indol em verde (a), expansão do espectro da sobreposição dos RMN de ^1H

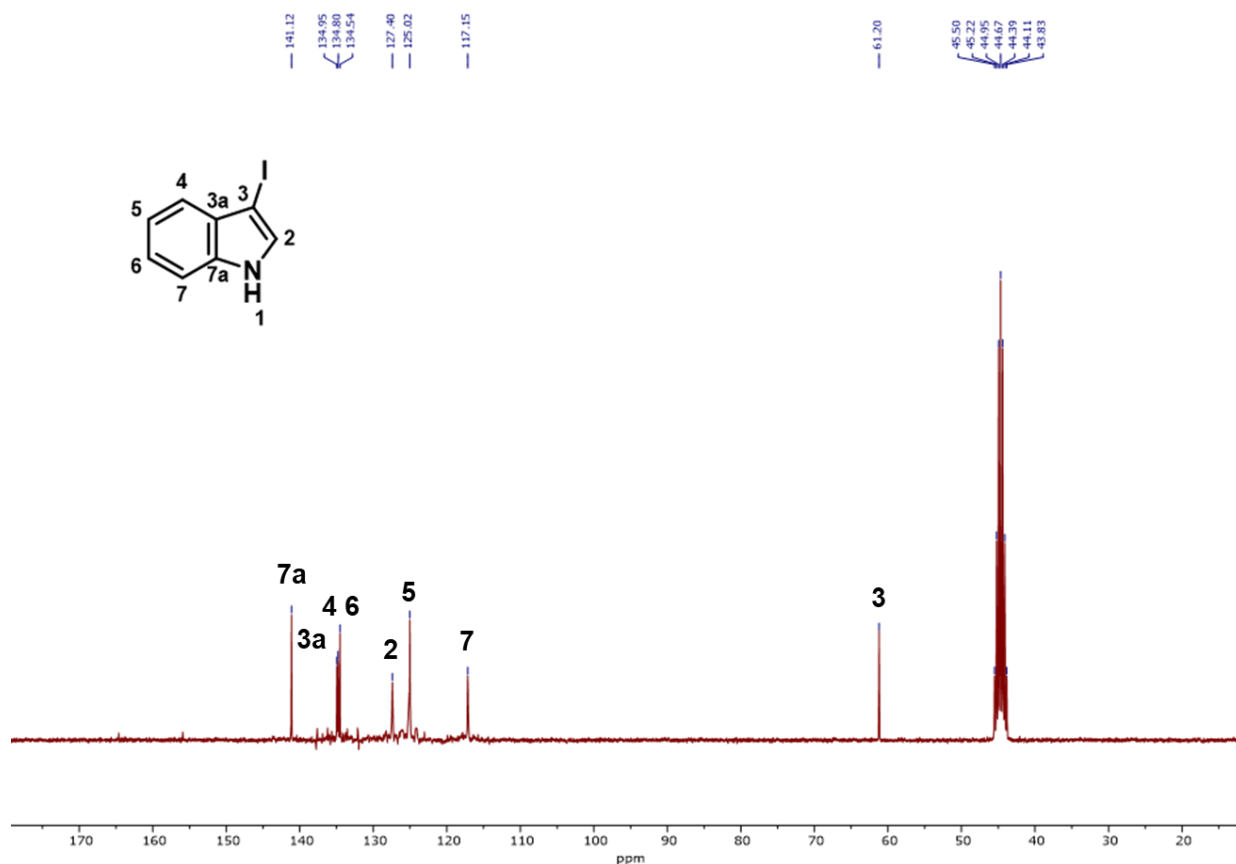


Ainda, no espectro do 3-iodo- $1H$ -indol, pode ser observado em $\delta = 11,56$ ppm o singlete referente ao hidrogênio ligado ao nitrogênio do núcleo indólico, o qual difere do singlete em $\delta = 11,00$ ppm referente ao hidrogênio ligado ao nitrogênio no $1H$ -indol. Na Figura 33 é apresentada a ampliação do espectro de ^1H na região de $6,97 - 7,64$ ppm. Observa-se um dubleto em $\delta = 7,55$ ppm atribuído ao H² e com constante de acoplamento 3J (H²-H¹) de 2,51 Hz. Entre $7,42 - 7,39$ ppm encontra-se um dubleto aparente com desdobramento referente ao H⁴ com uma constante de acoplamento 3J (H⁴-H⁵) de 7,6 Hz. Localizado em $7,29 - 7,26$ observa-se outro dubleto aparente atribuído ao H⁷ e com constante de acoplamento de 3J (H⁷-H⁶) de 7,8 Hz. Por fim, na região de $7,19 - 7,07$ ppm nota-se um multipletto atribuído aos H⁵ e H⁶.

Figura 33 – Expansão do RMN de ^1H do 3-iodo-1*H*-indol na região entre 6,67 até 7,64 ppm.



Com relação ao espectro de RMN de ^{13}C do 3-iodo-1*H*-indol (Figura 34), é possível observar os 8 sinais esperados. O sinal mais evidente encontra-se em $\delta = 61,20$ ppm representando o carbono 3 ligado ao iodo.

Figura 34 – Espectro de RMN de ^{13}C do 3-iodo-1*H*-indol

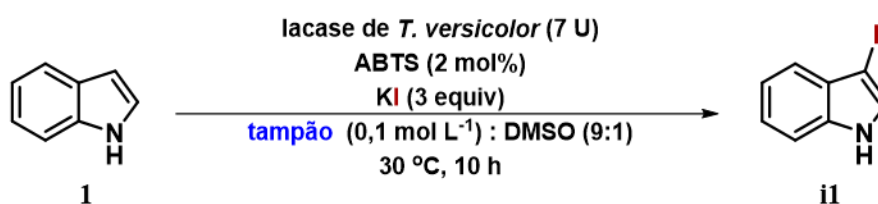
4.1.1 Efeito da solução tampão e pH na conversão do 1*H*-indol

Após o tempo e a temperatura reacional serem estabelecidos em 10 horas e 30 °C, foi avaliada a influência da natureza da solução tampão bem como o pH do meio reacional. As soluções tampão utilizadas foram de acetato (pH 3,6; 5,0; 5,6), fosfato (pH 5,8; 7,4) e citrato (pH 3; 5; 6,5) todas na concentração de 0,1 mol L⁻¹. Como observado na Tabela 1, quando foi utilizado o tampão acetato de sódio com valores de pH de 3,6 e 5 (Tabela 1, entradas 1 e 2) a conversão bem como a seletividade se mantiveram com valores >99%. No entanto, quando a solução tampão acetato com pH de 5,6 foi utilizada foi observado um decréscimo na conversão, chegando a apenas 74% após o tempo reacional de 10 h (entrada 3). No entanto, a seletividade ao produto **ii** se manteve >99%. O tampão citrato, com pH 3,0, também se apresentou como um meio adequado para a reação, mantendo a excelente conversão e seletividade >99% (entrada 4). Porém, o uso da solução tampão citrato com valores de pH de 5,0 e 6,2 levou a um decréscimo na conversão ao 3-iodo-1*H*-indol, com os valores de 83% e 67%, respectivamente (entradas 5 e 6).

Já o uso da solução tampão fosfato não se mostrou tão adequada. Quando a solução tampão fosfato com pH de 5,8 foi empregada foi observada uma conversão de 88% para o produto (entrada 7). Já quando o tampão fosfato, com pH de 7,4, foi empregado, nenhuma conversão foi detectada (entrada 8).

Quando apenas água foi utilizada no lugar das soluções tampão foi observado que não houve nenhuma formação do produto **i1** (entrada 9). A análise por GC-MS revelou apenas a presença do substrato **1**. Sendo assim, é evidente que, para melhor atividade da lacase de *T. versicolor* na iodo-funcionalização do 1*H*-indol, são necessários faixas de pH levemente ácidos. Quando se tratando da solução tampão, as soluções tampão citrato (pH 3,0) e acetato de sódio (pH 3,6 e 5,0) se destacam. O tampão acetato de sódio (pH 5,0) foi a solução tampão escolhida para a continuidade dos estudos de otimização reacional.

Tabela 1 – Influência da natureza da solução tampão bem como do respectivo pH na conversão do 1*H*-indol ao 3-iodo-1*H*-indol.^a



Entrada	Solução tampão	pH	Conv. (%) ^b	Sel. (%) ^b
1	Acetato	3,6	>99	>99
2	Acetato	5,0	>99	>99
3	Acetato	5,6	74	>99
4	Citrato	3,0	>99	>99
5	Citrato	5,0	83	>99
6	Citrato	6,2	67	>99
7	Fosfato	5,8	88	>99
8	Fosfato	7,4	0	0 ^d
9^c	—	7,0	0	0 ^d

^a Condições reacionais: 0,1 mmol de 1*H*-indol (0,012 g), 0,3 mmol de KI (0,05 g), 2 mol% de ABTS (1 mg), 7 U de lacase de *T. versicolor* (8 mg), 5 mL de solução tampão, 0,5 mL de DMSO. ^b A conversão e a seletividade foram determinadas por GC-MS. ^c Apenas água foi empregada como solvente. ^d apenas o substrato 1*H*-indol foi observado.

4.1.2 Efeito da variação de KI, ABTS, solução tampão e lacase na conversão da reação

Antes de avaliar a influência das quantidades dos componentes envolvidos na iodofuncionalização do 1*H*-indol, foram realizados experimentos controles para compreender o papel de cada componente (Figura 35).

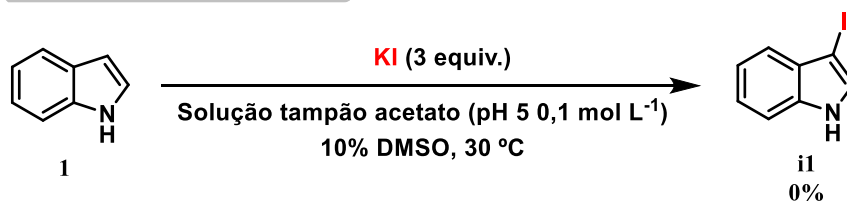
Inicialmente, a reação foi realizada na ausência da lacase e do mediador redox ABTS e assim observar se somente o KI poderia fornecer o iodo ao 1*H*-indol. Uma característica visual observada ao longo da reação é o desenvolvimento de uma coloração castanho escuro, característica da presença do ânion triiodeto (I_3^-) que é formado quando iodo molecular (I_2) está na presença de um excesso de iodeto. Como esperado, na ausência da lacase e do ABTS não houve o desenvolvimento desta coloração e, após 10 h de reação, não foi detectado o produto **i1** ou qualquer outro produto, apenas a presença do substrato 1*H*-indol.

Um experimento controle realizado na ausência do mediador redox também revelou que o produto **i1** não é formado. Da mesma forma como o experimento anterior, o substrato 1*H*-indol não sofreu nenhuma transformação de acordo com a análise por GC-MS.

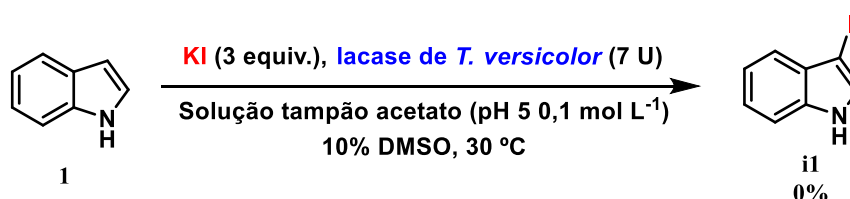
Na ausência da lacase também não houve a formação do produto **i1**, assim, como na ausência da fonte de iodo, o KI. O experimento controle na ausência do KI foi realizado para observar a possível formação de produtos diméricos ou triméricos do 1*H*-indol. Esses produtos trimerizados foram observados por Ganachaud *et al.* (2008) e por Azimi, Nafissi-Varcheh e Mogharabi (2016). No entanto, diferente dos estudos reportados, não foram observados nenhum tipo de produtos de oligomerização.

Figura 35 – Esquemas reacionais representando os experimentos controle para avaliar a dependência de cada um dos componentes reacionais na síntese do 3-iodo-1*H*-indol.

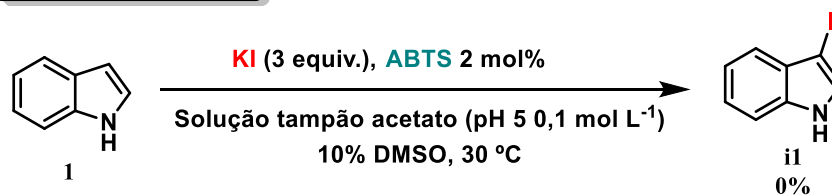
(a) Ausência da lacase e ABTS



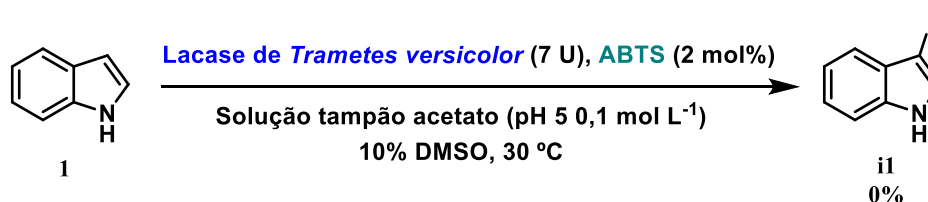
(b) Ausência de ABTS



(c) Ausência de lacase



(d) Ausência de KI



Após demonstrado que todos os componentes da reação são necessários para a obtenção do 3-iodo-1*H*-indol e que não foi observado a formação de nenhum outro produto, iniciou-se o estudo de otimização das condições reacionais buscando a redução das quantidades dos reagentes envolvidos. Inicialmente, foi avaliada a redução na quantidade de KI, sendo avaliados 3,0, 2,0, 1,5 e 1,0 equivalentes em relação ao substrato 1*H*-indol (Tabela 2, entradas 1, 2, 3 e 4). A partir das conversões obtidas, percebe-se que apenas quando são utilizados 3 equivalentes do iodeto de potássio é que se obtêm uma conversão >99% no tempo reacional de 10 h. Quando 2,0 equivalentes de KI foi empregado houve uma pequena redução na conversão, e o produto 2 foi obtido com 93% de conversão. Quando empregados 1,5 equivalentes a conversão chegou à

75%., e com 1,0 equivalente apenas 46% de conversão foi alcançada.

Assim, fixando a quantidade de KI em 3,0 equivalentes foi avaliado a quantidade do mediador redox, o ABTS. Ao reduzir a quantidade inicial de 2 mol% (entrada 1) para 1 mol% (entrada 5) foi observado um pequeno decréscimo na conversão, passando de >99% para 95%. Já quando foi utilizado a quantidade de 0,5 mol% (entrada 6) também se observa um pequeno decréscimo, em que o produto da iodo-funcionalização foi obtido com 92% de conversão.

Considerando os valores de conversão manteve-se a quantidade de ABTS em 2 mol%. Ao avaliar a influência da quantidade da lacase observou-se que, ao reduzir a quantidade de 7 U para 5 U é observada uma redução de 7% na conversão (entrada 7). O decréscimo na conversão também é observado ao reduzir a quantidade da lacase para 4 U e 2 U, sendo observado as conversões de 90% e 86%, respectivamente (entradas 8 e 9). A redução da conversão já era esperada, porém não foi observado uma redução significativa. Então, para o tempo reacional de 10 h, foi estabelecido as quantidades ideais de lacase e ABTS como 7 U e 2 mol%, respectivamente.

Por fim, reduziu-se a quantidade empregada de solvente, tampão acetato de sódio (pH 5,0; 0,1 mol L⁻¹) (entradas 10 e 11). Nestes experimento ficou evidente que a concentração final no meio reacional exerce uma forte influência na conversão. Ao reduzir pela metade a quantidade do solvente reacional, e assim duplicar a concentração final, houve um decréscimo de 35% na conversão, e o produto **11** foi obtido com 65% de conversão (entrada 11). Ao reduzir ainda mais o volume do solvente reacional (1 mL) o produto foi obtido com apenas 57% de conversão no tempo reacional de 10 h.

Tendo em vista o efeito das variações de quantidades utilizadas na reação, observou-se que o melhor desempenho foi quando utilizado 0,1 mmol de 1*H*-indol, 3 equivalentes de iodeto de potássio, 2 mol% de ABTS, 7 unidades de lacase de *T. versicolor* e 5 mL de solução tampão acetato pH 5 0,1 mol L⁻¹ (Tabela 2, entrada 1) a qual obteve-se conversão total do 1*H*-indol para o 3-iodo-1*H*-indol, além disso, não foi observado nenhum subproduto na reação.

Tabela 2 – Influência das variações de quantidades de KI, ABTS, solução tampão e lacase de *T. versicolor* empregados na reação para a conversão do 1*H*-indol ao 3-iodo-1*H*-indol

$\text{KI, lacase de } \textit{Trametes Versicolor}, \text{ ABTS}$
 $\text{Solução tampão acetato (pH 5 } 0,1 \text{ mol L}^{-1}\text{)}$
 $10\% \text{ DMSO, } 30 \text{ }^\circ\text{C}$

Entrada	KI (equiv)	ABTS (mol%)	Solução Tampão (mL)	Lacase de <i>T. Versicolor</i> (U)	Conv. (%) ^b
1	3	2	5	7	>99
2	2	2	5	7	93
3	1,5	2	5	7	75
4	1	2	5	7	46
5	3	1	5	7	95
6	3	0,5	5	7	92
7	3	2	5	5	93
8	3	2	5	4	90
9	3	2	5	2	86
10	3	2	2,5	7	65
11	3	2	1	7	57

^a Condições reacionais: 0,1 mmol de 1*H*-indol (0,012 g), 3 mmol de KI (0,05 g), 2 mol% de ABTS (1 mg), 7 U de lacase de *T. versicolor* (8 mg), 5 mL de solução tampão acetato 0,1 mol.L⁻¹ pH 5, 0,5 mL de cossolvente. ^b Obtido por meio de GC-MS, em todos os experimentos foi observada seletividade >99%.

4.1.3 Efeito da variação de cossolventes na conversão da reação

Buscando por uma alternativa ao uso do cossolvente DMSO foram avaliados outros solventes orgânicos bem como a necessidade de um cossolvente orgânico na reação. Como observado na Tabela 3 (entrada 1), quando a reação foi realizada em um solvente constituído apenas da solução tampão observa-se um decréscimo na conversão, e o produto da iodo-funcionalização foi obtido com 60% de conversão.

Em vista da importância da presença do cossolvente orgânico na reação, foram avaliados os polares apróticos acetonitrila, DMF, éter dietílico, metil isobutil cetona e o acetato de etila, os solventes polares próticos isopropanol, etanol, isobutanol, álcool isoamílico e o tolueno,

considerado apolar. Interessantemente, exceto nos solventes alcoólicos, observou-se que o produto 3-iodo-1*H*-indol foi obtido com completa conversão e seletividade (> 99%). Quando empregado o acetato de etila foi observado a degradação do 3-iodo-1*H*-indol.

Assim, o éter etílico foi escolhido como o melhor cossolvente, por ser um solvente de fácil remoção, e também por ser o solvente geralmente empregado nas etapas de extração. Além disso, o éter dietílico é facilmente evaporado, diferente de solventes como DMSO e DMF, ademais, pela utilização do éter dietílico a reação pode ser facilmente extraída pelo fato dela se tornar bifásica.

Tabela 3 – Influência da variação de cossolventes empregados na reação para avaliação de conversão do 1*H*-indol para o 3-iodo-1*H*-indol

Entrada	Cossolvente	Conv. (%) ^b
1	—	60
2	DMSO	>99
3	MeCN	>99
4	Tolueno	>99
5	EtOAc	>99
6	DMF	>99
7	<i>i</i> -PrOH	67
8	EtOH	64
9	Álcool isobutílico	73
10	Álcool isoamílico	68
11	Metil isobutil cetona	>99
12	Éter dietílico	>99

^a Condições reacionais: 0,1 mmol de 1*H*-indol (0,012 g), 3 mmol de KI (0,05 g), 2 mol% de ABTS (1 mg), 7 U de lacase de *Trametes Versicolor* (8 mg), 5 mL de solução tampão acetato 0,1 mol.L⁻¹ pH 5, 0,5 mL de cossolvente. ^b Obtido por meio de GC-MS, em todos os experimentos foi observada seletividade >99%.

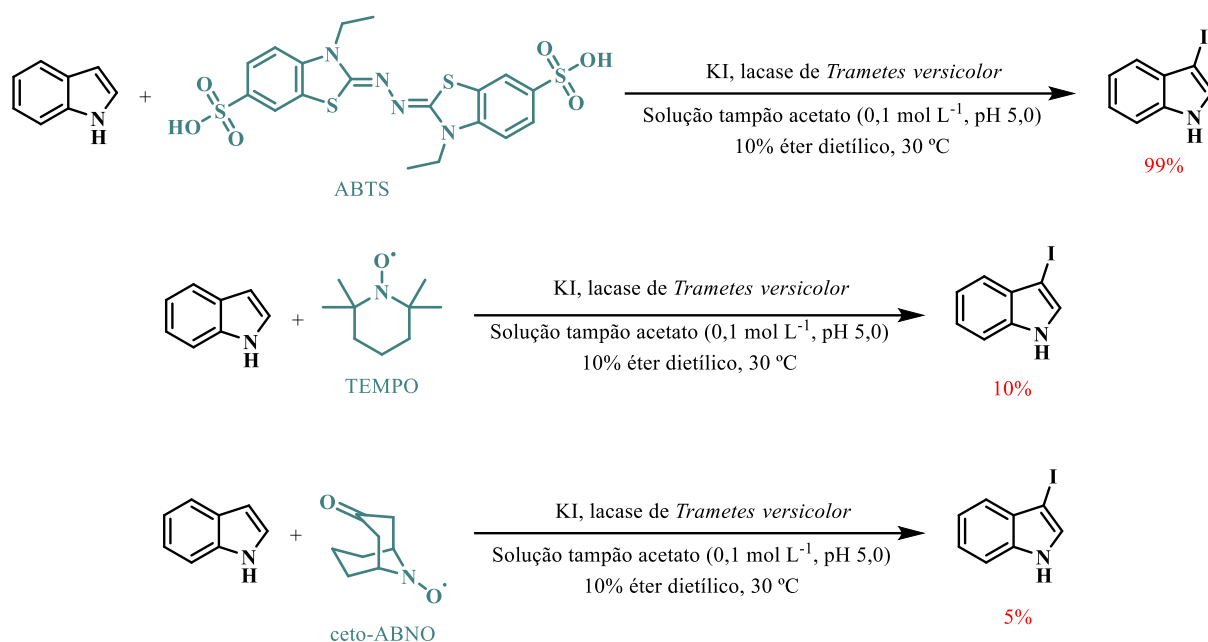
Haber e colaboradores (2000) já relataram o uso de diferentes cossolventes quando utilizado lacases provenientes de fungos, demonstrando que, ao serem utilizados solventes como DMSO e acetonitrila, a perda de atividade fora quase nula. Apesar dos autores não terem utilizados a enzima de *T. versicolor* ficou evidente a mesma característica, também pode-se notar que a gama de solventes que podem ser utilizados em reações envolvendo essa enzima é

grande. (Rodakiewicz-Nowak et al., 2000)

4.1.4 Efeito do mediador redox na conversão da reação

O mediador utilizado na reação também foi avaliado, para isso, foram utilizados ABTS, um mediador de transferência de elétrons, TEMPO e ceto-ABNO, mediadores de oxidação iônica. Os rendimentos quando utilizados TEMPO e ceto-ABNO foram significativamente reduzidos, obtendo-se conversões de apenas 10% e 5% respectivamente (Figura 36). Já foi relatado na literatura esse comportamento, Feng Xu (1996) demonstrou que o mediador redox ABTS é extremamente eficiente e rápido para a oxidação do ânion iodeto (Xu, 1996). Sdahl e colaboradores (2019) ao otimizarem a reação de iodação da vanilina também relataram o mesmo comportamento de redução drástica de conversão quando foi utilizado TEMPO e derivados em frente ao ABTS.

Figura 36 – Efeito da variação de mediadores na reação de iodo funcionalização do 1*H*-indol

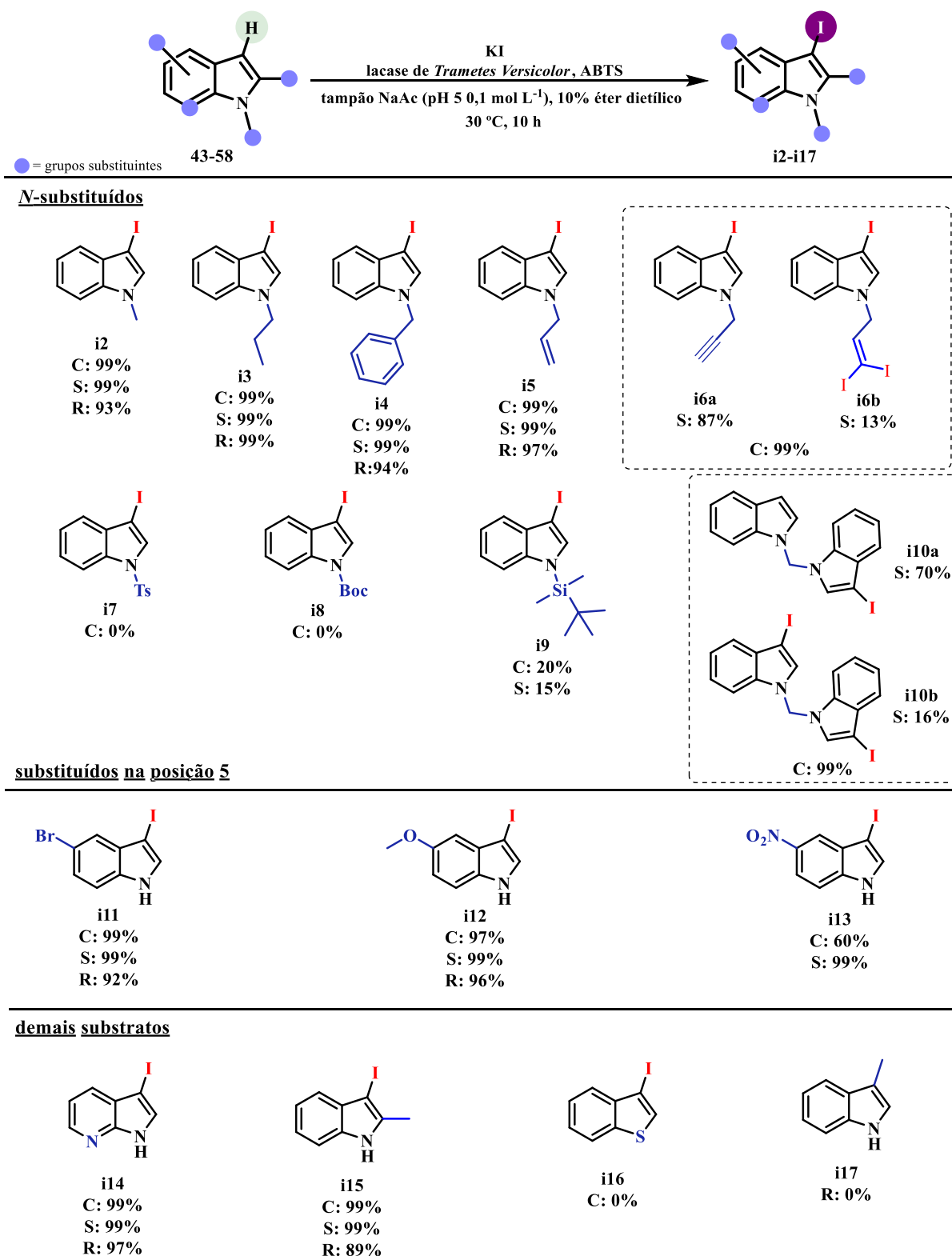


Com as condições otimizadas, a escala da iodo-funcionalização do indol foi aumentada 10 vezes. Assim, para 1,0 mmol de substrato (0,117 g) foram empregados 3,0 mmol de iodeto de potássio (0,498 g), 2 mol% de ABTS (0,011 g) e 70 U de lacase de *T. versicolor* (80 mg). Mantendo a proporção, foram empregados 50 mL de solvente, sendo 45 mL da solução tampão acetato (0,1 mol L⁻¹, pH 5) e 5 mL de éter dietílico. Com o aumento de escala foi observado a manutenção da conversão e seletividade após o tempo reacional de 10 h, e o produto **11** foi obtido em um rendimento isolado de 99% (0,234 g).

O contraponto observado é a baixa concentração em que a reação ocorre, sendo apenas 0,02 mol L⁻¹ com relação ao substrato 1*H*-indol. Neste sentido, experimentos adicionais buscando o aumento da concentração poderiam ser explorados, considerando a possibilidade de aumentar o tempo reacional, alterar a proporção da mistura solução tampão/ cossolvente e até o mesmo o efeito do tipo de solução tampão.

4.2 IODO-FUNCIONALIZAÇÃO DE DERIVADOS DO 1*H*-INDOL

Visando avaliar o efeito da variabilidade estrutural dos indóis na reação de iodo-funcionalização foram empregados substratos *N*-substituídos como o 1-metil-1*H*-indol (**43**), 1-prop-1*H*-indol (**44**), 1-benzil-1*H*-indol (**45**), 1-alil-1*H*-indol (**46**), 1-propargil-1*H*-indol (**47**). Também foram avaliados os grupos retiradores de elétrons tosila, *terc*-butiloxicarbonila (boc) e *tert*-butil-metil silil a fim de avaliar a redução na nucleofilicidade do carbono na posição C3. Assim foram empregados os substratos 1-tosil-1*H*-indol (**48**), 1-boc-1*H*-indol (**49**), 1-*tert*-butildimetilsilil-1*H*-indol (**50**). O dímero do 1*H*-indol, o di(1*H*-indol-1-il)metano (**51**). O efeito de grupos substituintes no anel benzênico também foi avaliado com os substratos 5-bromo-1*H*-indol (**52**), 5-metoxi-1*H*-indol (**53**) e 5-nitro-1*H*-indol (**54**), bem como o substrato 7-azaindol (**55**). Por fim, os substratos 2-metil-1*H*-indol (**56**), tianafteno (**57**) e 3-metil-1*H*-indol (**58**) também foram submetidos a iodo-funcionalização (Tabela 4).

Tabela 4 – Reação de iodação de derivados do 1*H*-indol utilizando o sistema redox lacase/ABTS^a

^a Condições reacionais: 0,1 mmol de substrato, 0,3 mmol de KI (0,05 g), 2 mol% de ABTS (1 mg), 7 U de lacase de *T. versicolor* (8 mg), 5 mL de tampão NaAc 0,1 mol L⁻¹ pH 5, 0,5 mL de éter dietílico, 10 horas. Conversão e seletividade obtida por meio de GC-MS. Rendimento obtidos pelo produto isolado por coluna cromatográfica.

Assim como o 1*H*-indol (**1**), os substratos *N*-substituídos **43**, **44**, **45** e **46** apresentaram excelente desempenho frente a reação de iodo-funcionalização sendo obtidos com conversão e seletividade >99%. Os respectivos produtos também foram facilmente isolados do bruto da reação, sendo obtidos com rendimentos superiores a 93%. Já o substrato **47**, substituído no nitrogênio com o grupo propargila apresentou uma seletividade de 87% para o produto de interesse **i6**. Além da iodação na posição C3, observou-se pela análise por espectrometria de massas (GC-MS) a presença de mais um produto iodado, um tri-iodado.

Já os substratos *N*-protegidos com os grupos retiradores de elétrons tosila (**48**) e *tert*-butiloxicarbonila (**49**), não apresentaram nenhuma conversão. No caso do 1-boc-1*H*-indol (**49**), observou-se que o meio levemente ácido (pH 5,0) em que ocorre a reação foi suficiente para a clivagem do grupo *tert*-butiloxicarbonila. A análise por GC-MS mostrou a presença do 1*H*-indol e também a presença do 3-iodo-1*H*-indol. Quando utilizado o substrato com o grupo retirador *tert*-butildimetilsilil (**50**), foi possível observar a conversão para o produto iodado e para o 3-iodo-1*H*-indol, nesse caso, assim como no substrato **49** protegido com o grupo retirador boc, ocorreu a clivagem da ligação.

Grupos retiradores de elétrons ligados ao nitrogênio indólico diminuem a densidade eletrônica no sistema conjugado- π que envolve o par de elétrons não ligante no átomo de nitrogênio e o par de elétrons presentes na ligação π entre os carbonos C2 e C3. Como é comumente observado, indóis *N*-substituídos com estes grupos não são substratos adequados quando se deseja o ataque nucleofílico na posição C3. Mesmo quando substrato 1-tosil-1*H*-indol (**48**) foi submetido a reação na temperatura de 50 °C não se observou a presença do produto.

Quando o substrato di(1*H*-indol-1-il)metano (**51**) foi submetido a reação de iodo-funcionalização, detectou-se dois produtos, o monoiodado e di-iodado, com uma conversão de 99%, com uma seletividade de 70% para o produto monoiodado e de 16% para o di-iodado.

Considerando o efeito dos grupos substituintes no anel benzênico, tanto a presença do bromo como do grupo metoxila não desfavoreceram a conversão e seletividade significativamente. O substrato 5-bromo-1*H*-indol (**52**) foi convertido ao respectivo 5-bromo-3-iodo-1*H*-indol (**i11**) com 99% de conversão e seletividade, e obtido com 92% de rendimento. Já o 5-metóxi-1*H*-indol (**53**) foi convertido ao respectivo 5-metoxi-3-iodo-1*H*-indol (**i12**) com 97% de conversão, 99% de seletividade, e obtido com 96% de rendimento.

No caso do 5-nitro-1*H*-indol (**54**), o efeito retirador de elétrons do grupo nitro levou a uma redução na conversão. O produto 5-nitro-3-iodo-1*H*-indol (**i13**) foi obtido com 60%.

O 7-azaindol (**55**) também se mostrou um excelente substrato para a reação de iodofuncionalização. O produto 3-iodo-7-azaindol (**i14**, 3-iodo-1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridina) foi obtido com conversão e seletividade >99% e rendimento de 97%.

Quando o 2-metil-1*H*-indol (**56**) foi empregado como substrato, a análise por GC-MS mostrou que o 2-metil-1*H*-indol havia sido totalmente convertido ao produto iodado **i15**. Porém, este produto mostrou-se bastante instável e rápida degradação. Tentativas de proteger o extrato bruto da luz e da temperatura não foi suficiente para manter o produto íntegro e assim obter a caracterização por RMN. Na literatura, foi encontrado apenas um relato para o produto **i15** com a devida caracterização por RMN. No entanto, não há nenhuma discussão sobre a sua estabilidade (Sun et al., 2018).

O substrato escatol (**57**, 3-metil-1*H*-indol), também foi avaliado com substrato, buscando uma possível iodação na posição C2. No entanto, nas condições reacionais estabelecidas não foi observado a conversão.

Como complemento, foi também avaliado a iodofuncionalização do benzotiofeno (**58**). Porém, nas condições reacionais estabelecidas não foi observado a conversão para este substrato.

Com os resultados obtidos, a iodofuncionalização promovida pelo sistema lacase-ABTS permite abranger uma gama de indóis como substratos, com exceção daqueles com grupos retiradores de elétrons ligados ao nitrogênio. Rendimentos considerados bons a excelentes foram obtidos, mantendo-se sempre uma excelente seletividade. Considerando a natureza dos grupos funcionais, observa-se que no caso da ligação tripla houve a iodação, o que propicia a investigação da iodação para substratos alquinílicos.

Outros compostos indólicos contendo a posição C3 livre estão disponíveis comercialmente para a possível iodação. Porém, o alto custo destes compostos inviabilizou a aquisição e seu estudo no escopo reacional.

4.3 INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO REACIONAL

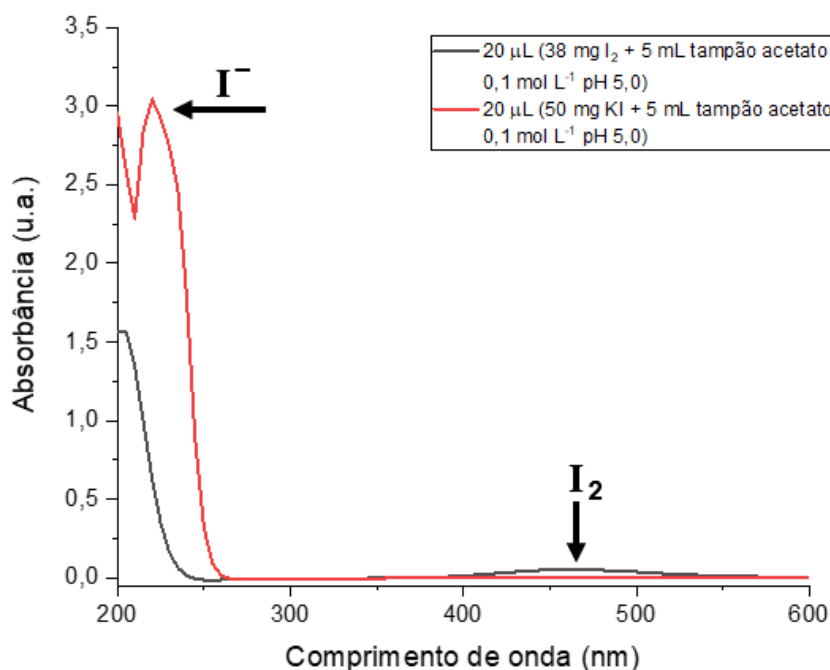
Para a proposta do mecanismo envolvido na iodo-funcionalização do 1*H*-indol biocatalisada pelo sistema lacase-ABTS foram considerados os experimentos controles já relatados (Figura 35), além dos experimentos utilizando espectrofotometria de UV-VIS e espectrometria de massas de alta resolução.

Inicialmente, para identificar a formação de derivados do iodo, foram feitas varreduras

espectrofotométricas (600 – 200 nm) de soluções contendo apenas o ânion Γ e apenas I_2 (Figura 37). Primeiro, a análise de uma solução aquosa contendo apenas KI ($0,06 \text{ mol L}^{-1}$), mostrou um máximo de absorção em 220 nm o qual é típica para o ânion Γ (Kireev and Shnyrev, 2015).

Em seguida, a varredura espectrofotométrica para uma solução de I_2 com a concentração de $0,03 \text{ mol L}^{-1}$, o que corresponde à metade da concentração de Γ empregada na reação, apresentou o máximo de absorção em 465 nm, o qual é correspondente a absorção do I_2 (Brotherton et al., 2012).

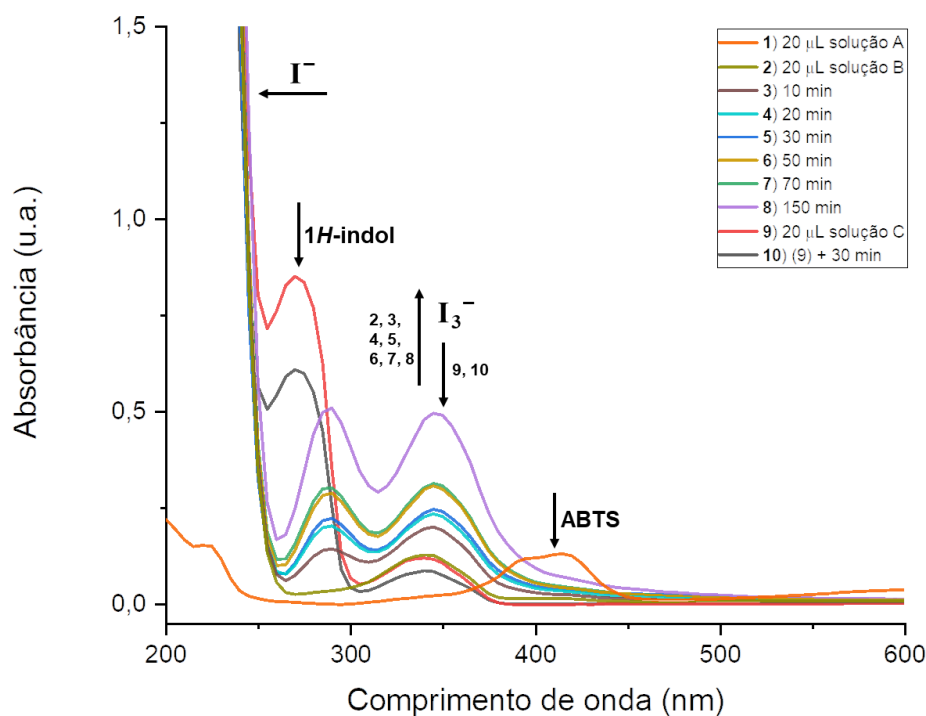
Figura 37 – Espectro de varredura de comprimento de onda do iodeto de potássio em solução obtido por espectrofotometria de UV-VIS



Após confirmada a absorbância máxima do íon Γ e do I_2 , foram realizados uma sequencia de experimentos para entender a formação do ânion triiodeto (I_3^-). A Figura 38 demonstra a sobreposição dos espectros de UV-VIS. No experimento **1** foi possível observar apenas uma banda, referente absorção na região do ABTS oxidado pela lacase, quando adicionado iodeto de potássio, experimento **2**, nota-se que já há a formação do I_3^- , com duas bandas com absorbância em 290 nm e 345 nm, e Γ no meio reacional e o decréscimo da banda referente ao ABTS. É demonstrado também nas reações **3**, **4**, **5**, **6**, **7** e **8**, com o passar do tempo há o aumento da concentração de I_3^- . Quando adicionado o 1H-indol na reação contendo I_3^- , **9**, é observado a diminuição dos sinais em 290 nm e 345 nm, simbolizando a diminuição da concentração de I_3^- , após 30 minutos, fora retirada outra alíquota dessa reação, **10**, e observa-

se que além do comportamento de decréscimo nos sinais em 290 nm e 345 nm referentes ao triiodeto, foi também demonstrado esse mesmo comportamento na banda referente ao 1*H*-indol, em 270 nm, sugerindo seu consumo.

Figura 38 – Sobreposição de gráficos referentes a varreduras no espectrofotômetro de UV-VIS para a observação da formação e consumo de triiodeto

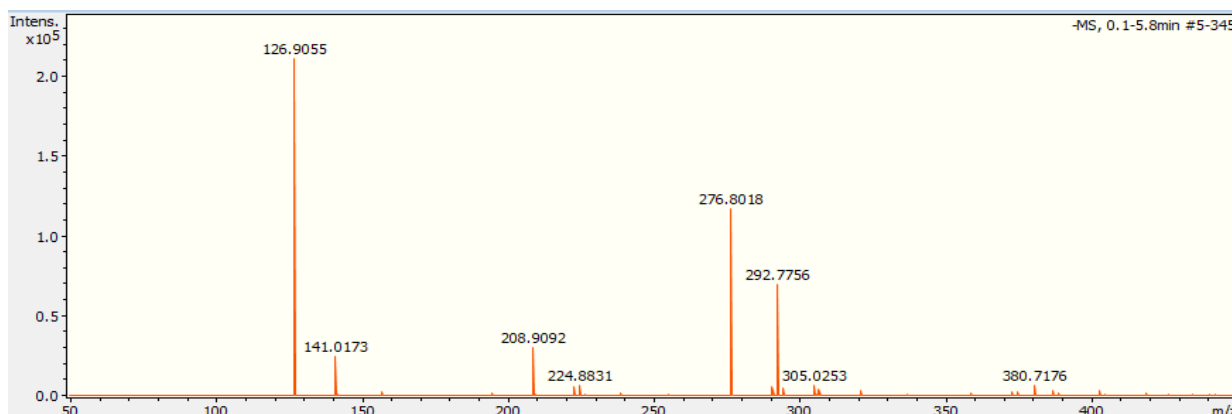


Solução A – 1 mg de ABTS, 4 mg lacase de *T. versicolor* em 5 mL de solução tampão de acetato pH 5 0,1 mol L⁻¹.
 Solução B – 1 mg de ABTS, 4 mg lacase de *T. versicolor*, 50 mg de KI em 5 mL de solução tampão de acetato pH 5 0,1 mol L⁻¹.
 Solução C – 1 mg de ABTS, 4 mg lacase de *T. versicolor*, 50 mg de KI, 12 mg de 1*H*-indol em 5 mL de solução tampão de acetato pH 5 0,1 mol L⁻¹.

Além da informação obtida por espectroscopia de absorção no UV-Vis a presença do triiodeto também foi acompanhada por espectrometria de massas da alta resolução, empregando uma fonte de ionização tipo ESI e detecção de íon no modo negativo.

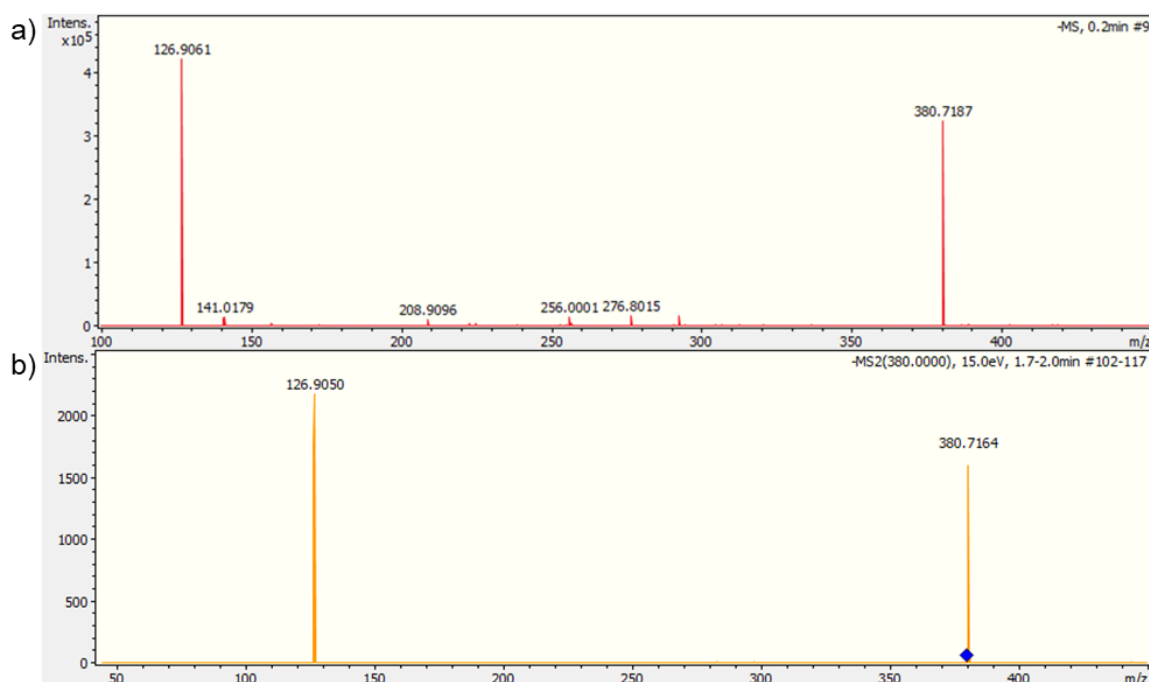
Inicialmente um experimento controle contendo apenas o KI em solução contendo o tampão acetato foi injetada na fonte com o objetivo de observar a possível formação do I₃⁻ na fonte de ionização. A massa 380,7176 *m/z*, a qual é atribuída para o I₃⁻ foi observada, porém, com uma intensidade pequena. O pico de maior intensidade foi referente ao íon I⁻, com a massa de 126,9055 *m/z*. Também foi observado os agregados com massa 208,9092 *m/z* (I⁻ + Na⁺ + CH₃CO₂⁻), *m/z* 224,8831 (I⁻ + K⁺ + CH₃CO₂⁻), *m/z* 276,8018 (I⁻ + Na⁺ + I⁻) e *m/z* 292,7756 (I⁻ + K⁺ + I⁻) (Figura 39).

Figura 39 – Espectro de massas referente ao KI solubilizado em solução tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ pH 5,0



Na sequência, foi então analisada uma alíquota da mistura reacional contendo KI, ABTS e lacase em solução tampão de acetato, nas mesmas condições reacionais estabelecidas previamente, porém, na ausência do 1*H*-indol. Como mostrado no espectro (Figura 40a) foi observada a *m/z* 126,9061, referente ao ânion Γ^- e um pico bastante intenso com *m/z* 380,7187 o qual foi atribuído ao ânion I_3^- . A massa exata (calculada) para o I_3^- é de 380,7134, confirmando assim a presença desta espécie no meio reacional. Ainda, a fragmentação do íon referente ao I_3^- resulta em um único fragmente com *m/z* 126,9050, que é atribuído ao íon Γ^- (Figura 40b); , tendo resultado o único fragmento referente ao íon Γ^- .

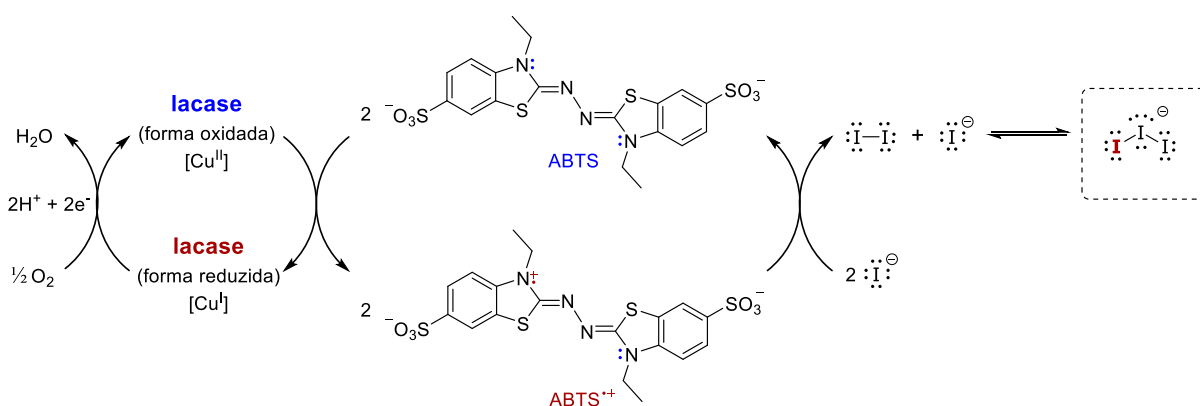
Figura 40 – a) Espectro de massas da reação contendo KI, ABTS e lacase em solução tampão de acetato 0,1 mol L⁻¹ pH 5,0. b) Espectro de fragmentação (MS2) do íon com *m/z* 380



Assim, considerando os experimentos controle discutidos previamente que mostram que a iodofuncionalização empregando o sal de iodo requer a presença da lacase e do ABTS, e dos experimentos espectrofotométricos e de espectrometria de massas que indicam a presença da espécie I_3^- , a seguinte proposta mecanística é apresentada:

O mediador redox ABTS, adicionado na forma reduzida, é oxidado pela lacase em um mecanismo de transferência de um elétron (SET). O ABTS oxidado, na forma de cátion radical, é responsável por oxidar o ânion iodeto, o qual foi adicionado na reação na forma de KI, ao I_3^- (Figura 41).

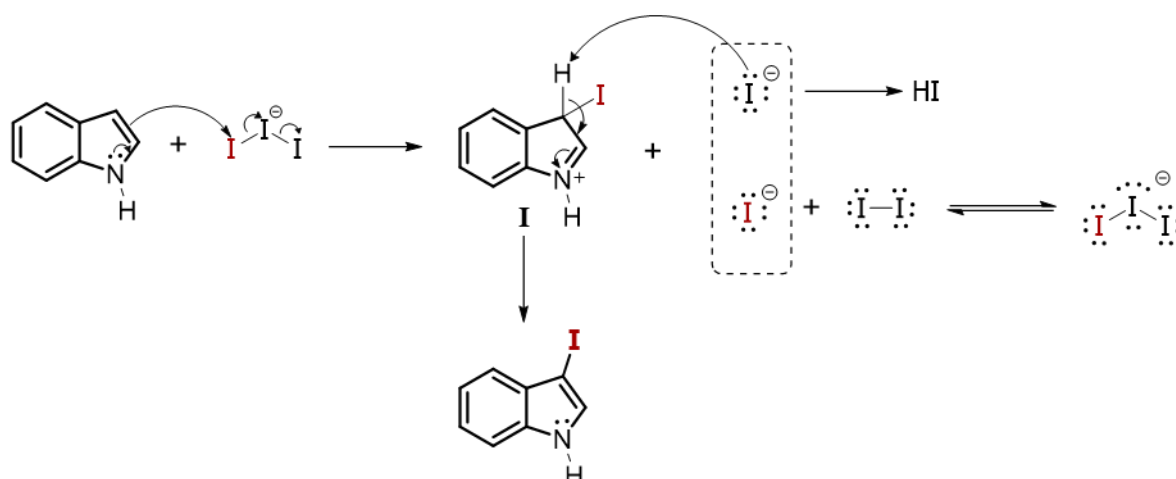
Figura 41 – Mecanismo reacional proposto para a formação de I_3^- pelo sistema redox lacase-ABTS



Enquanto o I^- é considerado uma base de Lewis, o ânion I_3^- é considerado um ácido de Lewis e, portanto, este atuaria como o eletrófilo na reação com o *1H*-indol. Nos indóis, em geral a posição C3 é a que possui o caráter mais nucleofílico e, portanto, a reação de substituição eletrofílica ocorre preferencialmente nesta posição.

Assim, o ataque da posição C3 ao átomo de iodo eletrofílico I_3^- acarreta a formação da ligação C3-I no intermediário **I**, e consequentemente a desproporção da espécie eletrofílica nos ânions iodeto. Um dos ânions iodetos atuaria como base, abstraindo o hidrogênio ligado ao C3, restaurando a aromaticidade do anel indólico, e assim, formando o produto. O HI formado é removido pela ação da solução tampão, enquanto o segundo ânion iodeto formado é incluído no equilíbrio iodo/iodeto para a formação de I_3^- (Figura 42).

Figura 42 – Mecanismo reacional proposto para a iodo-funcionalização do 1*H*-indol



A estratégia de gerar o ânion I_3^- e empregá-lo como espécie eletrofílica fonte de iodo foi também proposto para a obtenção de 5-iodo-1,2,3-triazóis substituídos na posição-1,4. Neste caso, o I_3^- foi gerado a partir da reação entre perclorato de cobre(II) $[Cu(ClO_4)_2]$ e iodeto de potássio, o qual gera o iodeto de cobre(II), decompondo-se em iodeto de cobre(I) e iodo molecular (I_2). Desta forma, tanto o catalisador de cobre, que é essencial para a reação de formação de triazóis via *Click chemistry* e a formação do agente eletrofílico de iodo é gerado *in situ*. A formação do I_3^- também foi observada pelo aparecimento da banda de absorção em 294 nm e 367 nm (ombro), empregando acetonitrila como solvente.

Assim, com os resultados obtidos no presente trabalho são demonstrados resultados promissores e concorrentes com os reportados na literatura, visto a eficiência das reações de iodo-funcionalização de indóis utilizando o sistema redox lacase-ABTS.

5 CONCLUSÕES

Nesse trabalho, foi demonstrada a viabilidade de uma metodologia de reações enzimáticas utilizando o sistema lacase-mediador redox para a preparação de compostos indólicos iodo-funcionalizados.

O sistema biocatalítico baseado na utilização da enzima lacase de *T. versicolor*, do mediador ABTS e do sal simples de iodo, iodeto de potássio, apresentou conversão, seletividade e rendimento excelente quanto utilizado o 1*H*-indol, substrato utilizado para a otimização da reação.

O estudo para a otimização da reação abrangeu a variação de temperatura, solução tampão, pH, concentração de reagentes, solvente e mediador. Conforme demonstrado, as reações foram realizadas em um sistema de solvente aquoso levemente ácido sob temperatura branda, de 30 °C.

A metodologia também se mostrou viável para derivados do indol. Para grupos substituintes no nitrogênio indólico, observou-se que quando estes não são grupos retiradores de elétrons, ou seja, levam a diminuição na nucleofilicidade do C3, os valores de conversão permanecem altos, de 99%, e a seletividade acima de 87%. Ao se tratar do dímero do 1*H*-indol há a possibilidade de iodação em ambos os C3. Enquanto para substrato substituído com um grupo propargila foi observado que há a iodo-funcionalização em alcinos.

Quando os substratos apresentaram a substituição no anel benzênico, mais especificamente na posição C5, a tendência permanece igual, substituintes como o bromo e o grupo metoxi apresentaram conversão e seletividade superiores a 97% e com rendimento superior a 92%. Ao se tratar de um grupo retirador de elétrons, o grupo nitro, a conversão foi de 60%, mas com a seletividade se mantendo em 99%. Substratos como o 7-aza-1*H*-indol e o 2-metil-1*H*-indol também apresentaram conversão e seletividade superiores a 99% e com rendimento superior a 89%.

Foi proposto um mecanismo para a reação de iodo-funcionalização de indóis utilizando dois métodos, um consistindo na espectrometria de massas de alta resolução e outro por espectrofotometria de UV-VIS, onde foi observada a formação de triiodeto, promovido pelo sistema lacase-mediador.

Conclui-se, a partir dos resultados obtidos pelo presente trabalho, que a utilização da catalise enzimática para a obtenção de compostos indólicos iodo funcionalizados por meio do sistema redox lacase/ABTS demonstra-se como uma metodologia de alta eficiência.

REFERÊNCIAS

- Arcus, V.L., Mulholland, A.J., 2020. Temperature , Dynamics , and Enzyme-Catalyzed Reaction Rates 163–182.
- Azimi, M., Nafissi-varcheh, N., Mogharabi, M., 2016. Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic Study of laccase activity and stability in the presence of ionic and non-ionic surfactants and the bioconversion of indole in laccase-TX-100 system. "Journal Mol. Catal. B, Enzym. 126, 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.02.001>
- Baeyer, A., 1866. Ueber die Reduction aromatischer Verbindungen mittelst Zinkstaub. Justus Liebigs Ann. Chem. 140, 295–296. <https://doi.org/10.1002/jlac.18661400306>
- Baeyer, A., Emmerling, A., 1869. Synthese des Indols. Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft 2, 679–682. <https://doi.org/10.1002/cber.186900201268>
- Baldrian, P., 2006. Fungal laccases-occurrence and properties. FEMS Microbiol. Rev. 30, 215–242. <https://doi.org/10.1111/j.1574-4976.2005.00010.x>
- Bao, W., O'Malley, D.M., Whetten, R., Sederoff, R.R., 1993. A laccase associated with lignification in Loblolly pine xylem. Science (80-.). 260, 672–674. <https://doi.org/10.1126/science.260.5108.672>
- Bartle, K.D., 1988. Industrial Aromatic Chemistry, Raw Materials—Processes—Products, Fuel. [https://doi.org/10.1016/0016-2361\(88\)90057-9](https://doi.org/10.1016/0016-2361(88)90057-9)
- Bell, E.L., Finnigan, W., France, S.P., Green, A.P., Hayes, M.A., Hepworth, L.J., Lovelock, S.L., Niikura, H., Osuna, S., Romero, E., Ryan, K.S., Turner, N.J., Flitsch, S.L., 2021. Biocatalysis. Nat. Rev. Methods Prim. 1, 46. <https://doi.org/10.1038/s43586-021-00044-z>
- Bilal, M., Rasheed, T., Nabeel, F., Iqbal, H.M.N., Zhao, Y., 2019. Hazardous contaminants in the environment and their laccase-assisted degradation – A review. J. Environ. Manage. 234, 253–264. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.01.001>
- Boochi, V., Palla, G., 1982. High Yield Selective bromination and Iodination of Indoles in N,N-Dimethylformamide. Synthesis (Stuttg). 12, 1096–1097. <https://doi.org/10.1055/s-1982-30087>
- Branchi, B., Galli, C., Gentili, P., 2005. Kinetics of oxidation of benzyl alcohols by the dication and radical cation of ABTS. Comparison with laccase-ABTS oxidations: An apparent paradox. Org. Biomol. Chem. 3, 2604–2614. <https://doi.org/10.1039/b504199f>
- Brotherton, W.S., Clark, R.J., Zhu, L., 2012. Synthesis of 5-Iodo-1,4-disubstituted-1,2,3-triazoles Mediated by in Situ Generated Copper(I) Catalyst and Electrophilic Triiodide Ion. J. Org. Chem. 77, 6443–6455. <https://doi.org/10.1021/jo300841c>
- Christopher, L.P., Yao, B., Ji, Y., 2014. Lignin biodegradation with laccase-mediator systems. Front. Energy Res. 2, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2014.00012>
- Claus, H., 2004. Laccases: Structure, reactions, distribution. Micron 35, 93–96. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2003.10.029>

- Dillies, J., Vivien, C., Chevalier, M., Rulence, A., Châtaigné, G., Flahaut, C., Senez, V., Froidevaux, R., 2020. Enzymatic depolymerization of industrial lignins by laccase-mediator systems in 1,4-dioxane/water. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 67, 774–782. <https://doi.org/10.1002/bab.1887>
- Dittmer, N.T., Suderman, R.J., Jiang, H., Zhu, Y.C., Gorman, M.J., Kramer, K.J., Kanost, M.R., 2004. Characterization of cDNAs encoding putative laccase-like multicopper oxidases and developmental expression in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34, 29–41. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2003.08.003>
- Ermolenko, M.S., Budylin, V.A., Kost, A.N., 1978. Nucleophilic substitution in iodonium derivatives of indole. *Chem. Heterocycl. Compd.* 14, 752–754. <https://doi.org/10.1007/BF00471643>
- Falconnier, B., Lapiere, C., Lesage-Meessen, L., Yonnet, G., Brunerie, P., Colonna-Ceccaldi, B., Corrieu, G., Asther, M., 1994. Vanillin as a product of ferulic acid biotransformation by the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus* I-937: Identification of metabolic pathways. *J. Biotechnol.* 37, 123–132. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(94\)90003-5](https://doi.org/10.1016/0168-1656(94)90003-5)
- Freidank-Mueschenborn, E., Fox, A.W., 2005. Resolution of concentration-response differences in onset of effect between subcutaneous and oral sumatriptan. *Headache* 45, 632–637. <https://doi.org/10.1111/j.1526-4610.2005.05129a.x>
- Ganachaud, C., Garfagnoli, V., Tron, T., Iacazio, G., 2008. Trimerisation of indole through laccase catalysis 49, 2476–2478. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2008.02.021>
- Hall, M., Bommarium, A.S., 2011. Enantioenriched compounds via enzyme-catalyzed redox reactions. *Chem. Rev.* 111, 4088–4110. <https://doi.org/10.1021/cr200013n>
- Hamri, S., Rodríguez, J., Basset, J., Guillaumet, G., Dolores Pujol, M., 2012. A convenient iodination of indoles and derivatives. *Tetrahedron* 68, 6269–6275. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2012.05.053>
- Ihsen, J., Schubert, M., Thöny-Meyer, L., Richter, M., 2014. Laccase catalyzed synthesis of iodinated phenolic compounds with antifungal activity. *PLoS One* 9, 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089924>
- Kaushik, N.K., Kaushik, N., Attri, P., Kumar, N., Kim, C.H., Verma, A.K., Choi, E.H., 2013. Biomedical importance of indoles. *Molecules* 18, 6620–6662. <https://doi.org/10.3390/molecules18066620>
- Kireev, S. V., Shnyrev, S.L., 2015. Study of molecular iodine, iodate ions, iodide ions, and triiodide ions solutions absorption in the UV and visible light spectral bands. *Laser Phys.* 25, 75602. <https://doi.org/10.1088/1054-660X/25/7/075602>
- Lakhdar, S., Westermaier, M., Terrier, F., Goumont, R., Boubaker, T., Ofial, A.R., Mayr, H., 2006. Nucleophilic reactivities of indoles. *J. Org. Chem.* 71, 9088–9095. <https://doi.org/10.1021/jo0614339>
- Lee, J.H., Lee, J., 2010. Indole as an intercellular signal in microbial communities. *FEMS Microbiol. Rev.* 34, 426–444. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00204.x>
- Legha, S.S., 1986. Vincristine Neurotoxicity. *Med. Toxicol.* 1, 421–427. <https://doi.org/10.1007/BF03259853>
- Maciel, I.F., Raminelli, C., Pizzuti, L., 2012. Síntese de compostos aromáticos e heteroaromáticos iodados fazendo uso de iodo e peróxido de hidrogênio em água promovida por ultrassom. Universidade Federal da Grande Dourados.

- Monti, D., Ottolina, G., Carrea, G., Riva, S., 2011. Redox reactions catalyzed by isolated enzymes. *Chem. Rev.* 111, 4111–4140. <https://doi.org/10.1021/cr100334x>
- Nishida, A., Fukuzumi, T., 1978. Formation of coniferyl alcohol from ferulic acid by the white rot fungus *Trametes*. *Phytochemistry* 17, 417–419. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)89328-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)89328-0)
- Piontek, K., Antorini, M., Choinowski, T., 2002. Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. *J. Biol. Chem.* 277, 37663–37669. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204571200>
- Powers, J.C., 1967. *Yn* 1, 2044–2050.
- R, C.G., Greenhouse, R., 1985. Efficient SYNthesis of 1,1'-methylenebis-1H-pyrrole derivatives. *Heterocycles* 23, 1–4.
- Riva, S., 2006. Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends Biotechnol.* 24, 219–226. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.03.006>
- Rodakiewicz-Nowak, J., Kasture, S.M., Dudek, B., Haber, J., 2000. Effect of various water-miscible solvents on enzymatic activity of fungal laccases. *J. Mol. Catal. - B Enzym.* 11, 1–11. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(00\)00183-1](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(00)00183-1)
- Sato, Y., Wuli, B., Sederoff, R., Whetten, R., 2001. Molecular cloning and expression of eight laccase cDNAs in loblolly pine (*Pinus taeda*). *J. Plant Res.* 114, 147–155. <https://doi.org/10.1007/pl00013978>
- Saulnier, M.G., Gribble, G.W., 1982. Generation and Reactions of 3-Lithio-1-(phenylsulfonyl)indole. *J. Org. Chem.* 47, 757–761. <https://doi.org/10.1021/jo00344a001>
- Scott Chilton, W., Bigwood, J., Jensen, R.E., 1979. Psilocin, bufotenine and serotonin: Historical and biosynthetic observations. *J. Psychoactive Drugs* 11, 61–69. <https://doi.org/10.1080/02791072.1979.10472093>
- Sdahl, M., Conrad, J., Braunberger, C., Beifuss, U., 2019. Efficient and sustainable laccase-catalyzed iodination of: P -substituted phenols using KI as iodine source and aerial O₂ as oxidant. *RSC Adv.* 9, 19549–19559. <https://doi.org/10.1039/c9ra02541c>
- Seki, M., Oikawa, J.I., Taguchi, T., Ohnuki, T., Muramatsu, Y., Sakamoto, K., Amachi, S., 2013. Laccase-catalyzed oxidation of iodide and formation of organically bound iodine in soils. *Environ. Sci. Technol.* 47, 390–397. <https://doi.org/10.1021/es303228n>
- Sheppard, T.D., 2009. Metal-catalysed halogen exchange reactions of aryl halides. *Org. Biomol. Chem.* 7, 1043–1052. <https://doi.org/10.1039/b818155a>
- Shiri, M., 2012. Indoles in multicomponent processes (MCPs). *Chem. Rev.* 112, 3508–3549. <https://doi.org/10.1021/cr2003954>
- Silva, A.B.V., Silva, E.D., dos Santos, A.A., Princival, J.L., 2020. A sustainable access to ynones through laccase/TEMPO-catalyzed metal- and halogen-free aerobic oxidation of propargylic alcohols in aqueous medium. *Catal. Commun.* 137. <https://doi.org/10.1016/j.catcom.2020.105946>
- Strong, P.J., Claus, H., 2011. Laccase: A review of its past and its future in bioremediation. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 41, 373–434. <https://doi.org/10.1080/10643380902945706>
- Sun, L., Zhang, X., Li, Z., Ma, J., Zeng, Z., Jiang, H., 2018. A Versatile C–H Halogenation Strategy for

- Indole Derivatives under Electrochemical Catalyst- and Oxidant-Free Conditions. *European J. Org. Chem.* 2018, 4949–4952. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201800267>
- Tipton, K., McDonald, A., 2018. A Brief Guide to Enzyme Nomenclature and Classification. *Int. Union Biochem. Mol. Biol.* 4, 8.
- Unsworth, W.P., Cuthbertson, J.D., Taylor, R.J.K., 2013. Total synthesis of spirobacillene A. *Org. Lett.* 15, 3306–3309. <https://doi.org/10.1021/ol4013958>
- Van Order, R.B., Lindwall, H.G., 1942. Indole. *Chem. Rev.* 30, 69–96. <https://doi.org/10.1021/cr60095a004>
- Wang, L., Zhou, X., Fredimoses, M., Liao, S., Liu, Y., 2014. Naturally occurring organoiodines. *RSC Adv.* 4, 57350–57376. <https://doi.org/https://doi.org/10.1039/C4RA09833A>
- Witayakran, S., Ragauskas, A.J., 2009. Synthetic applications of laccase in green chemistry. *Adv. Synth. Catal.* 351, 1187–1209. <https://doi.org/10.1002/adsc.200800775>
- Wu, S., Snajdrova, R., Moore, J.C., Baldenius, K., Bornscheuer, U.T., 2021. Biocatalysis : Enzymatic Synthesis for Industrial Appli- cations *Angewandte* 88–119. <https://doi.org/10.1002/anie.202006648>
- Xu, F., 1996. Catalysis of novel enzymatic iodide oxidation by fungal laccase. *Appl. Biochem. Biotechnol. - Part A Enzym. Eng. Biotechnol.* 59, 221–230. <https://doi.org/10.1007/BF02783566>
- Yoshida, H., 1883. Chemistry of Lacquer (Urushi). *J. Chem. Soc. Trans.* 43, 472–486.
- Zampieri, L.A., 2013. Imobilização de lacases e de microrganismos em biocatálise. Universidade Estadual de Campinas.

APÊNDICE A – ESPECTROS DE RMN DE ^1H E ^{13}C DOS IODO-INDOIS

Figura 43 – Espectro de RMN de ^1H (300 MHz) do composto 3-iodo-1-metil-1*H*-indol (**i2**) em $\text{DMSO-}d_6$

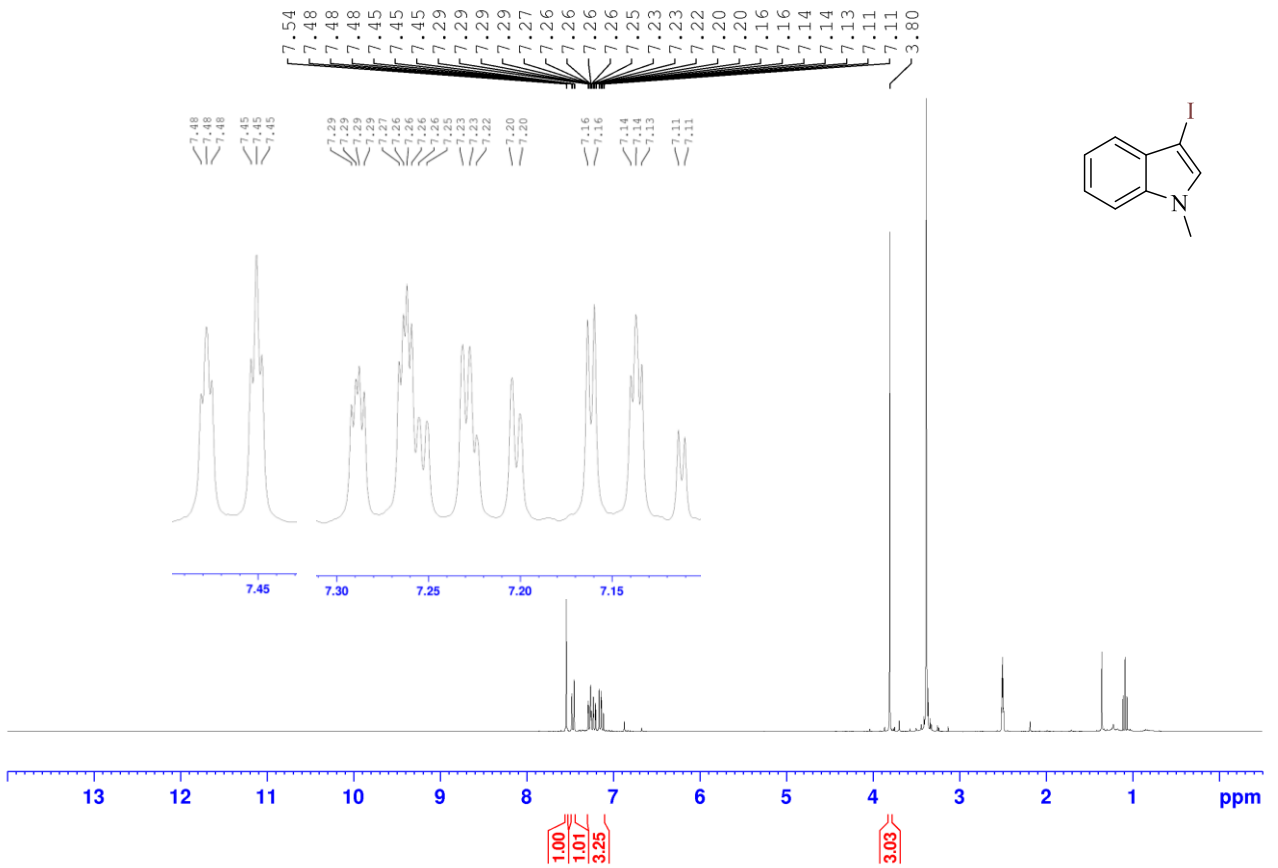


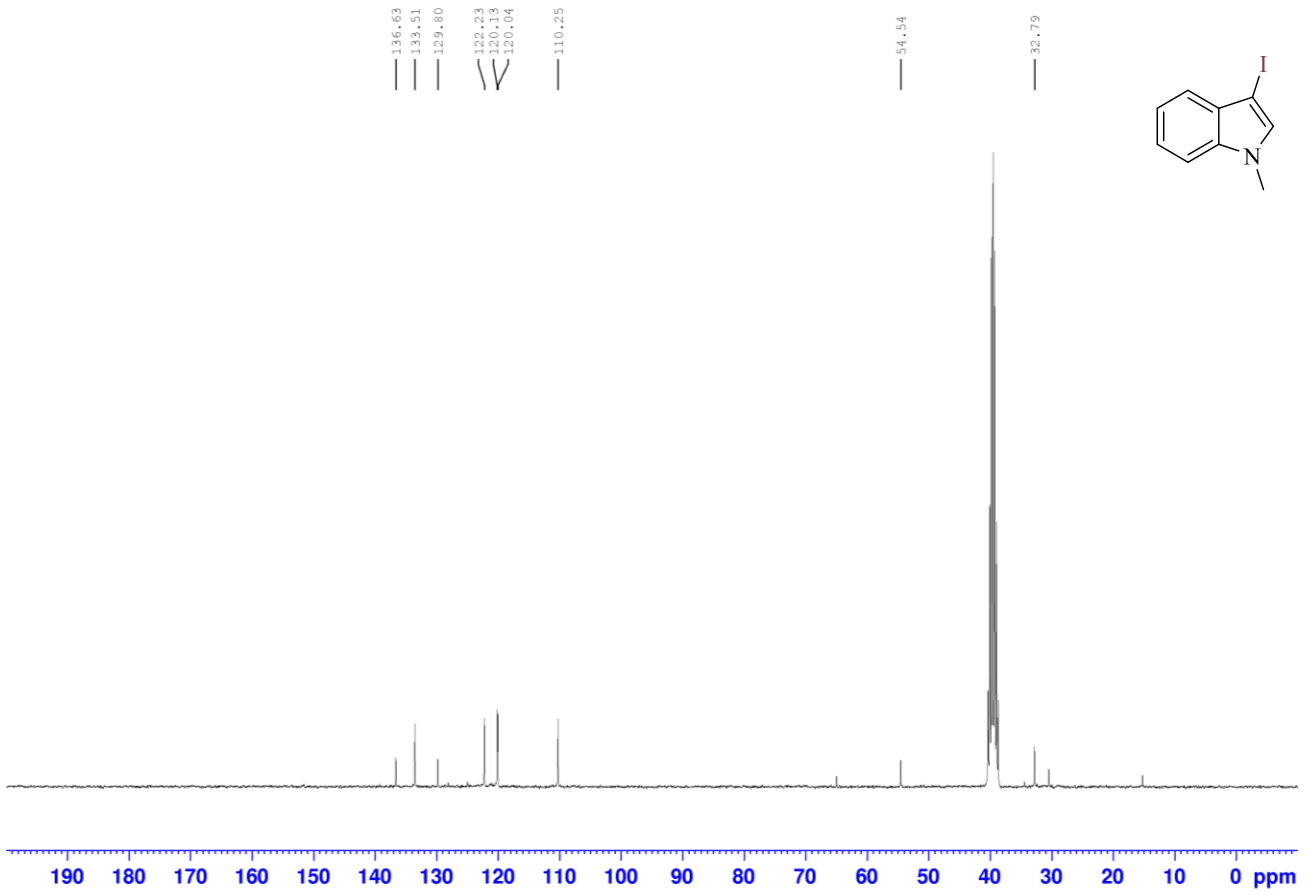
Figura 44 – Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz) do composto 3-iodo-1-metil-1*H*-indol (**i2**) em $\text{DMSO-}d_6$ 

Figura 45 – Espectros de RMN de ^1H (300 MHz) do composto 3-iodo-1-propil-1*H*-indol (**i3**) em $\text{DMSO-}d_6$

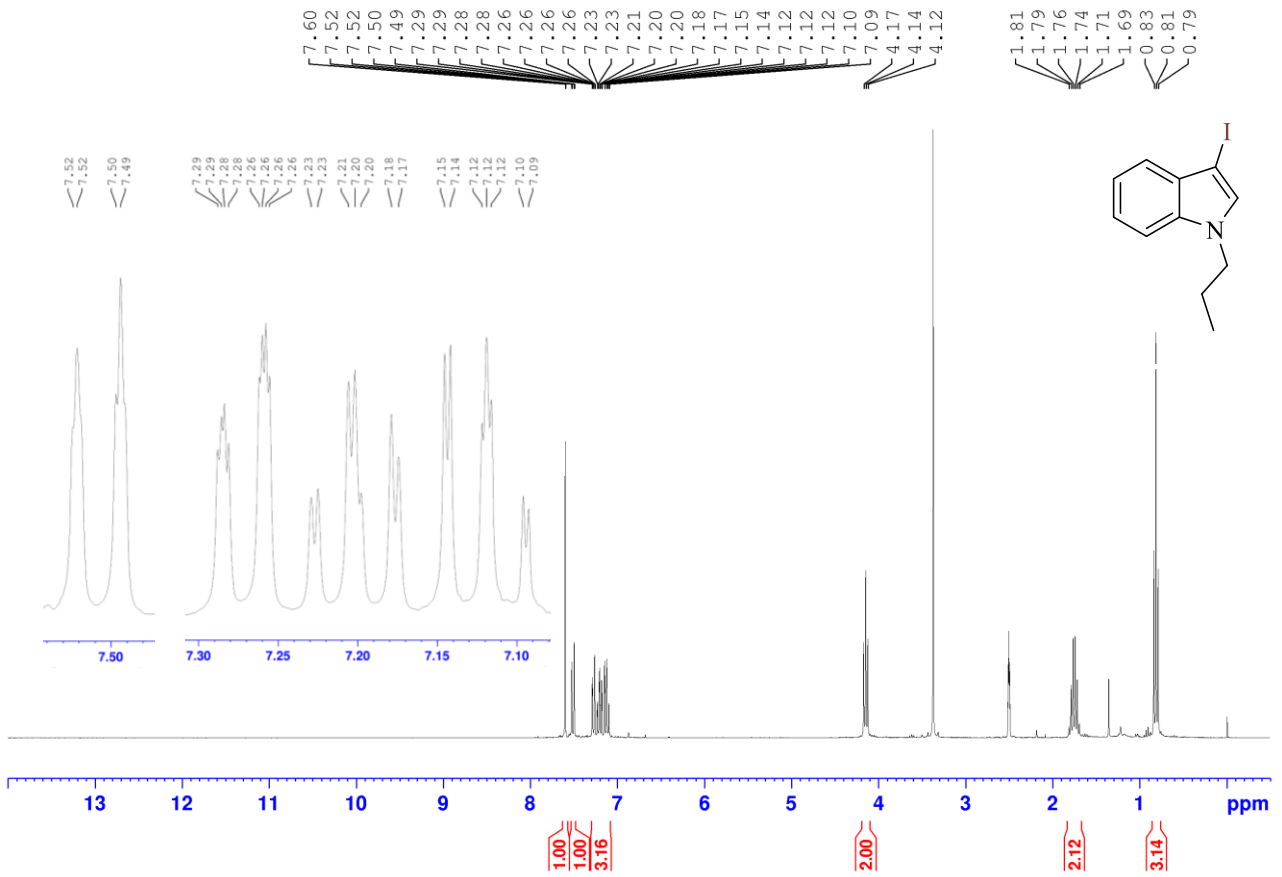


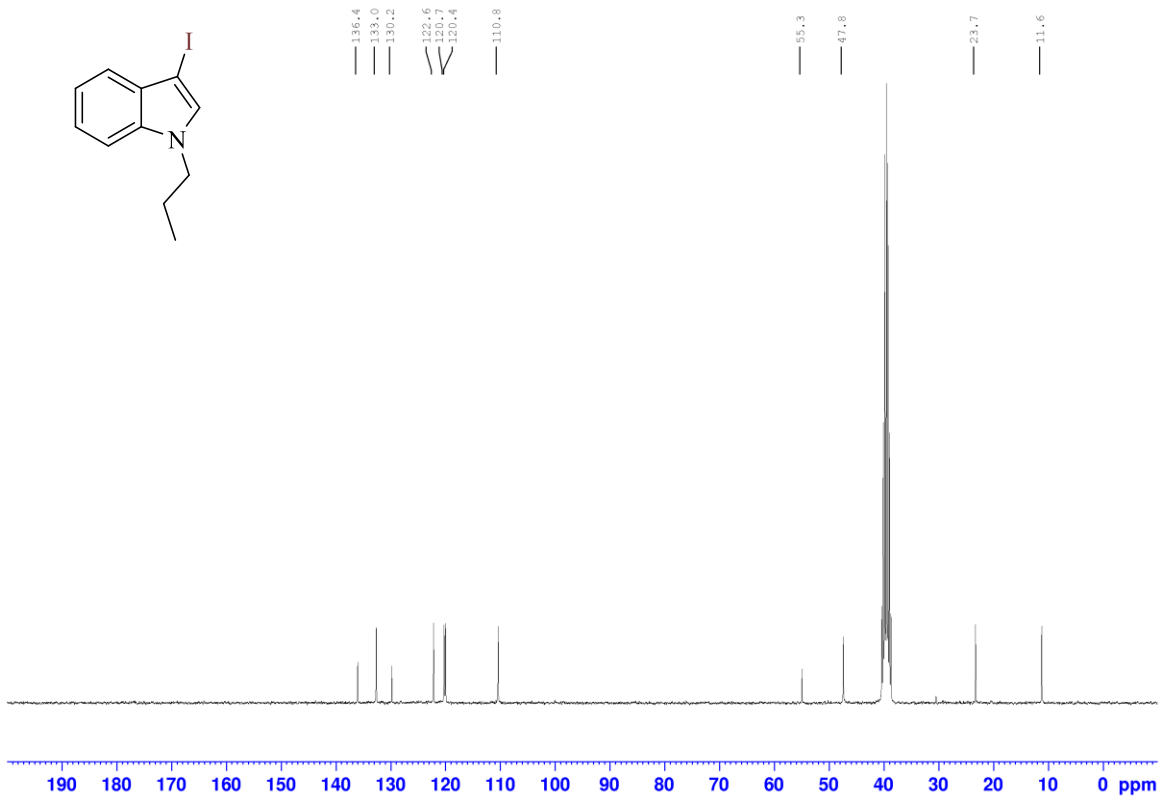
Figura 46 – Espectros de RMN de ^{13}C (75 MHz) do composto 3-iodo-1-propil-1*H*-indol (**i3**) em $\text{DMSO-}d_6$ 

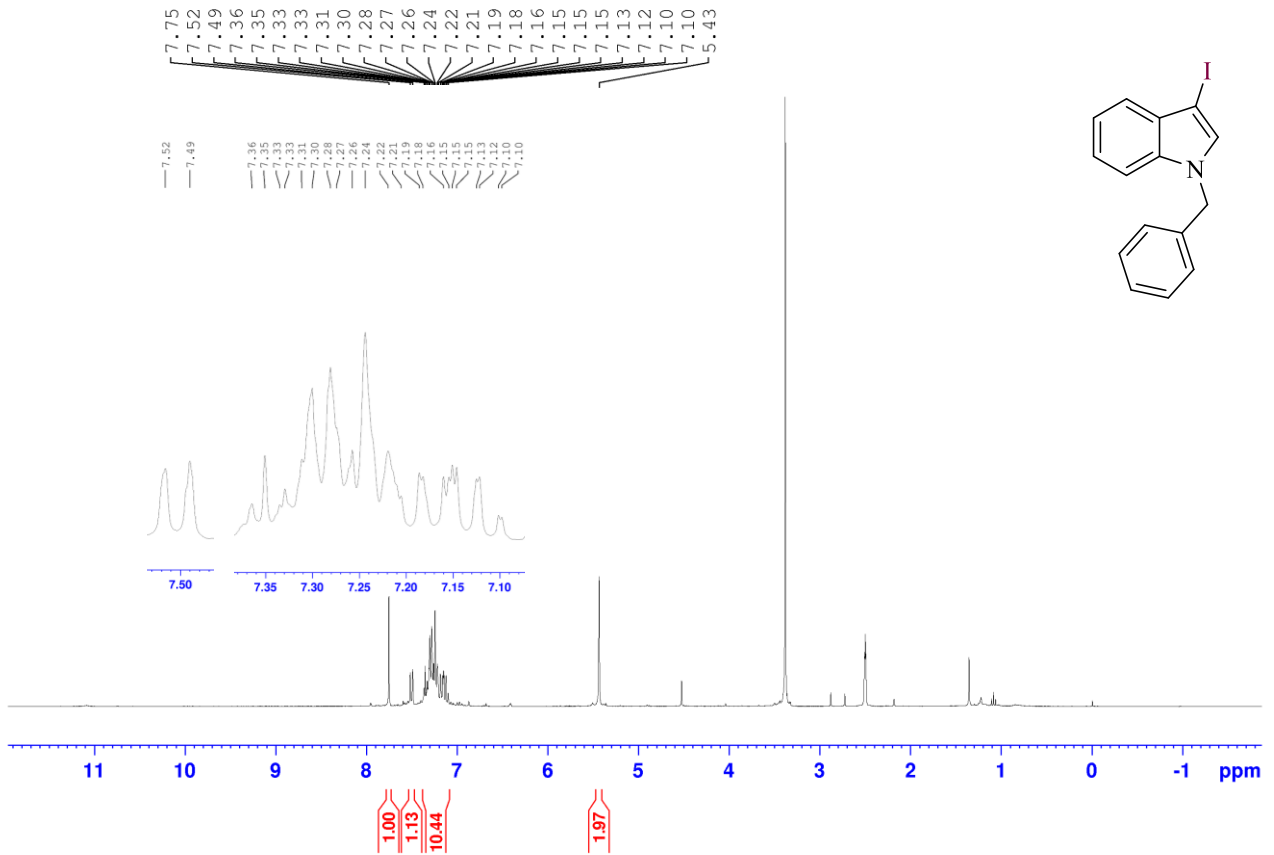
Figura 47 – Espectros de RMN de ^1H (a) (300 MHz) do composto 3-iodo-1-benzil-1*H*-indol (**i4**) em $\text{DMSO-}d_6$ 

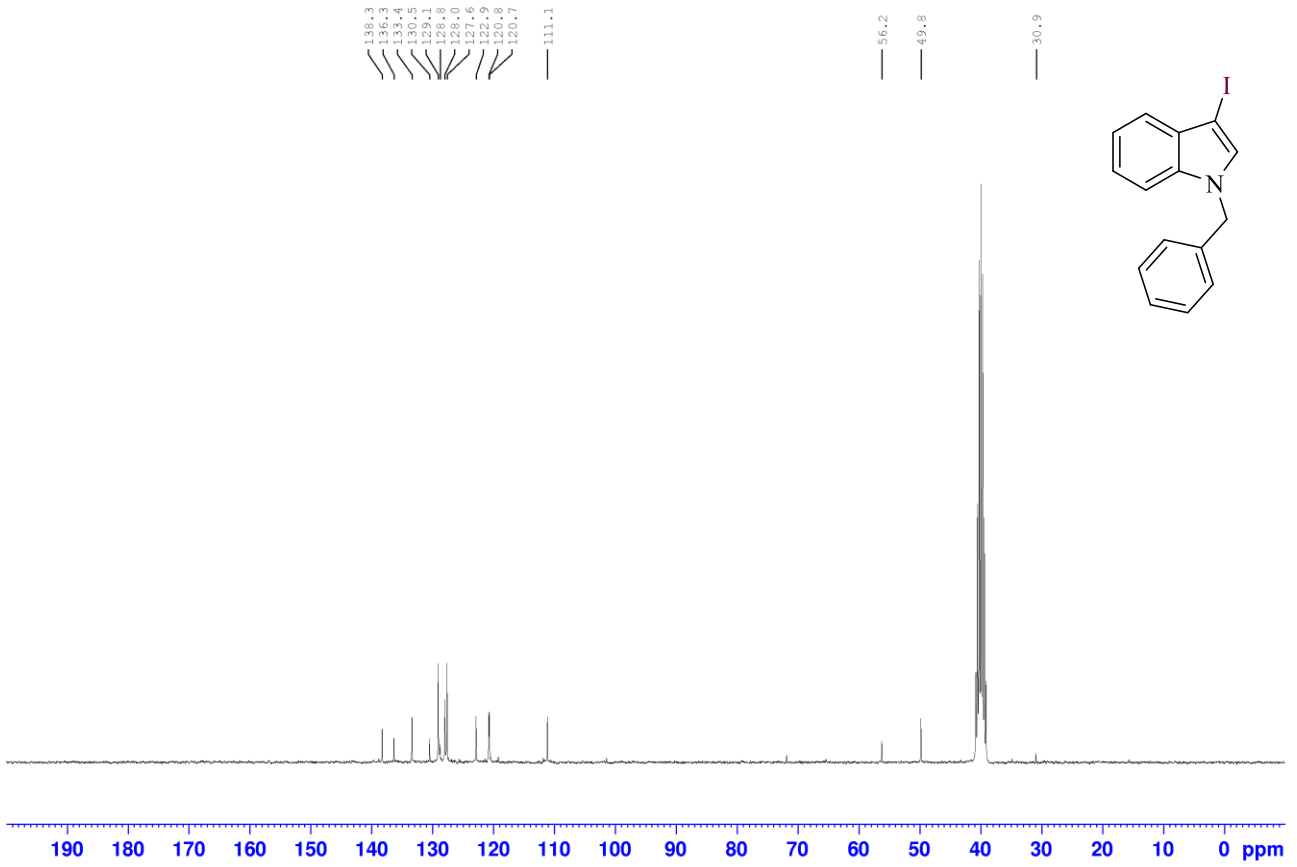
Figura 48 – Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz) do composto 3-iodo-1-benzil-1*H*-indol (**i4**) em $\text{DMSO-}d_6$ 

Figura 49 – Espectros de RMN de ^1H (300 MHz) do composto 3-iodo-1-*alil*-1*H*-indol (**i5**) em $\text{DMSO-}d_6$

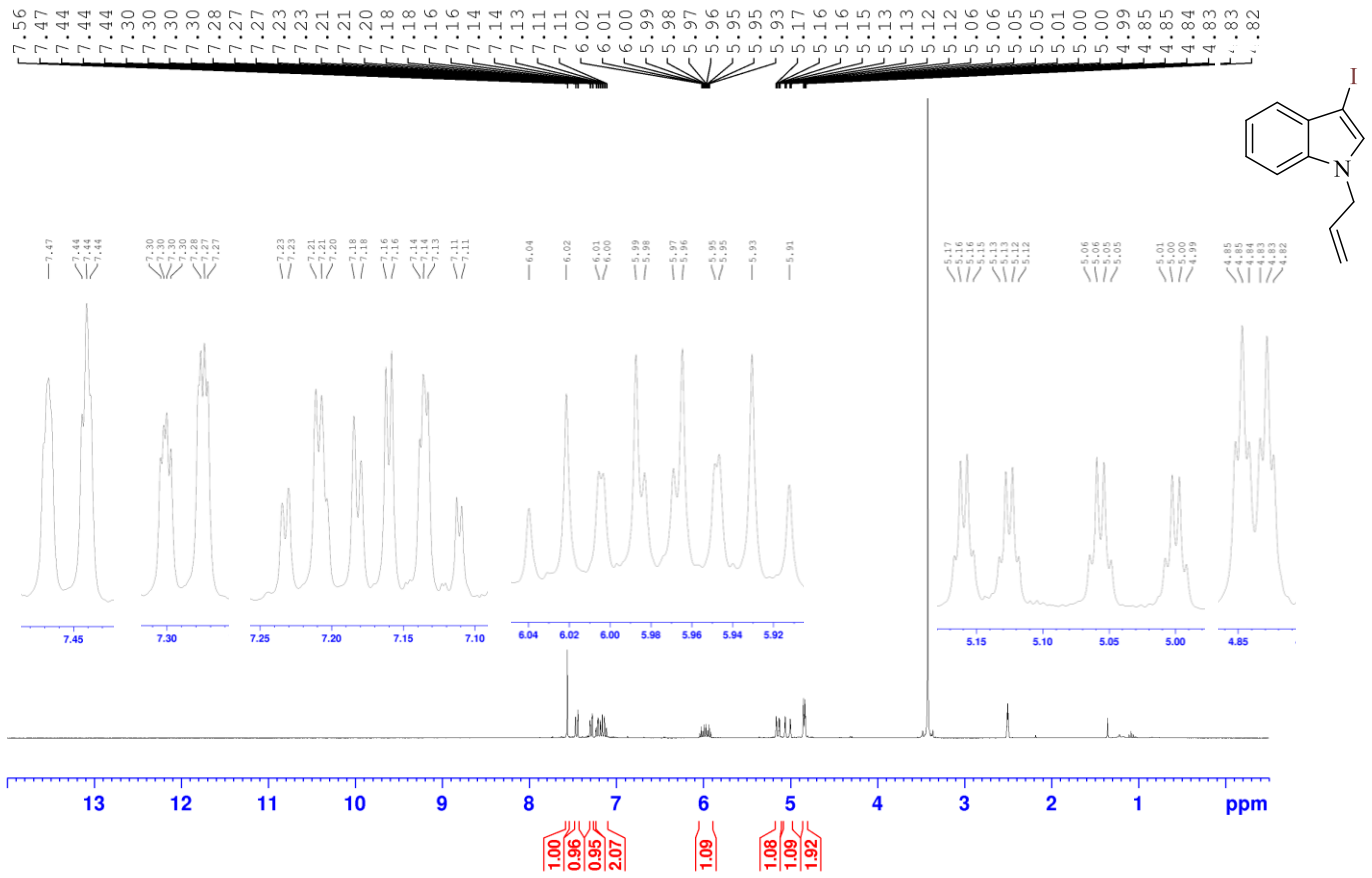


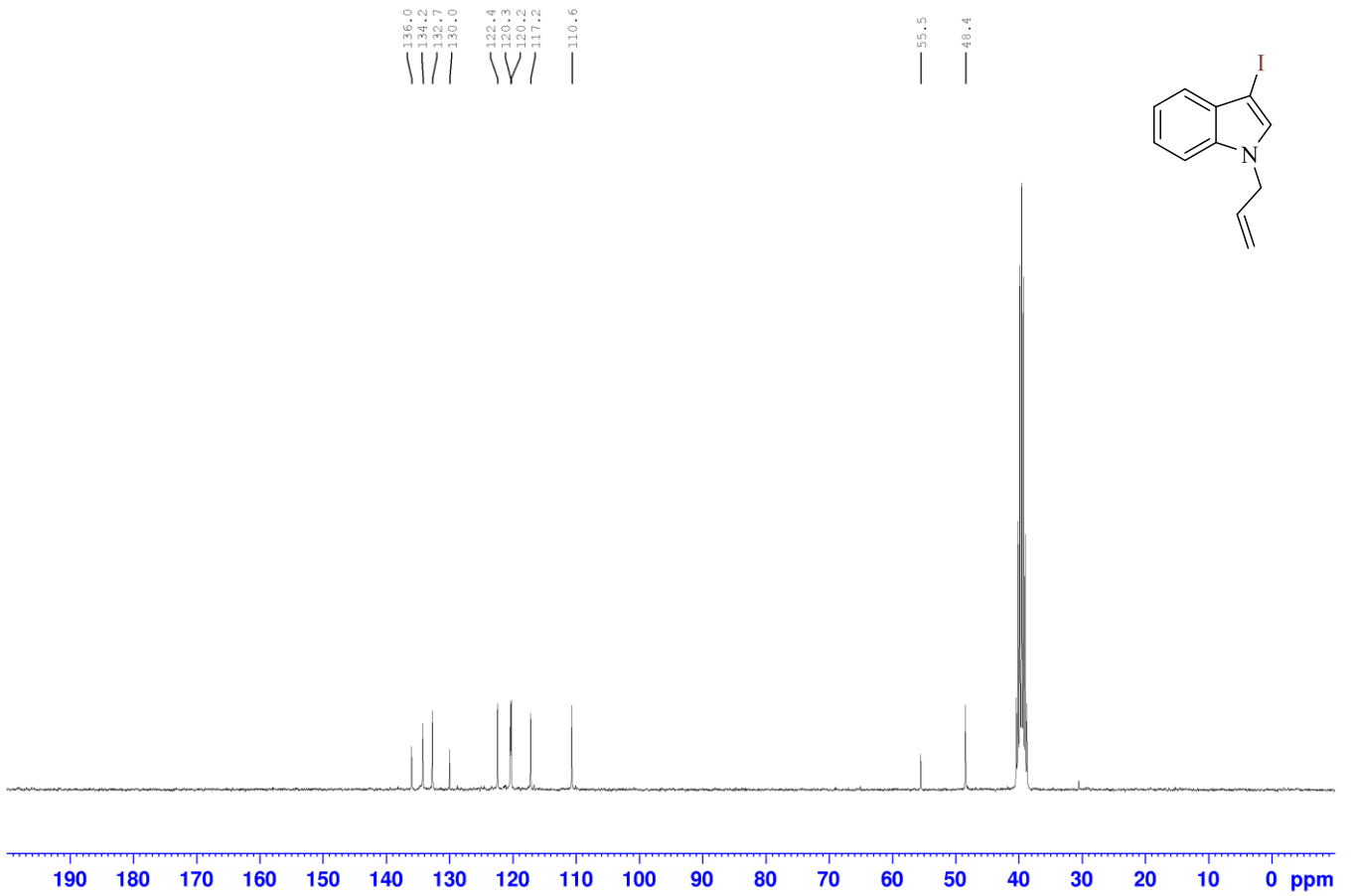
Figura 50 – Espectros de RMN de ^{13}C (75 MHz) do composto 3-iodo-1-alil-1*H*-indol (**i5**) em $\text{DMSO-}d_6$ 

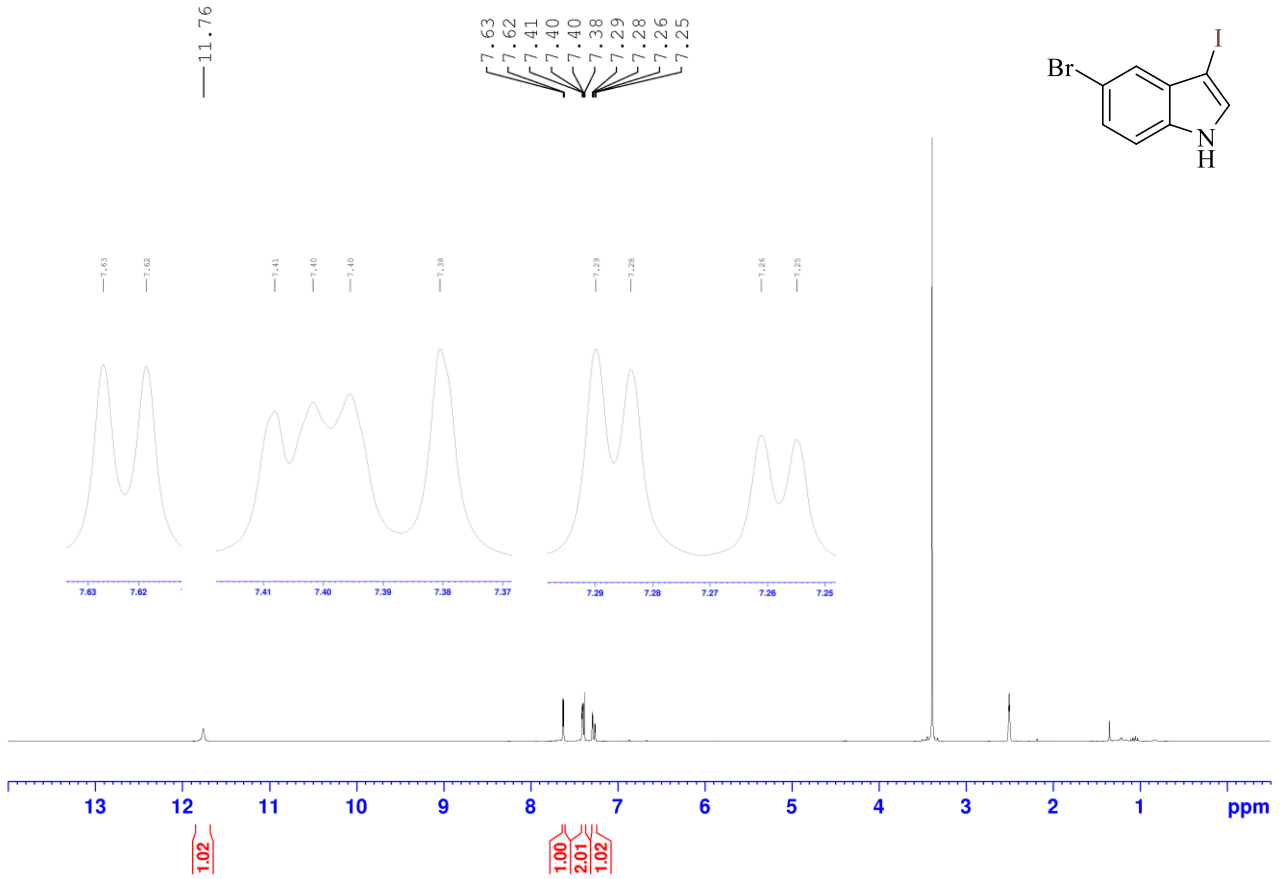
Figura 51 – Espectros de RMN de ^1H (300 MHz) do composto 5-bromo-3-iodo-1*H*-indol (**11**) em $\text{DMSO-}d_6$ 

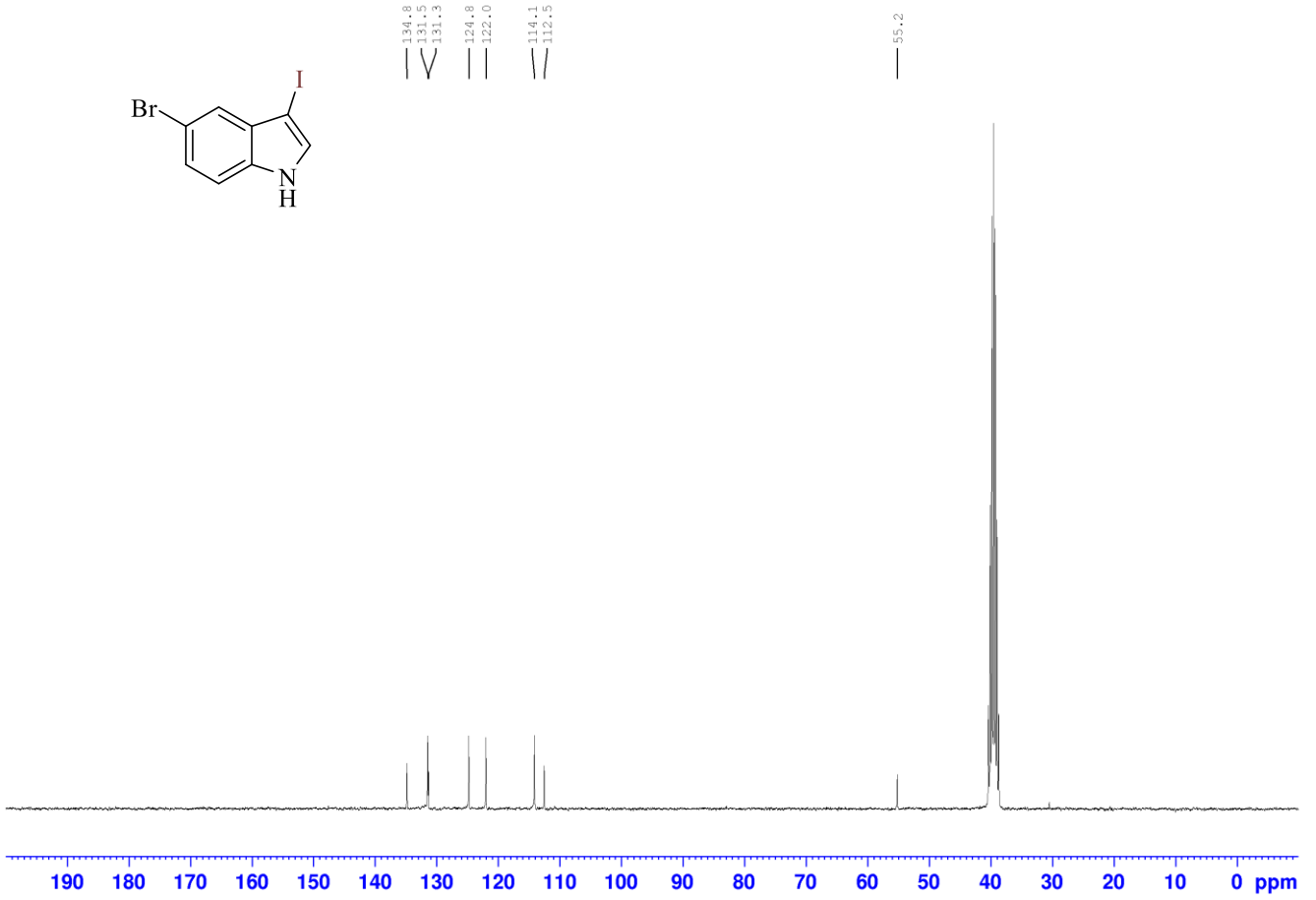
Figura 52 – Espectros de RMN de ^{13}C (75 MHz) do composto 5-bromo-3-iodo-1*H*-indol (**i11**) em $\text{DMSO-}d_6$ 

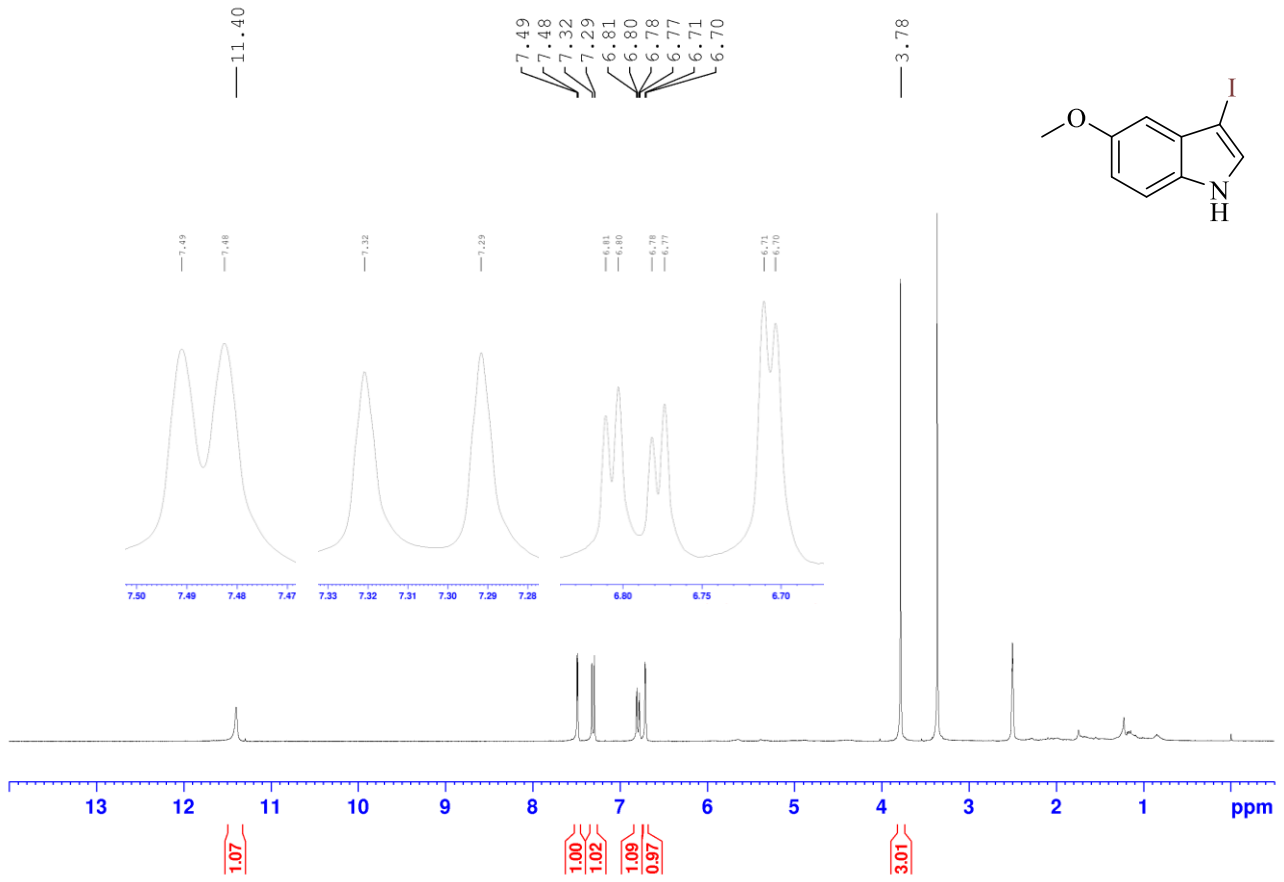
Figura 53 – Espectros de RMN de ^1H (300 MHz) do composto 5-metoxi-3-iodo-1*H*-indol (**i12**) em $\text{DMSO-}d_6$ 

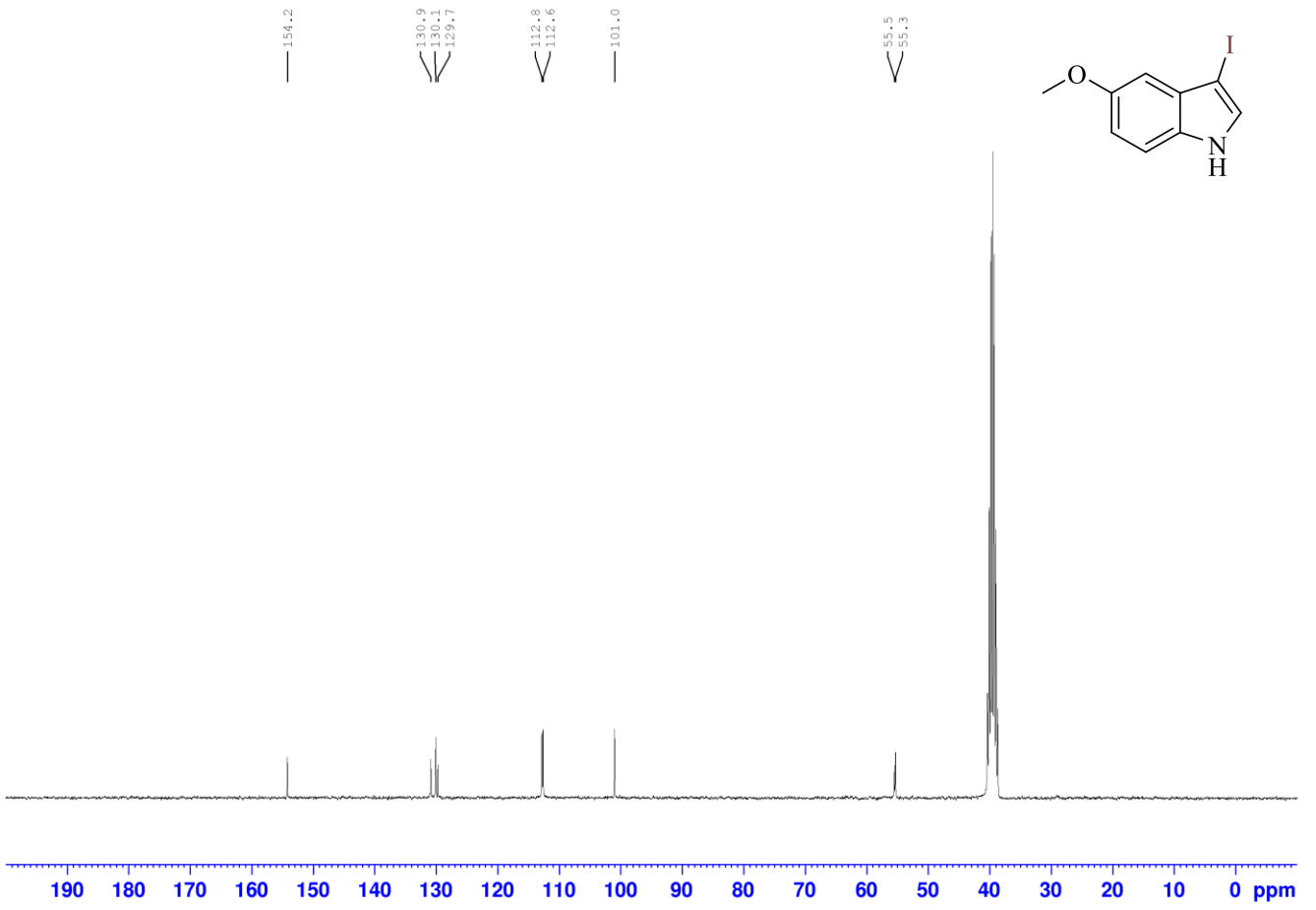
Figura 54 – Espectros de RMN de ^{13}C (75 MHz) do composto 5-metoxi-3-iodo-1*H*-indol (**i12**) em $\text{DMSO-}d_6$ 

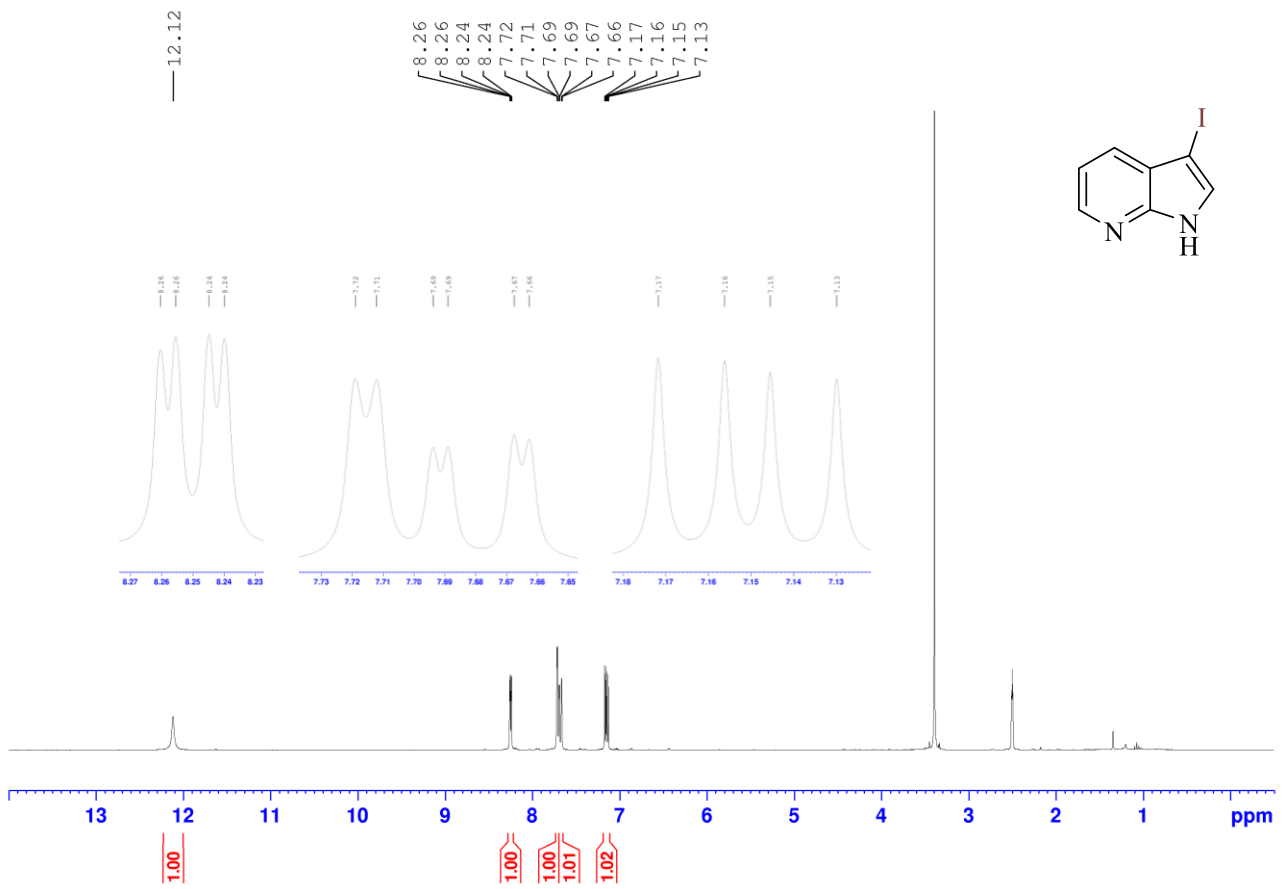
Figura 55 – Espectros de RMN de ^1H (300 MHz) do composto 3-iodo-7-aza-1*H*-indol (**i14**) em $\text{DMSO-}d_6$ 

Figura 56 – Espectros de RMN de ^{13}C (75 MHz) do composto 3-iodo-7-aza-1*H*-indol (**i14**) em $\text{DMSO-}d_6$ 