



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

CORSO DI LAUREA IN CHIMICA INDUSTRIALE

**STUDIO DELL'OSSIDAZIONE INTRACELLULARE DI NADH CATALIZZATA DA
COMPLESSI METALLICI**

Relatore: Dott. Thomas Scattolin

Laureando: Thomas Capiotto

Matricola: 2076284

Anno accademico 2024/25

INDICE

Abstract:	4
1. Introduzione	5
1.1. Le reazioni di trasferimento di idrogeno	5
1.2. Definizione e ruolo del NADH	10
2. Scopo della tesi	12
3. Principali reazioni di ossidazione di NADH a NAD⁺	13
4. Conclusioni e aspetti rilevanti	35
Bibliografia	37

Abstract:

La respirazione cellulare è uno dei meccanismi più importanti della vita. In particolare, nell'ultima fase avviene la fosforilazione ossidativa nella quale viene prodotto ATP (adenosina trifosfato) che è la principale fonte energetica cellulare. Un passaggio fondamentale è la riduzione della nicotinammide adenina di nucleotide (NAD^+) nella sua forma ridotta (NADH) mediante una reazione di trasferimento di idrogeno, catalizzata da enzimi. Su scala industriale la reazione procede mediante acido formico o alcoli come fornitori di idrogeno e viene catalizzata da complessi metallici. In natura esistono alcuni enzimi costituiti da siti attivi che possiedono ioni metallici e sono in grado di lavorare in matrici complesse. I principali metalli presenti sono Fe, Cu e Zn, che sono incapsulati da proteine con lo scopo sia di creare siti di reazione specializzati che di proteggere il metallo dall'avvelenamento; per questo motivo è ingente l'interesse nel creare metallo-enzimi artificiali. Inizialmente si svilupparono complessi metallici a basso peso molecolare che venivano avvelenati facilmente, mentre recentemente sono stati scoperti complessi metallici a base di Ru, Rh, Ir e Os, che possiedono qualità migliori.

Il rapporto NAD^+/NADH è fondamentale per mantenere l'equilibrio redox cellulare ed il controllo delle reazioni vitali. È possibile alterare l'equilibrio cellulare, controllando in modo indiretto la durata vitale di una cellula, mediante l'utilizzo di complessi che possono catalizzare reazioni di trasferimento di idrogeno, nelle quali sono coinvolte le specie citate precedentemente, ponendo così anche le basi per lo studio di nuovi metallofarmaci.

L'obiettivo dell'elaborato è di introdurre lo sviluppo delle reazioni di trasferimento di idrogeno nella storia, trattare il funzionamento principale del NADH e di focalizzarsi nelle reazioni di trasferimento di idrogeno a livello cellulare, analizzando nel dettaglio reazioni di ossidazione di NADH, catalizzate da complessi metallici, mediante l'utilizzo di ricerche effettuate nel corso degli anni.

1. Introduzione

Una delle più importanti reazioni in sintesi organica è l'idrogenazione, nella quale idrogeno molecolare (H_2) reagisce con una specie insatura (solitamente un alchene o un alchino), trasformandola in una specie satura o con un grado minore di insaturazione. La reazione si può definire redox poiché i carboni insaturi si riducono, invece l'idrogeno si ossida. Questa reazione può avvenire in due modalità: *i*) attraverso l'idrogenazione diretta con H_2 a pressione elevata o *ii*) mediante reazione di trasferimento di idrogeno, comunemente chiamata TH (*Transfer Hydrogenation*).^[1] Entrambi i metodi sono comunemente catalizzati da metalli di transizione. In particolare, il secondo metodo consiste nella formale addizione di idrogeno, "prelevato" però da una molecola donatrice (non idrogeno molecolare), ad una molecola bersaglio.

1.1. Le reazioni di trasferimento di idrogeno

Queste tipologie di reazioni risultano di ampio interesse per una serie di motivi:

- 1) Non è richiesto l'utilizzo di H_2 pressurizzato o di impianti sperimentali complessi.
- 2) Le molecole donatrici sono facilmente reperibili e a basso costo.
- 3) In molti casi i prodotti di reazione possono essere riciclati oppure non vengono considerati dannosi.
- 4) I catalizzatori sono facilmente accessibili e robusti nelle condizioni operative impiegate.^[1]

In una prima dimostrazione di questa reazione, avvenuta nel 1903, Knoevenagel osservò che il nero di palladio promuoveva la disproporzione del dimetil-1,4-diidrotereftalato in dimetiltereftalato e in *cis*-esaidrotereftalato. Successivamente, gli scienziati Braude e Linstead classificarono le reazioni di trasferimento di idrogeno in tre tipologie:

- 1) La migrazione dell'idrogeno avviene nella stessa molecola.
- 2) Disproporzione dell'idrogeno con trasferimento tra due molecole identiche.
- 3) L'idrogeno viene trasferito da una molecola donatrice a una molecola bersaglio.^[2]

La terza tipologia è quella che si è distinta rispetto alle altre, differenziandosi in base al tipo di catalizzatore utilizzato. La reazione Meerwin-Ponndorf-Varley (riduzioni MPV), che fu scoperta nel 1925 dagli scienziati Meerwin e Varley dai quali prese il nome, è una delle prime TH del terzo tipo che coinvolge composti carbonilici. In particolare, avviene la riduzione di un chetone mediante un alcol come sorgente di idrogeno in presenza di un alcossido di alluminio.

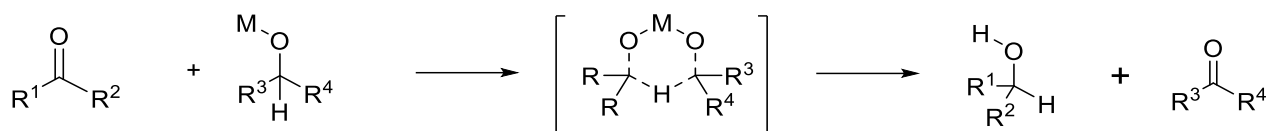


Figura 1. Schema della reazione di riduzione MPV mediante uno stato di transizione ciclico.^[1]

Da come si vede nella figura 1, la reazione è una redox nella quale un chetone si riduce ad alcol grazie alla presenza di un secondo alcol che si ossida al corrispondente chetone. Ciò avviene attraverso un singolo passaggio grazie alla formazione di uno stato di transizione a sei centri nel quale sia il carbonile che l'alcol sono coordinati allo stesso metallo. Quindi, si può affermare che la funzione del metallo è quella di permettere ai reagenti di coordinarsi insieme e di consentire la riorganizzazione della struttura, garantendo il trasferimento dell'idrogeno. Negli anni successivi vennero utilizzati sia acidi e basi di Lewis che zeoliti come promotori della reazione, inoltre vennero integrati anche alcossidi di Al, La e Hf. Questa tipologia di reazione venne usata specialmente per la manifattura di agenti aromatici (utilizzati in ambito alimentare e medico) grazie all'elevata chemio-selettività verso il gruppo chetonico, dove la sua presenza genera diversi gusti e odori. Tuttavia, i principali problemi legati a questa reazione, cioè la quantità elevata di reagenti richiesti, la presenza di reazioni secondarie indesiderate ed elevata sensibilità all'umidità, resero il processo molto problematico da gestire e con costi troppo elevati.

Negli anni successivi venne scoperto l'utilizzo di metalli di transizione appartenenti ai gruppi 9-11 come catalizzatori per la TH. Negli anni 60', Henbest e Mitchel dimostrarono che un complesso di iridio (Ir) era in grado di catalizzare la reazione di idrogenazione di cicloesanoni o di chetoni α , β insaturi in alcoli mediante isopropanolo come sorgente di idrogeno. Successivamente, vennero utilizzati anche il rodio (Rh) e il rutenio (Ru), con leganti contenenti N, P, O, S, C come atomi donatori, per catalizzare la reazione TH, in particolare quella asimmetrica (ATH).^[1] Questa tipologia di reazione, rispetto alla TH convenzionale, ha lo scopo di produrre specie chirali partendo da specie prochirali e, grazie all'elevata stereo selettività dei catalizzatori chirali impiegati, è possibile ottenere un'elevata enantioselettività;^[3] i leganti utilizzati maggiormente sono carbeni *N*-eterociclici (NHC) (figura 2).

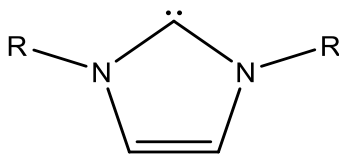


Figura 2. Struttura di un carbene *N*-eterociclico a struttura imidazolica.

Un esempio è stato riportato da Peris e Danopoulos, i quali hanno sviluppato un catalizzatore a base di Ru usando sali di 2,6-di(1-alcilimidiazolo-3-yl)piridina come fonte di carbeni tridentati. Un esempio è evidenziato in figura 3.

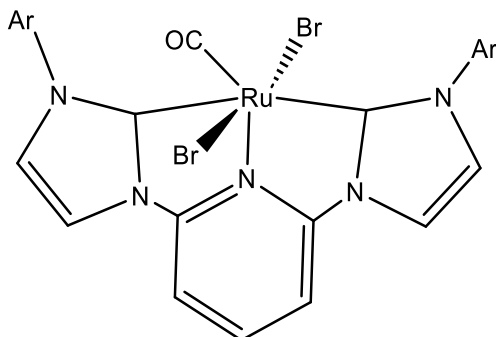


Figura 3. Struttura chimica del complesso metallico a base di Ru che possiede leganti NHC, Ar indica un gruppo arile.^[1]

Utilizzando questo complesso si sono registrati valori di TON (*Turnover Number*) pari a 126 000 e valori di TOF (*Turnover Frequency*) pari a 15 000 h⁻¹ con cicloesanone come substrato.^[1]

Un passaggio importante nello sviluppo di complessi metallici come catalizzatori in ATH arrivò nel 1995 con Noyori e Ikariya, i quali sintetizzarono il complesso seguente: [RuCl(η⁶-arene)(*N*-arilsolfonile-1,2-difeniletilene-1,2-diammina)], comunemente chiamato catalizzatore di Noyori (figura 4).^{[1],[4]} Questo complesso ha permesso di catalizzare in maniera stereoselettiva la TH di numerosi chetoni aromatici e immine.

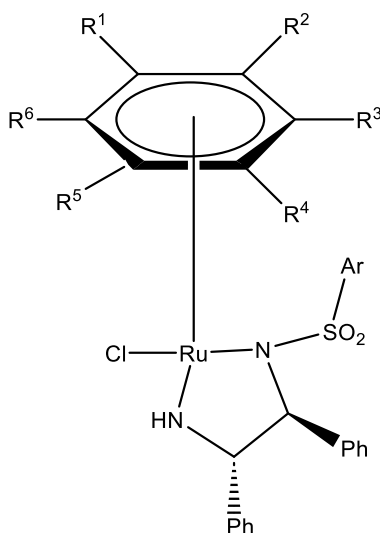


Figura 4. Struttura chimica del catalizzatore di Noyori.^[1]

Con R viene indicato un generico gruppo sostituito, tipicamente -H, -CH₃ o un gruppo isopropilico (-iPr), invece Ar indica un generico gruppo arilico. Un esempio di reazione è riportato in figura 5.

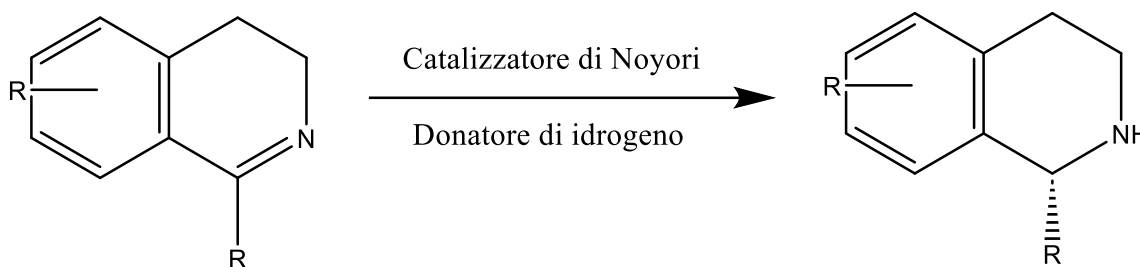


Figura 5. ATH di un'immina catalizzata dal complesso metallico ideato da Noyori.^[1]

Solitamente i fornitori di idrogeno utilizzati sono 2-PrOH (2-propanolo o isopropanolo) o acido formico; inoltre, si può notare nella struttura in figura 4 che è presente un anello aromatico legato direttamente al centro metallico (complessi *half-sandwich*), conferendo al catalizzatore un'ottima stabilità.^[5] Per questo motivo, complessi metallici costituiti da Ir, Rh o Ru, vennero studiati e utilizzati per diversi anni. Verso il 2009 si riuscì a sintetizzare il primo complesso metallico a base di Fe con le stesse attività catalitiche dei complessi predecessori, dimostrando vantaggi dal punto di vista della sostenibilità ed ecocompatibilità, dovuti principalmente alla grande quantità di Fe presente in natura (basso costo) e la sua bassa tossicità.^[1]

L'altro aspetto importante delle reazioni di trasferimento di idrogeno è il solvente, che spesso ha l'obiettivo di donare idrogeno o stabilizzare le specie donatrici. Per anni si è utilizzata l'acqua come solvente e formiato come donatore di idrogeno. Successivamente, altri solventi sono stati utilizzati, come solventi organici convenzionali, solventi supercritici o solventi ionici con il ruolo anche di donatori di idrogeno. L'utilizzo di un solvente acquoso si basa principalmente sul basso costo e che la maggior parte delle molecole utilizzate come catalizzatori o come fornitrici di idrogeno sono molto idrosolubili. È da notare che le proprietà dei vari catalizzatori sono influenzate fortemente dal pH della soluzione, tanto da influenzare la selettività del processo. La presenza di basi organiche e inorganiche con diversi valori di pKa e della loro natura anionica o cationica influenza l'efficienza di diversi complessi metallici.

Nei vari anni sono stati proposti dei meccanismi di reazione per ogni reazione di TH in base alla tipologia di catalizzatore usato. Per esempio, nella trasformazione dei chetoni si sono rilevati due meccanismi principali:

- A sfera-intera con la formazione di un substrato coordinato.
- A sfera-esterna dove non è invocata la coordinazione del substrato.^[1]

Nel primo caso si ha che il chetone si inserisce tra il legame M-H e nello stesso istante si ha l'eliminazione di acetone (derivante dall'isopropanolo). In questo modo si forma un nuovo alcossido che viene poi protonato dalla molecola donatrice. Come ultimo passaggio si ha il rilascio di un alcol

dal metallo. Nel secondo caso, se consideriamo la catalisi di Noyori, si ha la presenza di un legante amidico fortemente basico che permette la deprotonazione dell'alcol da parte del donatore di azoto nucleofilo, con simultaneo trasferimento di un idruro all'atomo di rutenio adiacente, passando per uno stato di transizione altamente reattivo. Il trasferimento del protone e dell'idruro rispettivamente dall'ammina e dal rutenio al chetone porta alla formazione dell'alcol. In questa reazione, il legante ha il ruolo fondamentale di attivare il carbonio del substrato insaturo e l'idruro nucleofilo. Entrambi i meccanismi risultano più complessi rispetto alla semplice reazione mostrata nella riduzione MPV di figura 1.

Infine, le ultime tipologie di TH sono quelle che non utilizzano complessi metallici come catalizzatori, definite anche organo-catalitiche per la natura delle sostanze utilizzate. Per esempio, è stato scoperto che utilizzare amminoacidi, o acidi di Brønsted consente comunque di raggiungere attività catalitiche notevoli.^[1]

Non necessariamente è fondamentale utilizzare un catalizzatore. Infatti, si è visto che certe TH di carbonili sono possibili a temperature elevate (220-400°C) utilizzando alcoli supercritici. Tuttavia, le condizioni più drastiche e difficili da mantenere non hanno consentito a questi processi di avere applicazioni pratiche o su larga scala. L'unica soluzione trovata è stata nell'utilizzare idrossidi basici per facilitare la reazione, come KOH o NaOH, che catalizzano reazioni di TH di aldeidi e chetoni nei rispettivi alcoli primari e secondari in presenza di 2-PrOH come fornitore di protoni.

È doveroso ricordare che all'interno del nostro corpo avvengono reazioni di TH catalizzate da enzimi che coinvolgono il principale donatore di idrogeno, cioè la nicotinammide dinucleotide nella sua forma ridotta (NADH).^[6]

1.2. Definizione e ruolo del NADH

Nelle cellule eucariote, le principali molecole fornitrici di idruri sono NADH e la nicotinammide adenina dinucleotide fosfato ridotto (NADPH), le cui strutture (incluse le loro forme ossidate) sono riportate in figura 6.

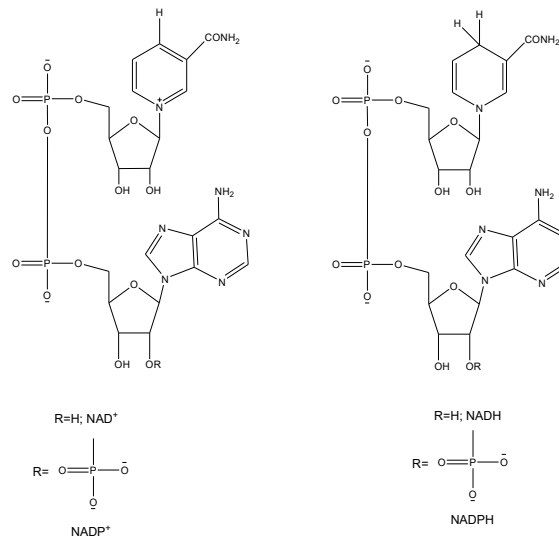


Figura 6. Strutture relative al NAD(P)H e NAD(P)⁺. [6]

I potenziali di riduzione standard (E°) di entrambe le specie è pari a -0.32 V [6], indicando che sono facilmente ossidabili. Infatti, l'origine di queste molecole è dovuta dalla presenza di numerosi enzimi

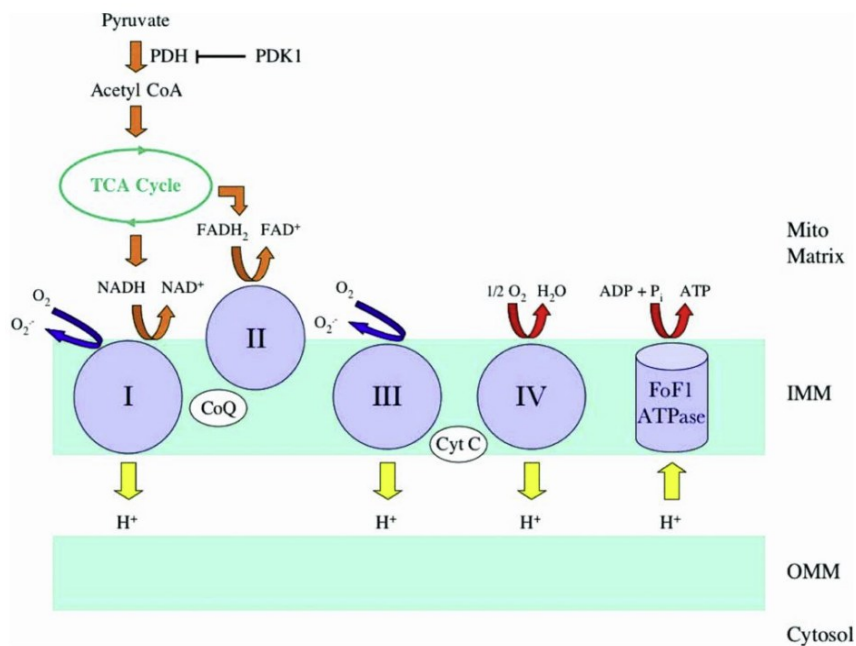


Figura 7. Schema della fosforilazione ossidativa, in particolare focalizzata nella struttura dei complessi presenti nel mitocondrio.

nelle cellule che favoriscono reazioni redox con queste tipologie di molecole. Un esempio tipico è

l'isocitrato deidrogenasi che in presenza di isocitrato riduce NAD^+ con liberazione di CO_2 , dove il *transfer* di idruro avviene nell'anello piridinico in posizione *para* rispetto all'azoto con carica positiva. Questa reazione è fondamentale per la cellula, dato che fa parte del meccanismo della respirazione cellulare, in particolare nel ciclo di Krebs nei mitocondri. Le forme NAD^+/NADH giocano un ruolo importante nel mantenere l'equilibrio redox intercellulare. L'obiettivo principale di queste molecole è quello di fungere da coenzimi nella fosforilazione ossidativa, perché grazie al trasporto di elettroni all'interno del mitocondrio (descritto in figura 7) si forma un gradiente di protoni trans-membrana che promuove la formazione dell'adenosina trifosfato (ATP), fonte principale di energia del nostro organismo.^[7]

Mediante la glicolisi, il glucosio viene convertito in piruvato, il quale, appena entra nel mitocondrio, viene ossidato in acetil-coenzima A mediante il complesso del piruvato deidrogenasi (PDH). Durante il ciclo di Krebs si ha la riduzione del NAD^+ e della flavina adenina dinucleotide (FAD), coenzima con lo stesso ruolo. Nel mitocondrio sono presenti quattro complessi principali, nei quali avvengono reazioni redox dove il trasferimento di elettroni fornisce energia necessaria ai sistemi per pompare protoni (H^+) nello spazio intermembrana. In particolare, nel complesso I, il NADH si ossida e cede due elettroni alla flavina mononucleotide (FMN), che a sua volta li trasferisce all'ubichinone (UQ), un trasportatore mobile. Nel complesso II avviene l'ossidazione del FADH_2 e i relativi elettroni vengono trasferiti sempre al UQ, in questo caso non si ha pompaggio di protoni. Nel complesso III si ha trasferimento di elettroni dall'ubichinone al citrocromo C, emoproteina che ha il ruolo nel complesso IV di ridurre l'ossigeno molecolare ad acqua fornendo gli elettroni.

Durante il trasferimento degli elettroni si crea un gradiente di protoni e di pH tra la matrice mitocondriale e lo spazio intermembrana. Per ristabilire l'equilibrio è presente un enzima molto complesso: l'ATP sintasi (figura 7). Esso è principalmente costituito da due domini/motori, F0 e F1, entrambi costituiti da subunità. Nel primo dominio si ha il flusso di protoni che fa ruotare il complesso di subunità, e questa rotazione induce il movimento delle unità nel dominio F1, nel quale si lega l'adenosina difosfato (ADP) e viene convertita in ATP. Complessivamente si ha la trasformazione di un gradiente chimico in energia chimica fondamentale.^[7] Evidenziando come le specie NAD^+/NADH risultino fondamentali per il proseguimento della fosforilazione ossidativa, l'utilizzo di complessi metallici che vadano ad alterare il rapporto e di conseguenza eliminare la possibilità di utilizzare protoni per le reazioni successive, può portare alla morte cellulare.

2. Scopo della tesi

In generale, i complessi metallici sono sempre utilizzati come catalizzatori in diverse reazioni, dove le condizioni sono ben definite, come le concentrazioni di catalizzatore, solvente e substrato e la temperatura. Tuttavia, anche se si prendono tutte le precauzioni del caso, spesso i catalizzatori vengono avvelenati. In natura esistono metallo-enzimi in grado di catalizzare diverse reazioni biochimiche intercellulari spesso fondamentali per la vita. L'aspetto importante da considerare è che queste molecole sono in grado di lavorare in ambienti complessi, reso possibile dal fatto che lo ione metallico (come Fe, Cu, Zn e Mg) è incorporato all'interno di proteine, garantendo una protezione elevata. Inoltre, la struttura complessa del catalizzatore possiede diversi siti di reazione per permettere il riconoscimento del substrato, rendendo le reazioni coinvolte molto selettive. Per questo motivo, nel corso degli anni si sono sviluppati una serie di enzimi metallici artificiali per raggiungere gli stessi risultati; recentemente, si sono sviluppati complessi a base di Ru, Rh, Ir in grado di catalizzare reazioni di trasferimento di idrogeno all'interno delle cellule. Questi catalizzatori possono indurre un ambiente riducente utilizzando formiato come fornitore di idrogeno o un ambiente ossidativo utilizzando NAD(P)H come fornitore di idrogeno. In certi casi, la reazione può essere catalizzata mediante assorbimento di radiazione luminosa da parte del metallo o da centri flavinici presenti nelle flavoproteine.^[8] Mediante una serie di esperimenti è stato dimostrato che indurre le reazioni di riduzione di NAD^+ porta alla morte cellulare alterando l'equilibrio redox. In questo elaborato ci si soffermerà sulle reazioni che portano all'ossidazione di NADH a NAD^+ , verificando se anche questa strada possa alterare l'equilibrio cellulare modificando il rapporto NAD^+/NADH . Inoltre, analizzando i vari esperimenti effettuati sarà possibile fare delle ipotesi sul meccanismo di reazione, capendo quali sono i passaggi più importanti per favorire la reazione e vedere quali condizioni (es. pH, T) possano rendere la reazione più veloce e favorevole.

3. Principali reazioni di ossidazione di NADH a NAD⁺

La riduzione intracellulare di NAD⁺ a NADH mediante la presenza di un donatore di idrogeno porta all'alterazione dell'equilibrio redox intracellulare e alla morte della cellula. Il processo inverso, cioè reazioni di ossidazione utilizzando NADH come fornitore di idrogeno possono avvenire sia in ambiente acquoso che nelle cellule. Complessi *half-sandwich* di iridio (III) e di rutenio (II) con le seguenti strutture: [(Cp^x)Ir(phen)(H₂O)]²⁺ e [(arene)Ru(N,N')Cl]⁺ possono catalizzare la riduzione di chetoni utilizzando NADH come fornitore di idrogeno in ambiente acquoso; le strutture sono descritte in figura 8.

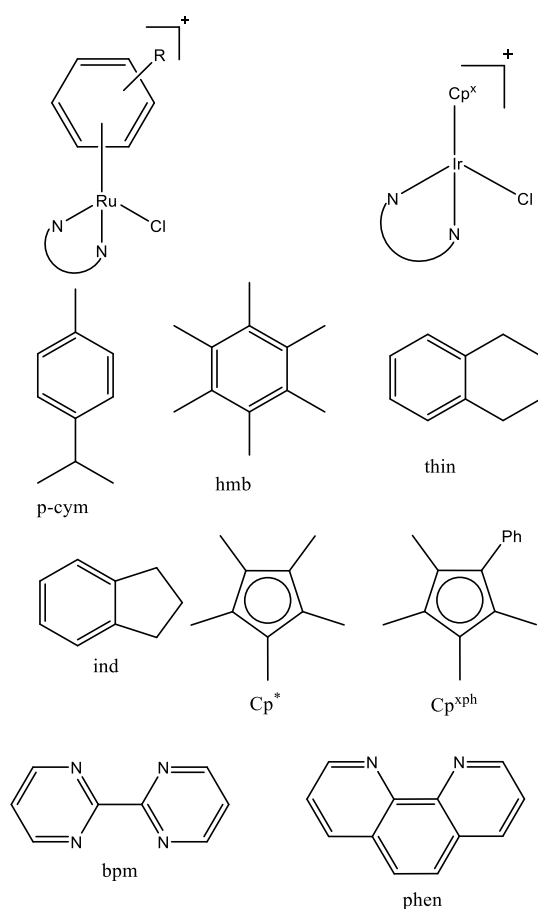


Figura 8. Catalizzatori a base di Ir^{III} e Ru^{II} per l'ossidazione di NADH in ambiente acqueo.^[6]

Nello specifico, ne esistono 2 a base di iridio e 5 a base di rutenio, e nella tabella seguente sono indicate le diverse tipologie di leganti ancorati al centro metallico.

Tabella 1. Descrizione della formazione dei diversi complessi di iridio e rutenio rappresentati in figura 8.^[6]

Numero complesso	Metallo	Arene/Cp ^x	N, N
1	Ir	Cp [*]	phen
2	Ir	Cp ^{xph}	phen
3	Ru	p-cym	bpm
4	Ru	hmb	bpm
5	Ru	ind	bpm
6	Ru	thin	bpm
7	Ru	p-cym	phen

Entrambi i complessi di iridio selezionati sono in grado di generare idrogeno molecolare dall'ossidazione di NADH e, in condizioni fisiologiche (pH 7.4, 310 K), si raggiungono valori di TON pari a 75 dopo 24 ore e un TOF pari a 4.3 h⁻¹.^[6] In particolare, il catalizzatore numero 2, rispetto al numero 1 raddoppia il rapporto NAD⁺/NADH all'interno delle cellule tumorali A2780 (cancro ovarico), indicando che c'è un'attività elevata legata alla modifica dell'equilibrio redox cellulare.

Per comprendere bene il meccanismo di reazione è stato utilizzato il modello legato alla teoria del funzionale della densità o DFT (*Density Functional Theory*), una teoria quantistica sviluppata da Hohenberg e Kohn per lo studio di sistemi a molti elettroni. La teoria si basa principalmente sul fatto che in un sistema ricco di elettroni (come una molecola) che è soggetto a un potenziale esterno, la somma dei contributi cinetici e di repulsione coulombiana dipendono da una funzione universale legata dalla densità elettronica. Dal minimo di questa funzione è possibile ricavare il numero di particelle allo stato fondamentale. In questo modo si può determinare la struttura geometrica della molecola a diversi istanti della reazione.^[9]

Il meccanismo suggerito dal modello indica che avviene il trasferimento di un idruro da NADH verso il centro metallico passando per la formazione di uno stato di transizione a sei centri, che a seguito dello "scivolamento dell'anello" del legante (o cambio di apicità), cioè l'anello aromatico diminuisce il numero di legami con il centro metallico (figura 9)^[10], si crea un sito vacante dove un idrogeno del NADH si lega a ponte con il metallo. I legami Ru-H e Ir-H sono visibili al ¹H NMR a -7.44 ppm e -11.3 ppm rispettivamente.^[6]

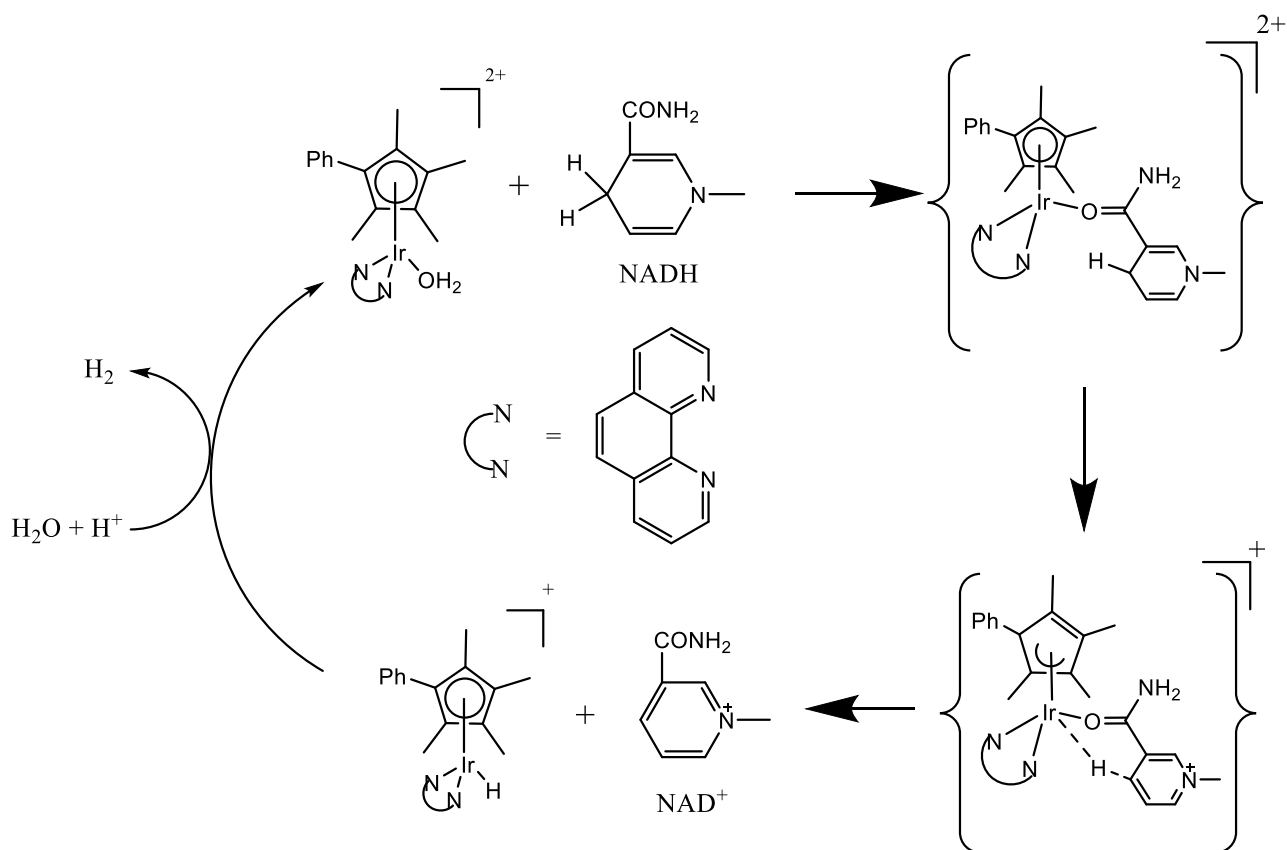


Figura 9. Meccanismo proposto per il trasferimento di idrogeno da NADH a H⁺ per via del complesso di Ir.^[6]

Come si vede in figura 9, dopo la formazione dell'intermedio si ha il distacco del complesso con rilascio di NAD⁺ e successivamente il complesso reagisce con l'acqua in soluzione tornando allo stato iniziale e rilasciando H₂. Per l'ultimo passaggio, legato alla formazione del prodotto finale, è fondamentale che il pH sia mantenuto acido per favorire la presenza di protoni disponibili a ricevere l'idruro fornito dal complesso metallico. Invece, altri due complessi a base di iridio (III) con le seguenti strutture: [(Cp^xbiph)Ir(phpy)(Cl)] e [(Cp^xbiph)Ir(phpy)(py)]⁺, dove Cp^xbiph indica il bifenilte tetrametil ciclopentadienile, phpy indica la fenilpiridina e py la piridina, sono in grado di trasferire idrogeno da NADH a O₂ (figura 10), mostrando una possibile via per la produzione di H₂O₂. Tra i due complessi, il primo risulta più veloce nel trasferire il protone, probabilmente dovuto all'elevata tendenza all'idrolisi per la presenza del legante cloruro.

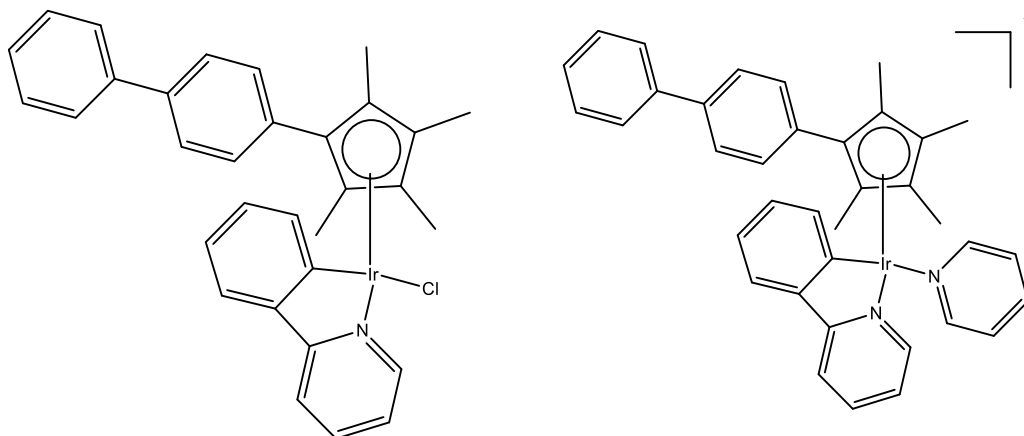


Figura 10. Strutture dei complessi a base di Ir (III) usati come catalizzatori nelle reazioni di TH con produzione di H₂O₂.^[6]

Il meccanismo che viene proposto nella figura seguente è simile a quello visto nel caso prima.

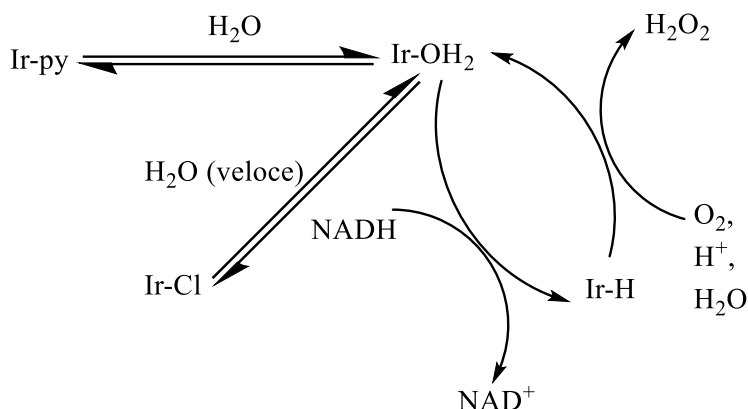


Figura 11. Meccanismo catalizzato proposto per la produzione di H₂O₂ mediante complessi di Ir (III).^[6]

Anche in questo caso, come in figura 9, si ha come primo passaggio la formazione del legame metallo-acqua, poi si lega NADH e si distacca sotto forma di NAD⁺. La specie metallo-idrurica, in presenza di acqua, ossigeno e H⁺, rigenera l'aquo specie e rilascia H₂O₂. Un modo per monitorare l'evoluzione della reazione è mediante l'utilizzo di strisce che rilevano la presenza di perossido di idrogeno, il cui funzionamento si basa principalmente sul fatto che nella striscia è presente una specie che in presenza di H₂O₂ reagisce cambiando colore in un blu intenso. Più reagente è presente, maggiore sarà l'intensità del colore. Ponendo in un bicchiere NADH e uno dei due complessi in figura 10 si è visto come immediatamente si ha la formazione di colore blu sulla cartina. Inoltre, questi complessi sono risultati attivi contro una serie di cellule tumorali, presentando attività maggiore rispetto all'utilizzo di *cisplatin*o (metallofarmaco di riferimento).^[11]

Si è visto che è possibile trasferire idrogeno da NADH a chinoni impiegando i seguenti complessi: [(Cp*)Ir(phen)(H₂O)]²⁺ e [(Cp^{xph})Ir(phen)(H₂O)]²⁺, le cui relative strutture sono riportate nella figura 12.

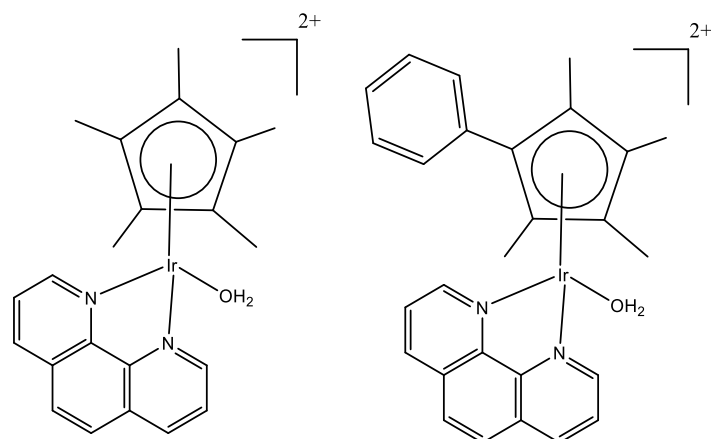


Figura 12. Strutture dei complessi a base di Ir (III) per la riduzione dei chinoni.^[6]

Come detto nell'introduzione, i chinoni (Q) svolgono un ruolo importante nel trasportare gli elettroni tra i vari complessi nel mitocondrio, venendo ridotti in semi-chinoni (QH[•]) e idrochinoni (QH₂) dal coenzima NAD(P)H in presenza di diversi enzimi. Nel caso dei complessi presi in esame, la riduzione mediante NADH avviene attraverso la generazione di intermedi Ir-H, il cui meccanismo proposto è stato investigato mediante calcoli DFT (figura 13).

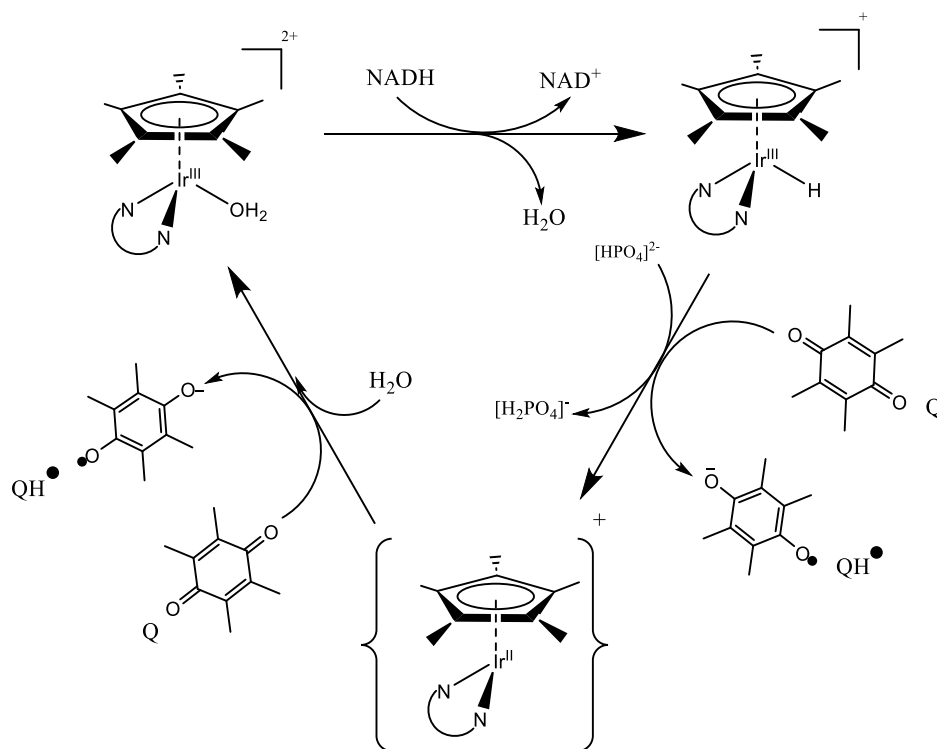


Figura 13. Ciclo catalitico di riduzione dei chinoni mediante sistema NADH/Ir (III).^[6]

Come si vede nel meccanismo, avvengono due trasferimenti monoelettronici, dove il primo porta alla formazione del primo semi-chinone e di uno stato di transizione del complesso Ir, che passa dallo stato di ossidazione III a II. Il secondo elettrone viene trasferito dal complesso attivato ad un secondo chinone, rigenerando il complesso. La specie di Ir(II) è molto instabile, favorendo la reazione per la

sua elevata reattività. Da questo meccanismo possiamo vedere come il complesso metallico ha la capacità di modificare il potere riducente del NADH, che di solito cede due elettroni contemporaneamente in due passaggi consecutivi di trasferimento di un singolo elettrone. Inoltre, la formazione dei semi-chinoni è evidenziata da un valore di pK_a relativamente basso (pari a 5); quindi, all'interno della cellula ($pH = 7.2$) è evidente la predilezione per la formazione di tali molecole. Dei tre passaggi che costituiscono il meccanismo sono stati analizzati i valori di energia potenziale ed energia libera di superficie; nel passaggio di rigenerazione del complesso e formazione del prodotto sono stati registrati valori ottimali di energia potenziale di superficie ($-5.4 \text{ kcal mol}^{-1}$) e valori elevati di energia libera di superficie ($+9.5 \text{ kcal mol}^{-1}$). Considerando tali valori e i valori bassi registrati negli altri passaggi in entrambe le tipologie di energie, si deduce che il trasferimento di idrogeno da parte del complesso per formare il prodotto sia lo stadio limitante, indicando che il complesso di Ir(II) sia più propenso a tornare nella sua forma idrata. Per favorire il proseguimento della reazione viene integrata la soluzione con un buffer fosfato che facilita il secondo passaggio del meccanismo. Così la reazione viene resa unidirezionale e viene garantito il suo proseguimento. Nel complesso, la reazione mostra come sia possibile alterare processi biochimici nelle cellule, intervenendo direttamente nelle specie coinvolte nelle reazioni.

In tale contesto, alcuni ricercatori sono stati in grado di trasferire idrogeno da NADH a diverse aldeidi in PBS (tampone fosfato salino) o in una cultura cellulare a $pH 7.4$ e 37°C in presenza di diverse biomolecole e ioni metallici mediante l'utilizzo di complessi a base di iridio(III) contenenti piridine carbossamide. Questi complessi sono molto attivi nell'idrogenazione di aldeidi citotossiche, e le strutture dei complessi sono visibili nella figura seguente.

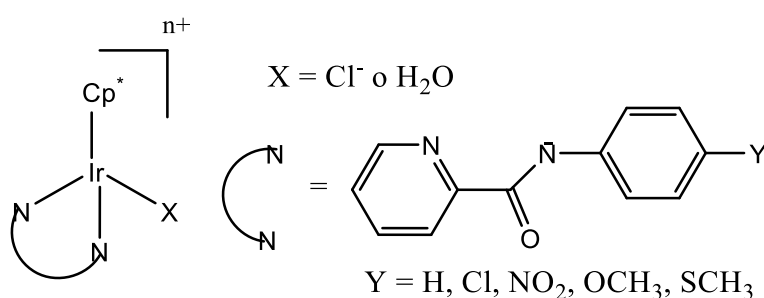


Figura 14. Catalizzatori a base di Ir^{III} per la TH usando NADH come fornitore di idrogeno.^[6]

Complessi con struttura simile sono in grado di convertire aldeidi in alcoli utilizzando NADH come fornitore di idrogeno direttamente all'interno delle cellule.

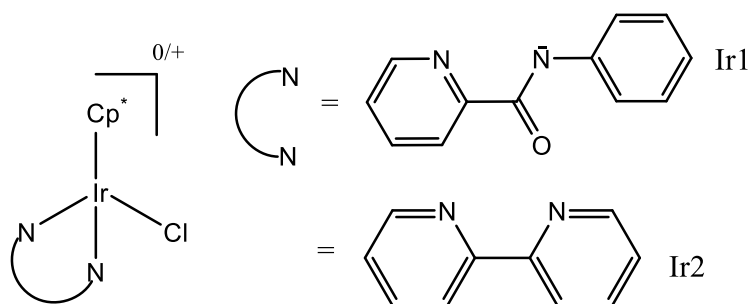


Figura 15. Complessi metallici utilizzati come catalizzatori per la conversione di aldeidi in alcoli mediante TH.^[6]

Questa reazione può essere monitorata in tempo reale mediante l'utilizzo un substrato fluorogenico BODIPY-CHO e analizzare l'evoluzione mediante microscopia confocale. Il substrato è costituito da un'unità di boro-dimetilpirrolo poco fluorescente, che in presenza di NADH e del catalizzatore si riduce a BODIPY-OH, una forma altamente fluorescente visibile nell'UV.^[12] L'analisi del campione di cellule soggette a questa reazione non viene effettuata utilizzando un microscopio tradizionale, altrimenti si genererebbe un elevato rumore di fondo per illuminare il campione. Per questo si utilizza la microscopia confocale, la quale utilizza un fascio di luce in ingresso concentrato su un piccolo punto del campione, solitamente largo pari alla lunghezza d'onda della radiazione (circa 0.5 μm). Inoltre, la radiazione emessa dal campione non viene osservata direttamente ma viene riflessa e proiettata. Un altro problema della microscopia classica è che parte della luce riflessa possa disperdersi, causando una sfocatura dell'immagine risultate. La microscopia confocale risolve questo problema utilizzando un piccolo foro di apertura che consente di far passare solo la luce emessa dal punto desiderato. Lo strumento è collegato ad un computer così permette lo sviluppo dell'immagine del campione.^[13] Con questo metodo sono state analizzate quattro linee cellulari contenenti diverse soluzioni: BODIPY-CHO, BODIPY-OH, BODIPY-CHO e il complesso Ir1, BODIPY-CHO e il complesso Ir2. I risultati ottenuti mostrano un'elevata fluorescenza nei casi in cui è presente solo il BODIPY-OH o BODIPY-CHO e il primo complesso, dimostrando come il complesso Ir1 è in grado di catalizzare la reazione di TH di una aldeide in presenza di NADH. D'altra parte, il secondo complesso non possiede grandi attività catalitiche dato che non si è registrata una fluorescenza significativa nella soluzione. Se consideriamo il primo complesso, possiede un'anilide carbonica (-N-C=O) che funge da sito base per facilitare l'acquisizione di idrogeno da parte del complesso formando la sua forma idrata; invece, il secondo possiede solamente una bipyridina come legante che non funge da sito base, ostacolando il primo passaggio della reazione. Per verificare la correlazione tra la quantità di NADH e la formazione del prodotto finale sono state analizzate cellule trattate con: Ir1, BODIPY-CHO e piruvato di sodio. Quest'ultima specie è un naturale metabolita che riduce la velocità di glicolisi consumando NADH. L'analisi di queste linee cellulari ha evidenziato la scomparsa della fluorescenza, indicando come la poca presenza di NADH, consumato dal piruvato,

ostacoli la reazione di TH. Come ultimo esperimento è stata eseguita la spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente (ICP-MS) nelle stesse colonie per verificare la presenza di iridio all'interno delle cellule, per dimostrare che i complessi sono in grado di attraversare la membrana cellulare e di far avvenire la reazione intracellulare. Anche in questo caso i risultati ottenuti hanno evidenziato che il primo complesso è quello presente in maggiore quantità all'interno delle cellule, dimostrando che oltre ad avere attività catalitiche maggiori possiede una struttura che facilita l'attraversamento della membrana cellulare.^[14] Questa tipologia di reazione biocompatibile permette di fornire nuovi approcci biotecnologici e strategie innovative di bio-coniugazione intracellulare.

Di recente è stato scoperto un complesso a base di Ru(II) in grado di colpire direttamente il mitocondrio, mostrando una citotossicità contro le cellule tumorali A549 attraverso l'ossidazione di NADH e attivando la depolarizzazione della membrana mitocondriale. In questo modo si porta alla morte cellulare attraverso l'arresto del ciclo cellulare nelle prime fasi. Inoltre, tra gli ultimi complessi sviluppati c'è una nuova classe di complessi a base di Ir (III) (figura 16) legati a carbeni *N*-eterociclici (NHCs) con capacità di trasferimento di idrogeno.

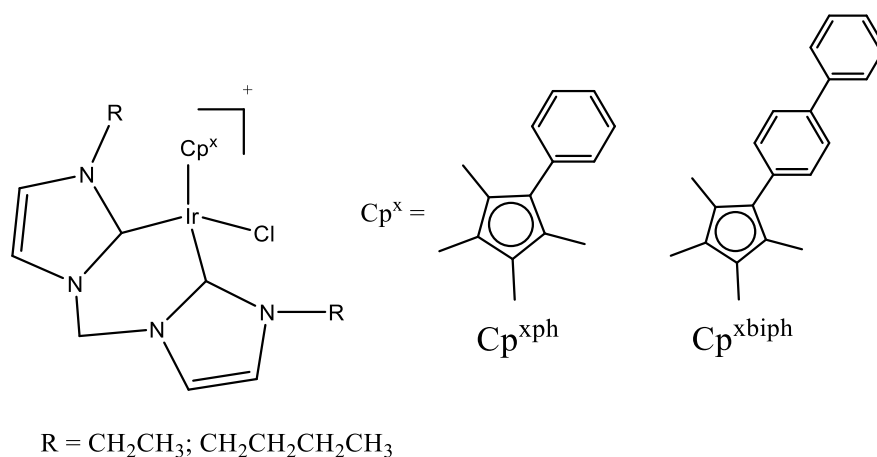


Figura 16. Complessi a base di Ir (III) legati con *cis*-carbeni per l'ossidazione di NADH.^[6]

Si è notato che il TON di questi complessi risulta due volte superiore rispetto alla serie di complessi visti precedentemente; questo è dovuto principalmente al fatto che i carbeni possiedono un elevato carattere elettron-donatore, rendendo il legame Ir-Cl molto instabile e reattivo verso la reazione di idrolisi che è il passaggio di attivazione della catalisi. L'introduzione di leganti N[^]C chelanti permettono di incrementare l'efficienza di complessi a base di Rh (III) per le reazioni di TH per l'ossidazione di NADH.

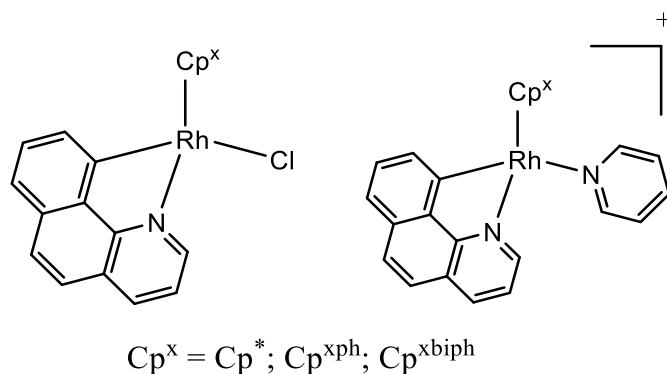


Figura 17. Complessi a base di Rh (III) con leganti chelanti N, C utilizzati per l'ossidazione di NADH.^[6]

Tra i complessi presenti in figura 17, quello che possiede il cloruro e Cp^{xbiph} mostra un $\text{TON} = 58$ e $\text{TOF} = 7.6 \text{ h}^{-1}$ in una soluzione costituita da MeOH al 1.6% e buffer di fosfato al 98.4% (pH 7.4 e 310 K) nella reazione di ossidazione di NADH e presenta un'elevata citotossicità verso le cellule tumorali A549. Anche in questo caso, l'attività dei complessi contenenti la piridina è molto più bassa rispetto a quelli contenenti il cloruro (figura 17); questo è dovuto principalmente all'elevata reattività verso l'idrolisi del cloruro rispetto alla piridina. Questo aspetto evidenzia ulteriormente che l'attivazione di questa tipologia di complessi è l'idrolisi di quest'ultimo, rendendolo attivo verso l'ossidazione di NADH.

Una condizione importante da considerare in queste reazioni è il pH, in particolare se NADH deve reagire con H^+ per formare idrogeno molecolare. Sperimentalmente si è notato come il seguente complesso di iridio (figura 18) è in grado di catalizzare una reazione di TH tra NADH e H^+ con produzione di H_2 in soluzione acquosa acida a temperatura e pressione ambiente.

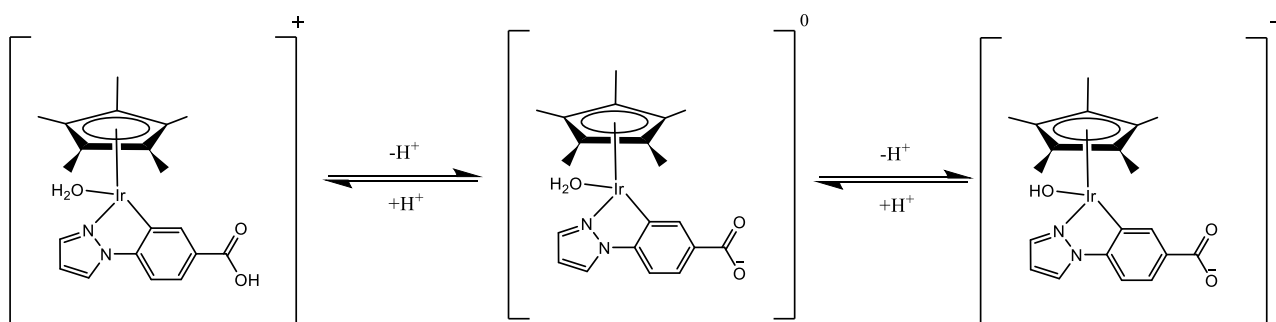


Figura 18. Equilibrio acido-base dei complessi di iridio in soluzione acquosa con relative strutture.^[15]

Dato che il complesso viene sintetizzato utilizzando acido benzoico in soluzione acquosa, si ottiene la forma protonata. Tuttavia, in base al pH della soluzione, il complesso può rilasciare uno o due protoni formando la specie neutra o anionica rispettivamente. Mediante titolazione si sono determinati i valori di pK_a dei primi due complessi, ottenendo valori pari a $\text{pK}_{a1} = 4.0$ e $\text{pK}_{a2} = 9.5$ ^[15]. Dato che la reazione avviene in soluzione acquosa, il complesso neutro risulta poco solubile, ostacolando la

sua attività catalitica. Tuttavia, mediante l'analisi strutturale a raggi X su cristallo singolo è stato possibile verificare la sua presenza e che partecipa alla reazione. Analizzando una soluzione acida contenente il complesso protonato e NADH si è verificato che il prodotto di ossidazione è NAD^+ mediante spettroscopia $^1\text{H-NMR}$. Attraverso l'analisi delle integrazioni dei segnali $^1\text{H-NMR}$ relativi al reagente e al prodotto si è calcolata una resa pari al 96% e un TON di 6.9 in 20 min. Successivamente, si è notato che aumentando la concentrazione di complesso si otteneva un incremento di idrogeno molecolare prodotto, indicando che più complesso è disponibile, più facilmente avverrà la reazione. Inoltre, diminuendo il pH di lavoro si ha un incremento notevole del TOF della reazione, questo perché a pH più acido si ha più H_3O^+ libero per la reazione; l'analisi è stata ottenuta diagrammando il TON contro il tempo (min) a diversi pH. Per comprendere il meccanismo è stata eseguita una spettrometria di massa mediante la tecnica ESI (*Electrospray ionization*) dove la soluzione viene iniettata e nebulizzata all'interno dello strumento, identificando la formazione del complesso idrurico. Il meccanismo è schematizzato nella seguente figura.

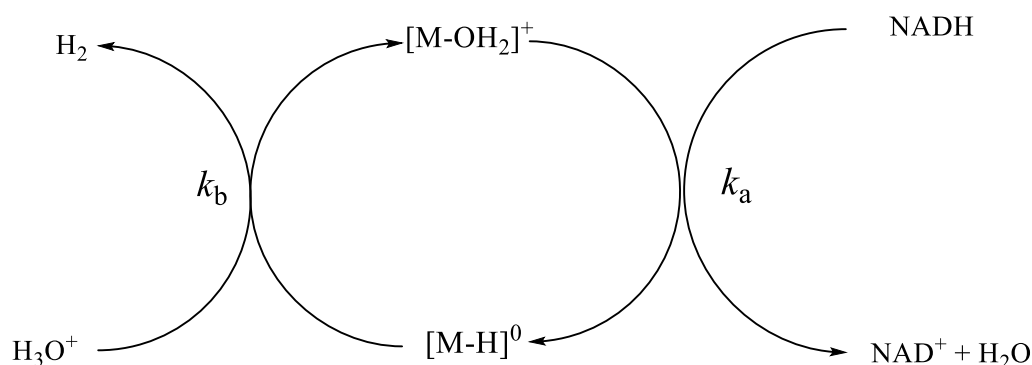


Figura 19. Meccanismo proposto per la TH di H_3O^+ catalizzata dal complesso di Ir in presenza di NADH.^[15]

Come in ogni caso visto in precedenza, il primo passaggio consiste nella formazione del complesso idrurico ad opera del NADH. Successivamente si ha la formazione di idrogeno molecolare e rigenerazione del complesso iniziale. La stessa reazione avviene anche con il complesso neutro ma a velocità ridotte. Analizzando l'andamento del TOF della reazione al variare della concentrazione di NADH si è notato una specie di saturazione del TOF dopo circa 3 mM di reagente, indicando che la quantità di NADH non è rilevante sulla modifica della velocità di reazione. Escludendo il primo passaggio, rimane solo il rilascio dell'idrogeno da parte del complesso idrurico come stadio limitante della reazione. Attraverso analisi cinetiche si dimostra che il TOF dipende dalla costante cinetica k_b (figura 19). Inoltre, si è verificato che all'aumentare della produzione di NAD^+ si ha un rallentamento nello sviluppo di H_2 ; questo è dovuto principalmente al fatto che NAD^+ si possa legare al complesso di iridio, ostacolando la reazione.

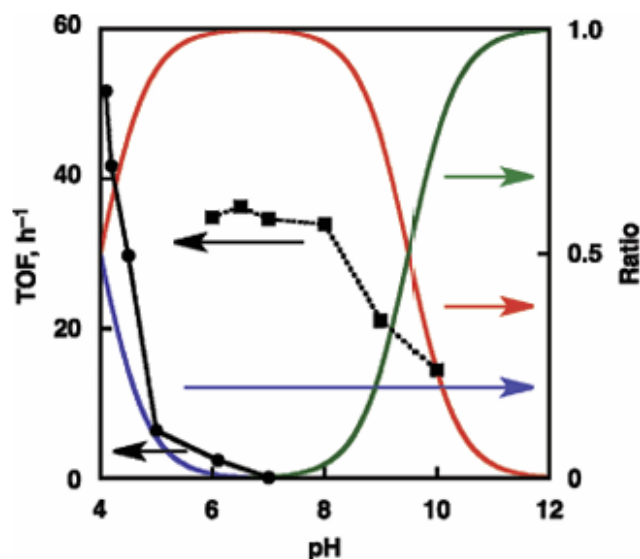


Figura 20. Dipendenza dal pH della reazione, dove i cerchi indicano la reazione di ossidazione di NADH e i quadrati la riduzione di NAD⁺. La linea blu indica la quantità del complesso protonato, la rossa di quello neutro e la verde di quello deprotonato, espresso in rapporti.^[15]

In figura 20 si vede come al cambiare del pH la velocità di reazione (espressa in TOF) aumenta o diminuisce in base al tipo di reazione. Focalizzandosi nella reazione di ossidazione di NADH con produzione di H₂ si evidenzia come aumenti la velocità di reazione a pH sempre più acidi; inoltre, a pH pari a 6 si ha la formazione del complesso carico positivamente, stesso punto in cui si ha una crescita del TOF. A pH maggiori, dove il complesso neutro è stabile si ottengono valori bassi o nulli di TOF. Questo è dovuto principalmente al fatto che allo stesso tempo si favorisce la reazione opposta di riduzione di NAD⁺. Questo grafico dimostra che la reazione in analisi è in equilibrio con la reazione opposta, dove in base al pH si favorisce una delle due, diventando un parametro fondamentale per determinare quali prodotti generare.

Con lo stesso catalizzatore si è notata un'attività catalitica simile a quella del complesso I nel ciclo respiratorio cellulare (figura 7). Nel primo complesso si ha la l'ossidazione di NADH con il trasferimento di due elettroni all'ubichinone (UQ) generando l'ubiquinolo (UQH₂) e NAD⁺. Inoltre, il complesso I è responsabile della riduzione di O₂ da parte di NADH nel formare H₂O₂, solo che in presenza di enzimi analoghi all'ubichinone non avviene questa reazione. In generale, trovare reazioni non enzimatiche che simulano l'attività del complesso I risulta molto difficile, perché NADH è stabile solo a pH cellulare e in queste condizioni UQ non è solubile. Tuttavia, utilizzando un sostituto all'ubichinone, in questo caso il 2,3-dimetossi-5-metil-1,4-benzochinone (Q₀), solubile in soluzione cellulare si è dimostrato come il complesso protonato in figura 18 sia in grado di ridurre Q₀ nel corrispettivo ubiquinolo (Q₀H₂) in presenza di NADH e buffer fosfato, con ulteriore sviluppo di H₂O₂.^[16] Considerando che si lavora a pH neutro il complesso risulta nella sua forma neutra e analizzando lo spettro UV-vis della soluzione all'istante iniziale e dopo 10 minuti si può notare come

le bande relative a NADH (260 e 240 nm) e Q_0 (269 nm) spariscono e si inizi a formare la banda relativa al NAD^+ (260 nm), in presenza del complesso di Ir.

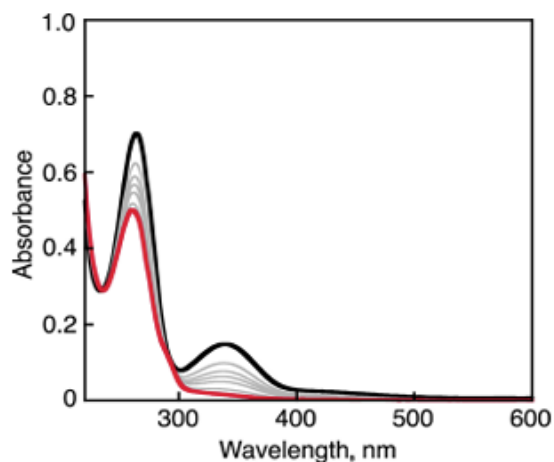


Figura 21. Spettro di assorbimento UV-visibile di una soluzione contenente NADH, Q_0 e il complesso di Ir registrati a $t = 0$ min (linea nera) e a $t = 10$ min (linea rossa).

Nel grafico in figura 21 si evidenzia come l'assorbanza a $\lambda = 260$ nm si riduca nel tempo, dovuto al fatto che in parte si ha il consumo di NADH, ma nello stesso istante si ha produzione di NAD^+ che "allieva" l'abbassamento di assorbanza; in più, la scomparsa della banda a maggiori lunghezze d'onda dimostra facilmente la scomparsa del reagente. Inoltre, si è notato come in assenza del complesso non si ha nessun cambiamento nello spettro, dimostrando che la sua presenza è fondamentale nella reazione. Il fatto che nella linea rossa non ci sia un picco a 320 nm dimostra che non ci sia la formazione del radicale anione semichinone ($Q_0^{\cdot-}$). L'insieme di questi dati suggeriscono il meccanismo illustrato nella seguente figura.

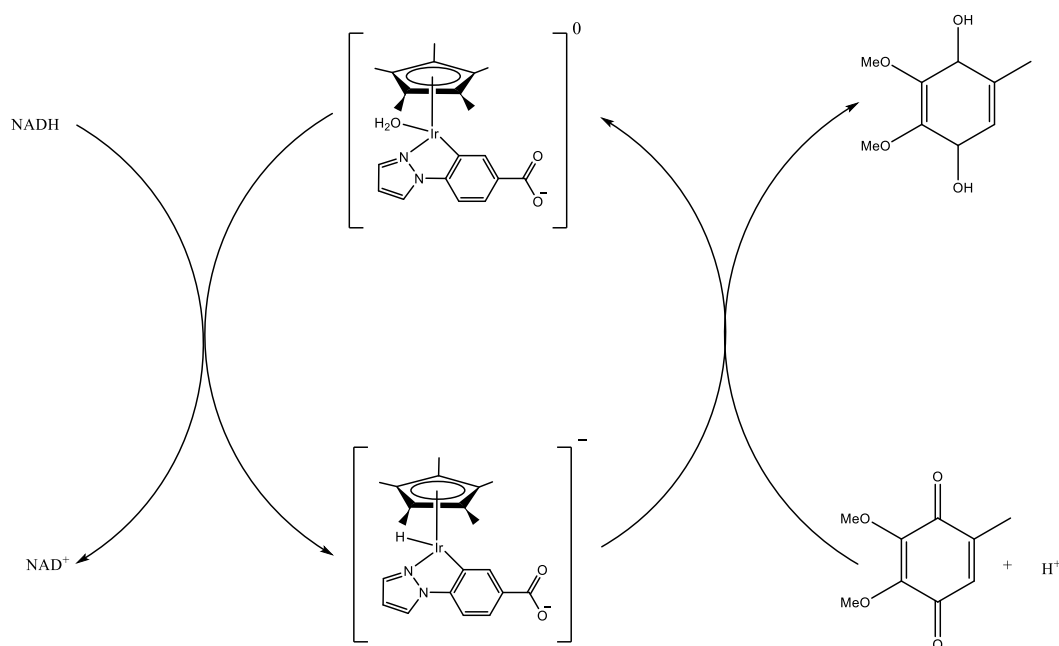


Figura 22. Ciclo catalitico della riduzione di Q_0 da parte di NADH in presenza del complesso di Ir.^[16]

Anche in questo caso si ha la formazione del complesso idrurico che riceve l'idrogeno da NADH per trasferirlo poi a Q_0 e formare Q_0H_2 . Se il pH della soluzione diventa basico, mediante aggiunta di una soluzione di NaOH, si nota la formazione di una banda di assorbimento a 307 nm nello spettro UV-vis, indicando la formazione dell'ubiquinolo deprotonato (Q_0H^-), e se si aumenta la quantità di base presente si osserva il trasferimento della banda a 311 nm, indicando la formazione del relativo dianione (Q_0^{2-}). Se la soluzione è a contatto con l'aria, la quantità di ubiquinolo a pH neutro rimane stabile per alcuni minuti e successivamente si inizia a registrare un calo della concentrazione. La reazione tra Q_0H_2 e O_2 porta alla formazione di Q_0 e H_2O_2 ; il fatto che avvenga questa reazione è dimostrabile mediante l'utilizzo delle cartine sensibili al perossido di idrogeno da immergere nella soluzione (in questo caso la cartina diventa di colore azzurro, verificando la presenza di H_2O_2). Quindi, globalmente la reazione è costituita da una serie di passaggi dove il complesso metallico e Q_0 si rigenerano in maniera ciclica finché è presente NADH e O_2 che favoriscono le reazioni. Nella figura seguente si può analizzare come il pH influenzi la reazione. A pH sempre più basici si verifica un calo nella produzione di H_2O_2 perché, oltre al fatto che Q_0H_2 viene deprotonato nei relativi anioni, diventando inefficace per reagire con O_2 , si ha la deprotonazione del complesso di Ir, diventando anche lui un anione con attività catalitiche quasi nulle. Per verificare quale sia lo stadio limitante della

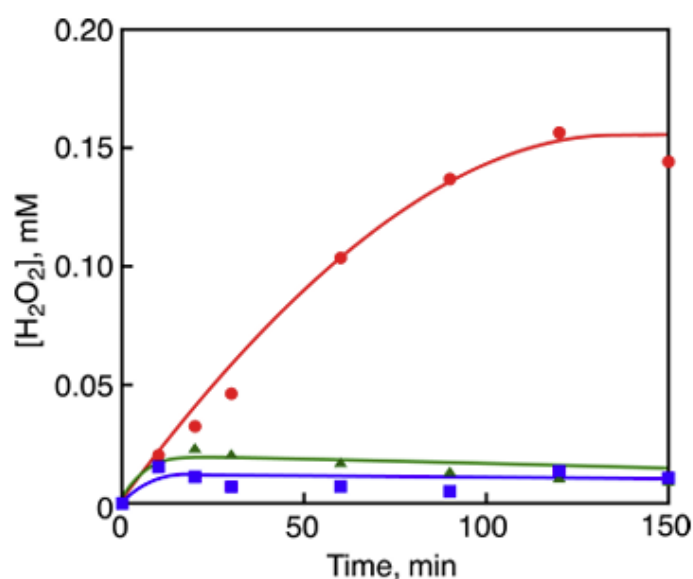


Figura 23. Produzione di H_2O_2 nel tempo in presenza di NADH, Q_0 e del complesso di Ir a diversi pH: 8.0 (linea rossa), 9.0 (linea verde) e 10.4 (linea blu).^[16]

reazione si sono variate le concentrazioni dei relativi reagenti e si è analizzato come variava la produzione di H_2O_2 . Variando il complesso e NADH non si sono registrate variazioni significative, però variando la quantità di ossigeno disponibile e di Q_0 si sono registrate delle variazioni, indicando che lo stadio limitante è quello finale, dove le specie coinvolte sono Q_0 e O_2 che porta alla produzione di H_2O_2 (figura 24), mediante una reazione di secondo ordine globale:

$$r = k[Q_0][O_2]$$

Sperimentalmente si ottiene un valore di $k = 0.28 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, inferiore al valore di $44 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ della costante cinetica relativa alla reazione di ossidazione di NADH e alla formazione di Q_0H_2 .^[16] Analizzando una reazione contenente O_2 e Q_0H_2 , monitorata mediante spettrometria UV-vis, si nota una lenta crescita di produzione di Q_0 , per poi stabilizzarsi dopo qualche minuto. Se inizialmente si pone già una quantità di Q_0 si riduce il tempo richiesto per stabilizzare il livello. Invece, aggiungendo il complesso di Ir non si registra una variazione nelle tempistiche, suggerendo che il catalizzatore non partecipi alla reazione. La reazione di produzione di H_2O_2 può essere descritta come una reazione auto catalitica con la formazione di radicali come intermedi.

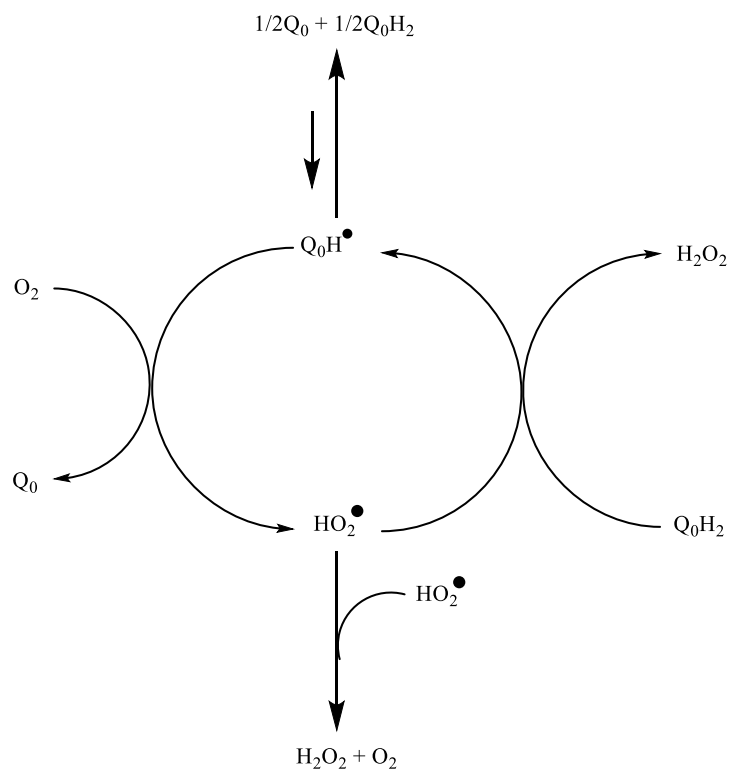


Figura 24. Reazioni cicliche auto catalitiche che coinvolgono radicali per l'ossidazione di Q_2H_2 mediante O_2 .^[16]

Da come si vede nel meccanismo, se si aumenta la quantità di Q_0 iniziale si riesce a generare una quantità sufficiente di Q_0H così da iniziare il ciclo catalitico; inoltre, da studi cinetici si dimostra che lo stadio determinante è l'estrazione dell'idrogeno dal primo radicale (Q_0H) per formare ulteriore Q_0 , e per questo motivo la sua quantità iniziale influenza notevolmente la velocità di reazione. Infine, si è notato come NADH possa essere rigenerato mediante riduzione di NAD^+ in presenza di H_2 e del catalizzatore; allo stesso modo il catalizzatore può ridurre O_2 con H_2 generando H_2O_2 . Queste reazioni complessive, partendo da reazioni cellulari, possono essere la base per lo sviluppo di perossido di idrogeno utilizzando vie più pulite rispetto ai soliti processi industriali.

Negli ultimi anni si è cercato di coinvolgere questi catalizzatori in reazioni che coinvolgono cascate enzimatiche. Si parla di cascata enzimatica quando si hanno una serie di reazioni consecutive (lineari o cicliche), con la formazione e immediato consumo di intermedi in cui sono coinvolti una serie di enzimi. Questa tipologia di reazione è utile per una serie di motivi: *i*) sono molto più veloci e risparmiano tempo rispetto alle reazioni a più passaggi, *ii*) nel caso in cui si formino degli intermedi tossici o instabili vengono subito consumati e trasformati nel prodotto finale e *iii*) riduce la possibilità che avvengano reazioni secondarie e incrementa il rendimento della reazione.^[17] Nel caso della tipologia di reazioni analizzate, l'obiettivo è quello di riuscire a rigenerare NADH per poter far proseguire la reazione, coinvolgendo l'utilizzo di altri enzimi. Degli studi sono riusciti a dimostrare che l'incorporazione di un cofattore (Cp*Ir), che possiede una porzione di biotina (vitamina B7) e 4,7-diidrossi-1,10-fenantrolina, all'interno della streptavidina (Sav) permette una reazione di TH con la riduzione di immine, utilizzando NADH come fornitore di idrogeno (figura 26). La streptavidina è una proteina estratta da batteri che presenta un'elevata affinità con la vitamina B7, dove il legame tra le due specie è uno dei legami non-covalenti più resistenti in natura. In questo caso, NADH viene rigenerato mediante la glucosio deidrogenasi (GDH) e includendo ulteriormente monoamino ossidasi e catalasi si genera una cascata enzimatica a quattro enzimi che produce ammine enantiopure.^[18] Per capire quale sia il legante migliore per il complesso metallico è stata eseguita una reazione di TH in presenza di NADH ed un'ammina, monitorando la quantità di NADH consumato. Lo schema di reazione e i leganti testati sono raffigurati nell'immagine seguente.

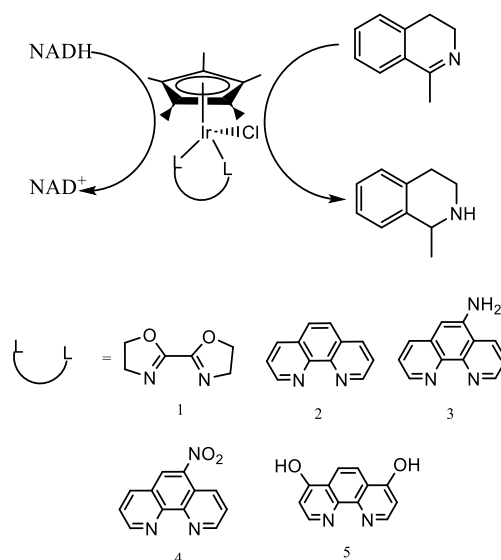


Figura 25. Reazione di TH di un immina in presenza di NADH con relative strutture dei leganti utilizzati.^[18]

Il meccanismo consiste sempre nella formazione del complesso idrurico con il rilascio del cloruro, che poi viene rigenerato a seguito del trasferimento dell'idrogeno. In questo caso, si sono analizzati una serie di leganti bidentati e monitorando mediante HPLC la quantità di prodotto ottenuto si è

calcolato la % di conversione ed il TON della reazione. Tra i vari leganti, solo i numeri 1 e 5 hanno presentato attività distinte, con TON superiore a 150 (figura 25). Tra i due, il numero 5 (4,7-diidrossi-1,10-fenantrolina) possiede attività migliore grazie all'elevata densità elettronica che fornisce al centro metallico. Trovato il miglior legante si è assemblato il catalizzatore finale legandolo con la porzione di biotina e incorporato nella streptavidina.

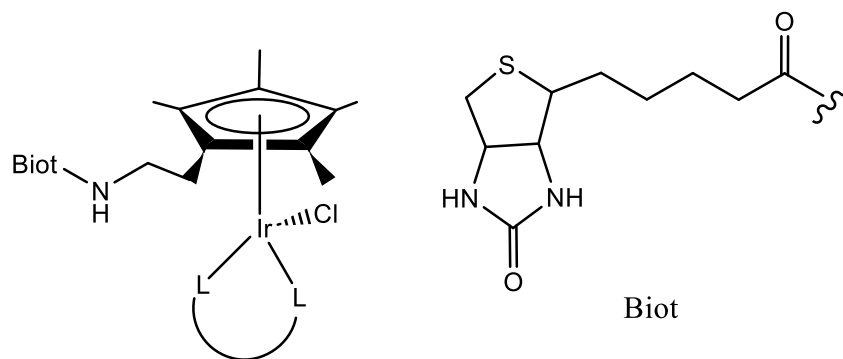


Figura 26. Struttura del complesso legato con la vitamina B7, con relativa struttura.^[18]

Combinando il catalizzatore e NADH con il glucosio deidrogenasi, è possibile, in presenza di glucosio, ridurre il NAD^+ per poter rigenerare ulteriore reagente. Per incrementare le prestazioni della reazione si sono testate diverse possibili isoforme di Sav. Inoltre, la rigenerazione di NADH avviene anche solamente in presenza di 1.2 equivalenti di glucosio, permettendo la conversione totale delle immine in soluzione. Poi si è verificata una conversione migliore in presenza di NADPH. L'unico problema è che l'eccesso enantiomerico ottenuto non era sufficiente (14% di *R*), però integrando la reazione con la monoammino ossidasi (MAO) e catalasi, si è favorita la produzione dell'enantiomero *R* del prodotto finale, ottenendo valori di *ee* pari al 99%. Questo avviene perché in presenza di MAO si ha l'ossidazione dell'enantiomero *S*. Successivamente, si è eseguita una modifica nella reazione, sostituendo GDH con un alcol deidrogenasi (ADH), altro enzima per rigenerare NADH. In questo caso si è analizzata la reazione di trasformazione di un amminoalcol lineare in una ammina ciclica, passando per un'ammina. Sperimentalmente si ottengono valori di conversione in immina pari al 12.8% e di ammina ciclica pari al 36.1%^[18]. L'attività particolare che si è registrata è legata al fatto che si manifesta un equilibrio tra le specie NADPH e NADH presenti in soluzione. Questo aspetto è evidenziato in reazioni dove NADH è consumato maggiormente rispetto a NADPH e in condizioni normali l'equilibrio redox tra le specie si raggiunge lentamente. In presenza del sistema complesso-enzima, tutto questo viene raggiunto in meno di 30 minuti, risultando utile nelle reazioni a catena in cui sono coinvolti enzimi che dipendono da NADH e NADPH, come la sintesi biocatalitica dell'idromorfone (potente analgesico derivato dalla morfina). In generale, si è riusciti a dimostrare come incorporando il complesso metallico con una proteina si riesce ad incrementare le attività

catalitiche, raggiungendo gli stessi livelli degli enzimi naturali presenti nel nostro organismo. In questo caso, la produzione di ammine enantiopure pone le basi in un nuovo modo per la sintesi di farmaci in matrice cellulare.

Durante l'ultimo anno si sono sviluppati una serie di complessi a base di Ru(II), dove al posto del cloruro presente come legante c'è un carbonile (CO) (figura 27). In questo caso, la struttura generica è costituita da leganti bidentati a base di azoto (N^N) e fosforo (P^P), la cui formula generale è la seguente: $[Ru(OAc)CO(dppb)(N^N)]^n$ con $n = +1/0$, dppb = 1,4-di(difenilfosfino)butano e OAc = legante acetato.^[19] Già in passato altri complessi di Ru hanno presentato attività catalitiche nelle reazioni di TH e idrogenazione di diversi composti carbonilici. Tuttavia, l'obiettivo attuale è quello di verificare se possiedono un comportamento simile ai complessi di Ir nell'alterare l'equilibrio $NAD^+/NADH$ all'interno della cellula e risultare sostanze citotossiche nei confronti di cellule tumorali. La presenza del legante CO incrementa la stabilità della specie metallica, ritardando il processo di disattivazione del catalizzatore; inoltre, il legante acetato svolge il ruolo di facilitare la formazione del legame C-H e favorendo interazioni con l'idrogeno, stabilizzando eventuali intermedi. Infine, questo tipo di legante si dissocia facilmente per favorire la coordinazione e formazione di specie attive come catalizzatori. Nella figura seguente viene illustrata la sintesi di quattro complessi a base di Ru(II) con CO come legante (1-4) e di un quinto privo del legante (2A) per verificare eventuali differenze.

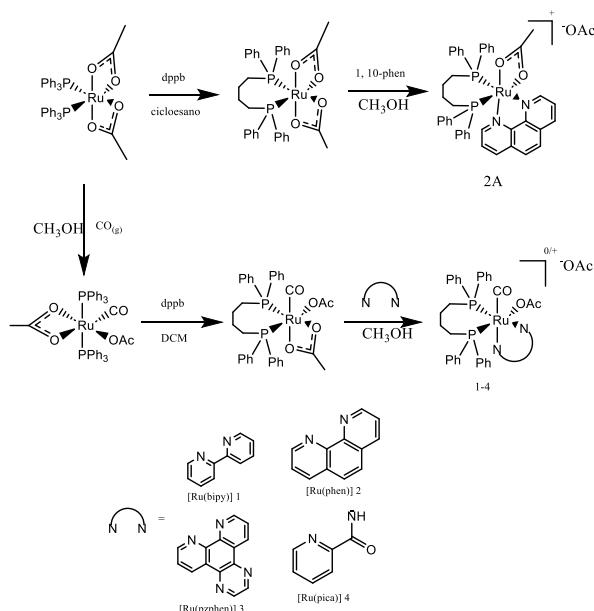


Figura 27. Sintesi dei complessi a base di Ru (II) con relative strutture dei leganti.^[19]

I vari complessi sono stati caratterizzati mediante diffrazione a raggi X e la reattività verso NADH mediante spettroscopia UV-vis, fluorescenza e spettroscopie ¹H e ¹P-NMR. Una cosa che si può

notare immediatamente è l'assenza del ciclopentadienile come legante (Cp), solitamente presente perché garantiva stabilità e mediante il fenomeno dello scivolamento dell'anello permetteva lo sviluppo del complesso intermedio a sei termini e l'acquisizione dell'idrogeno. Anche in questo caso si sono analizzati i vari complessi idrati isolati e mediante studi cinetici, elettrochimici e calcoli DFT si è analizzato il meccanismo. I complessi 1-3 e 2A presentano una buona stabilità in soluzione acquosa; invece, il complesso 4 si scioglie solo in acqua e in presenza di una soluzione al 20% (v/v) di dimetilformammide. Mediante l'analisi dei cristalli, ottenuti mediante la lenta diffusione di dietilere in una soluzione di complessi di Ru in diclorometano, si evidenzia una struttura ottaedrica tra il centro metallico e i leganti. Inoltre, si evidenzia l'influenza dei leganti P[^]P e CO dal fatto che i legami Ru-N e Ru-O sono allungati, suggerendo la facile dissociazione del legante acetato. Solitamente, i complessi metallici subiscono in condizioni biologiche reazioni di idrolisi dei leganti monodentati più labili, ed in questo caso è probabile che il gruppo OAc si idrolizzi e si stacchi dal centro metallico, formando i complessi idrati. Si sono analizzate, mediante ¹H-NMR, soluzioni contenenti un buffer di fosfato (PBS) a pH 7.4 e pH 6.3 per 12 h e i diversi complessi; il pH acido è stato scelto per simulare le condizioni all'interno delle cellule tumorali. Il cambio di legante tra OAc e la molecola d'acqua è visibile dal calo di intensità del singoletto a 1.63 ppm dell'acetato^[19], in più si nota una sorta di equilibrio tra la quantità di complesso con acqua o senza tra i complessi 1-3, dove il tempo in cui si genera varia in base al pH. A pH più acidi si nota un incremento di velocità verso l'equilibrio. In particolare, i complessi 1 e 2 sono più propensi rispetto al 3, invece i complessi 4 e 2A non mostrano nessun processo di idrolisi anche dopo 24 h. A seguito della rottura del legame Ru-OAc, si notarono dei cambiamenti nei *chemical shift* dei leganti N[^]N dei complessi 1-3. In particolare, all'aumento del pH i segnali si spostavano a valori più alti; nel caso di complessi non idrolizzati non si notava alcun cambiamento. Raccogliendo tutti i *chemical shift* e diagrammandoli contro il pH e fittando con l'equazione di Henderson-Hasselbach, si ottengono le varie p*k*_a dei vari complessi: 8.7 per il complesso 1, 8.4 per il 2 e 7.8 per il 3, indicando una maggiore reattività per i primi due complessi. Il fatto che il complesso 3 abbia un valore di p*k*_a minore è dovuto al fatto che il legante N[^]N è molto più esteso e riduce la densità elettronica verso il metallo. Per l'analisi relativa alla reattività dei complessi verso una TH che coinvolge l'ossidazione di NADH (figura 28), si è preparata una soluzione in buffer fosfato (pH = 7.4) contenente NADH e i vari complessi e mediante la spettroscopia ¹H e ³¹P-NMR si sono rilevate le formazioni dei relativi complessi idrati. Tuttavia, nel caso del complesso 4 non si è registrata alcuna attività.^[19] Negli spettri UV-Vis si è notata la formazione di una banda a circa 360 nm, probabilmente dovuta alla formazione dei complessi idrati. Anche in questo caso, il pH influenza notevolmente l'andamento della reazione; a valori più bassi si hanno velocità di conversione maggiori e più probabilità di completamento della reazione. Dei

complessi analizzati il numero 3 presenta attività maggiori rispetto al 1 e 2, suggerendo che il diverso tipo di legante N^N influenzi la reattività; il complesso 2A presenta attività simile ai complessi 1-2 e un valore di pH vicino a loro.

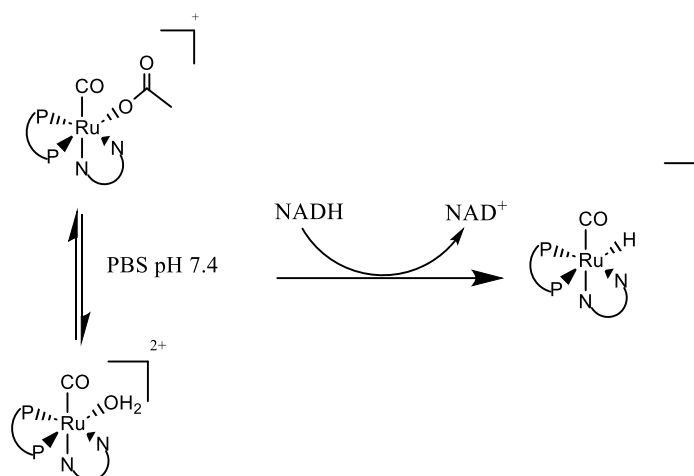


Figura 28. Schema di reazione di NADH in addizione ai complessi a base di Ru (II) in PBS.^[19]

La stessa reazione è stata seguita in condizioni aerobiche, cioè facendo fluire ossigeno all'interno della soluzione, per verificare se anche in questo caso si ha la produzione di H₂O₂ e se questo influenzi l'attività catalitica nell'ossidazione di NADH (figura 29). Con il solito metodo di analisi si è verificata la formazione di NAD⁺ e l'influenza dei leganti N^N, dove tanto maggiore è la porzione aromatica del legante, tanto più elevata è la quantità di reagente ossidato. I valori di TOF ottenuti aumentano all'incremento di acidità nella soluzione (a pH = 6.3 si ottengono valori da 0.14 a 0.82 h⁻¹); però, a valori fisiologici non si verificano incrementi significativi e con nessun catalizzatore si è raggiunta la conversione totale. Dei vari complessi soltanto il 3 ha registrato valori ottimali (TOF = 0.82 h⁻¹ in 10 h a pH = 6.3) anche se la reattività del complesso idrurico non è tanto alta, dovuta alla bassa solubilità in acqua. Invece, i complessi 1 e 2A presentano attività molto basse; inoltre, il complesso 4 presenta attività sostanzialmente nulla. Dopo che sono trascorse 2 ore da inizio della reazione si verifica la formazione di perossido di idrogeno, rilevabile dalle cartine apposite.

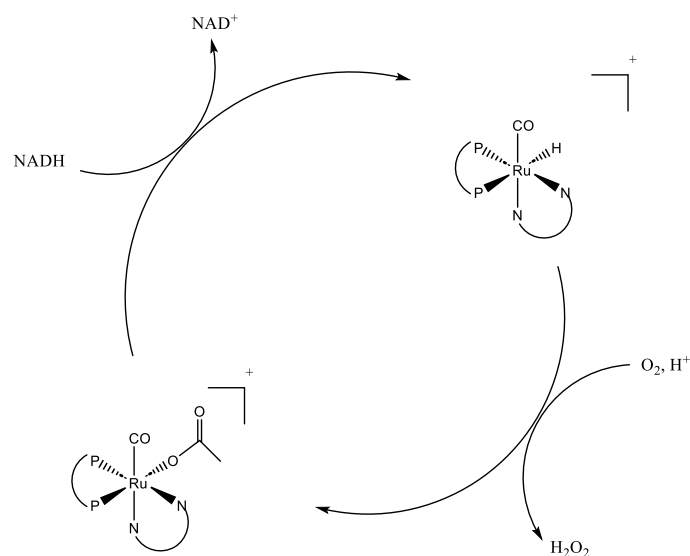


Figura 29. Schema di reazione catalitica dell'ossidazione di NADH in ambiente aerobico in presenza dei complessi di Ru (II).^[19]

I valori di H₂O₂ ottenuti dipendono dalla quantità di NADH presente, dal tipo di complesso e dal pH della soluzione. I valori ottimali si ottengono utilizzando il complesso 3, bassi valori di pH e alte concentrazioni di reagente. Considerando che a pH acidi si favorisce la reazione, non si può escludere una reazione secondaria dove il complesso idrurico possa trasferire l'idrogeno a H⁺, con la formazione di H₂. Dato che in questo complesso c'è una forte influenza della tipologia del legante e che il meccanismo di reazione coinvolge il trasferimento di leganti, mediante una caratterizzazione elettrochimica si può razionalizzare l'andamento della loro reattività e capire la tendenza del complesso ad accettare un idrogeno come legante e trasferirlo ad un substrato, correlandolo alla densità elettronica del centro metallico e dei leganti presenti. In generale, se si aumenta la densità elettronica sul centro metallico, si genera un potenziale di riduzione molto negativo, favorendo la donazione di un idrogeno e allo stesso tempo sfavorendo la formazione del complesso M-H. Quindi, se si ricavano i potenziali di riduzione dei vari complessi sarà possibile capire i risultati ottenuti precedentemente. I valori si sono ottenuti mediante una voltammetria ciclica (CV) in un elettrolita a base di dimetilformammide (DMF) con 0.1 M di TBAPF₆ (Esafluorofosfato di tetrabuttilammonio), per simulare il comportamento in soluzione acquosa, dato che un'analisi diretta sarebbe stata complicata per la scarsa solubilità dei complessi e per la precipitazione delle specie neutre. La misurazione consiste nella scansione della corrente generata nella soluzione a seguito di una variazione del potenziale indotto mediante un elettrodo nel tempo (in questo caso 0.2 V/s); quando si ha un calo improvviso di corrente vuol dire che si ha la riduzione della specie e monitorando il potenziale è possibile ricavare il potenziale di riduzione della specie. L'andamento del potenziale segue una sequenza ciclica, prima riduzione e poi ossidazione, per verificare se l'andamento è reversibile o no. In questo caso, la riduzione, che corrisponde alla formazione del complesso idrurico,

è irreversibile per tutti i complessi tranne che per il 2A; questo perché nei complessi 1-4 si ha la dissociazione del legante OAc, causando uno spostamento di 0.5 V tra il picco di riduzione e il rispettivo picco di ossidazione; quindi, nel complesso 2A non si ha il distacco del legante dato che è bidentato, garantendo una maggiore stabilità. Per i vari complessi si sono ottenuti i seguenti valori di potenziale di riduzione: -1.80, -1.72, -1.66, -2.50 e -1.90 V per i complessi 1, 2, 3, 4 e 2A rispettivamente.^[19] Il complesso neutro 4 presenta il valore più basso perché è quello che possiede maggiore densità elettronica nel centro metallico. Dell'altra serie di complessi cationici, l'andamento crescente di potenziale dei complessi 1-3 (figura 30) è dovuto all'aumento delle dimensioni del legante N^N; inoltre, il complesso 2A possiede un valore più negativo perché in assenza del legante CO non si ha la riduzione di densità elettronica verso il centro metallico. I risultati ottenuti dimostrano come la struttura del complesso influenzi notevolmente la reazione. Per verificare al meglio si sono analizzati i vari valori di TOF delle reazioni di ossidazioni di NADH con i vari complessi in relazione ai loro potenziali di riduzione. Si è notato un andamento lineare dove più il valore del potenziale è negativo, minore è il TOF ottenuto.

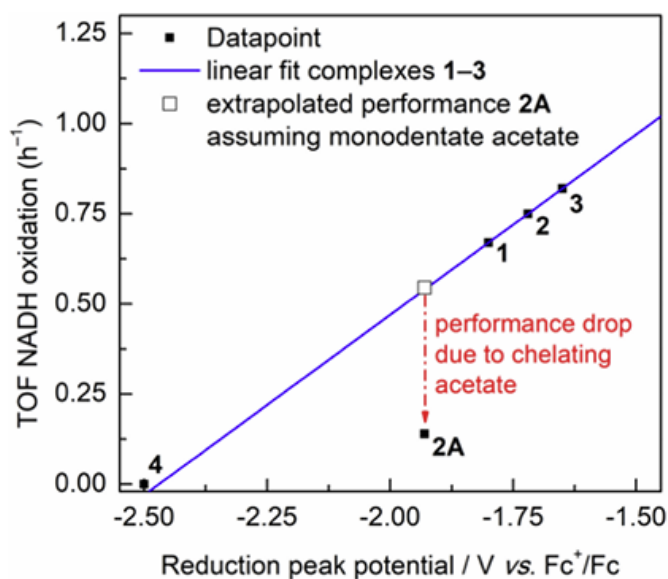


Figura 30. Correlazione tra TOF della reazione di ossidazione di NADH con i rispettivi potenziali di riduzione dei vari complessi di Ru (II).^[19]

Il fatto che un potenziale basso di riduzione ostacoli la reazione è dovuto al fatto che meno è propenso il complesso ad accettare idrogeno, meno NADH reagirà; inoltre, si può notare come il complesso 2A registri un valore al di fuori dell'andamento previsto per l'assenza del legante CO e dal fatto che il legante OAc è bidentato (figura 27), rendendo difficile la dissociazione, fondamentale nel meccanismo di reazione. Come previsto dai risultati sopra, il complesso 4 registra valori di TOF sostanzialmente nulli. Dopo aver analizzato e verificato il comportamento di questi complessi, si sono

svolti diversi esperimenti in cellule tumorali per verificare se la loro attività contribuisce ad inibire lo sviluppo ulteriore di queste cellule. Una prima analisi ottenuta è relativa alla produzione di specie reattive contenenti ossigeno (ROS) dopo 2 h di trattamento con i complessi 1-3. Infine, per verificare che avvenga una reazione di TH all'interno delle cellule si è seguita una reazione che coinvolge i complessi 1-3 mediante la microscopia a fluorescenza, utilizzando come indicatore la molecola BODIPY-CHO. Come per il complesso di Ir trattato precedentemente, il meccanismo di reazione previsto è il trasferimento di un idrogeno da NADH all'aldeide mediante la formazione del complesso idrurico. Come prodotto si ottiene BODIPY-OH, specie fluorescente con una banda intorno ai 480 nm. La reazione viene monitorata direttamente all'interno della cuvetta per ottenere la variazione spettro nel tempo; le soluzioni analizzate sono le seguenti: solo BODIPY-CHO, solo BODIPY-OH e ogni singolo complesso (1-3) con BODIPY-CHO.^[19] Monitorando le varie intensità di fluorescenza ottenute si può ricavare la quantità di alcol ottenuto e capire quale dei vari complessi presenta un'attività maggiore. Dai risultati ottenuti il complesso 2 porta alla maggiore produzione di BODIPY-OH, il numero 3 in questo caso ha registrato una minore attività perché durante l'analisi si è notata la formazione di un precipitato nel fondo della cuvetta. Quindi, la soluzione è stata rimossa ed il precipitato, dopo averlo trattato con metanolo deuterato, è stato analizzato mediante spettroscopia ¹H-NMR. Questo risultato evidenzia la bassa solubilità del complesso in una soluzione fisiologica, però non è da escludere la formazione di altri addotti del complesso di Ru(II). Dall'insieme dei risultati ottenuti possiamo definire che il complesso 3 possiede le migliori caratteristiche per agire come catalizzatore in reazioni di TH in matrice cellulare con ossidazione di NADH; inoltre, è uno dei primi complessi di Ru(II) in grado di ridurre O₂. Poi, mediante le analisi elettrochimiche e calcoli DFT si è confermato come il passaggio limitante della reazione è il trasferimento dell'idrogeno da NADH al complesso. Rispetto ai complessi costituiti da Ru-areni, la presenza di gruppi mono carbonilici permette un'alta versatilità della sfera di coordinazione al centro metallico, che offre maggiori opportunità per la progettazione e funzionalizzazione dei catalizzatori e la possibilità di regolare le proprietà chimico-fisiche, permettendo di raggiungere reazioni regio e stereo-selettive.

4. Conclusioni e aspetti rilevanti

Le reazioni di trasferimento di idrogeno costituiscono oggi una classe di trasformazioni estremamente versatili e strategiche, sia in sintesi organica che in contesti biologici: rispetto all'idrogenazione convenzionale evitano l'uso di H₂ pressurizzato e permettono l'impiego di donatori economici e facilmente utilizzabili (isopropanolo, acido formico, NAD(P)H), con vantaggi in termini di sicurezza, costi e sostenibilità. Dal punto di vista meccanicistico, la TH comprende percorsi a sfera interna (coordinazione del substrato al centro metallico, con stati di transizione a sei centri, come nella riduzione MPV) e a sfera esterna (come nei sistemi di Noyori, dove leganti particolarmente basici mediante il trasferimento simultaneo di protone e idruro), e la scelta del meccanismo impatta profondamente selettività e condizioni operative.^[1] Lo sviluppo dei catalizzatori ha seguito una traiettoria veloce: dai primi sistemi a base di Pd e altri metalli nobili si è passati a complessi altamente performanti a base di Ru, Rh e Ir, con leganti innovativi quali carbeni *N*-eterociclici (NHCs) e sistemi *half-sandwich* (figura 8) che hanno consentito di ottenere TON e TOF estremamente elevati e uno straordinario controllo stereo-/enantio-selettivo nelle ATH. Negli ultimi anni, la ricerca ha inoltre dimostrato l'importanza di catalizzatori a base di metalli abbondanti e poco tossici (Fe), aprendo la strada a soluzioni più sostenibili, senza sacrificare l'efficienza catalitica. In ambiente biologico, le TH giocano un ruolo cruciale tramite il coenzima NAD(P)H: il controllo del rapporto NAD⁺/NADH in cellule tumorali, con attività comparabile o superiore a farmaci di riferimento in alcuni test cellulari, indicano il potenziale dei metallofarmaci basati sulle TH. Si sono esplorati sistemi capaci di ossidare NADH in condizioni fisiologiche, generando specie reattive a base di ossigeno (H₂O₂) o in grado di simulare e alterare il metabolismo mitocondriale, per esempio agendo sull'ubichinone. Le misure sperimentali (TON, TOF, %ee, resa) sono fondamentali per confrontare i vari sistemi sviluppati; altre misure pratiche come la stabilità e la facilità di rigenerazione del catalizzatore sono cruciali. Sul piano analitico, tecniche elettrochimiche, spettrometria di massa, spettroscopia Uv-vis e calcoli DFT si sono dimostrate complementari: le prime forniscono informazioni sui potenziali redox e sulle specie intermedie, le seconde permettono di caratterizzare stati transitori e percorsi energetici. I risultati evidenziano che lo stadio limitante è spesso il trasferimento dell'idruro da NADH al complesso, aspetto fondamentale per progettare leganti che bilancino stabilità e reattività. Altri aspetti importanti sono la solubilità e la stabilità in ambiente biologico, la selettività intra-cellulare e la tossicità verso le cellule tumorali. Anche incrementare l'attività a pH fisiologico è importante dato che finora i diversi complessi analizzati presentano ottimi risultati a pH acidi. Soluzioni promettenti emergono dall'incorporazione dei catalizzatori in matrici proteiche o dall'accoppiamento con sistemi enzimatici per la rigenerazione di NADH (come nel caso della streptavidina che legandosi con il complesso migliora la protezione e l'attività), dove mutazioni mirate nelle proteine ospiti portano a

forti incrementi di TON, dimostrando la possibilità di creare sistemi catalizzatore-enzima. Le direzioni più importanti da seguire sono: *i)* progettare metallo farmaci selettivi e attivabili per terapie mirate; *ii)* integrare catalizzatori TH in strategie di sintesi sostenibile e catene di rigenerazione redox (cascata enzimatica) per la produzione stereo selettiva su scala industriale; *iii)* sviluppare catalizzatori basati su Fe e altri metalli abbondanti biocompatibili per ridurre l'impatto ambientale nello sviluppo e utilizzo; *iv)* sfruttare la modellistica computazionale (DFT) per ottimizzare leganti che facilitino il trasferimento di idruro minimizzando gli stati di inattivazione. In sintesi, le reazioni di trasferimento di idrogeno, in particolare quelle che avvengono in ambiente biologico e utilizzando NADH come fornitore di idruri, offrono un insieme coerente di opportunità scientifiche e applicative: l'obiettivo è di combinare la progettazione molecolare avanzata, tecniche analitiche in tempo reale, valutazioni di sostenibilità e studi biologici rigorosi in modo da sviluppare sistemi promettenti facilmente controllabili e di facile sviluppo.

Bibliografia

- [1]: Wang, D.; Astruc, D. *The Golden Age of Transfer Hydrogenation*. *Chem. Rev.* **2015**, 115, 6621-6686
- [2]: Brieger, G.; Nestruck, T.J. *Catalytic Transfer Hydrogenation*. *Chem. Rev.* **1974**, 74 (5), 567-580
- [3]: Zeng, C.; You, S. *Transfer hydrogenation with Hantzsch esters and related organic hydride donors*. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 2498-2518
- [4]: Ito, J.; Nishiyama, H. *Tetrahedron Letters*. **2014**, 55, 3133-3146
- [5]: Goodwin, C. *What is a Sandwich Complex? Inorg. Chem.* **2024**, 63, 21, 9363-9365
- [6]: Banerjee, S.; Sadler, P.J. *Transfer hydrogenation catalysis in cells*. *RSC Chem. Biol.* **2021**, 2, 12-29
- [7]: Ying, W. *NAD⁺ and NADH in cellular functions and cell death*. *Frontiers in Bioscience*. **2006**, 11, 3129-3148
- [8]: Dijkman, W.P.; Gonzalo, G.; Mattevi, A.; Fraaije, M.W. *Flavoprotein oxidases: classification and applications*. *Appl Microbiol Biotechnol.* **2013**, 97, 5177-5188
- [9]: Bagayoko, D. *Understanding density functional theory (DFT) and completing it in practice*. *AIP Advances*. **2014**, 4, 2158-3226
- [10]: Calhorda, M.J.; Veiros, L.F. *Ring slippage in indenyl complexes: structure and bonding*. *Coordination Chemistry Reviews*. **1999**, 185-186, 27-51
- [11]: Okamoto, Y.; Ward, T.R. *Transfer Hydrogenation Catalyzed by Organometallic Complexes Using NADH as a Reductant in a Biochemical Context*. *Biochemistry*. **2017**, 56, 5223-5224
- [12]: Haldar, U.; Sharma, R.; Ruidas, B.; Lee, H. *Toward rapid and selective detection of hypochlorous acid in pure aqueous media and its application to cell imaging: BODIPY-derived water-soluble macromolecular chemosensor with high sensitivity*. *Dyes and Pigments*. **2020**, 172, 107858
- [13]: Nwaneshiudu, A.; Kuschal, C.; Sakamoto, F.H.; Anderson, R.R.; Schwarzenberg, K.; Young, R.C. *Introduction to Confocal Microscopy*. *Journal of Investigative Dermatology*. **2012**, 132
- [14]: Bose, S.; Ngo, A.H.; Do, L.H. *Intracellular Transfer Hydrogenation Mediated by Unprotected Organoiridium Catalysts*. *Chem. Soc.* **2017**, 139, 8792-8795
- [15]: Maenaka, Y.; Suenobu, T.; Fukuzumi, S. *Efficient Catalytic Interconversion between NADH and NAD⁺ Accompanied by Generation and Consumption of Hydrogen with a Water-Soluble Iridium Complex at Ambient Pressure and Temperature*. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 367-374
- [16]: Suenobu, T.; Shibata, S.; Fukuzumi, S. *Catalytic Formation of Hydrogen Peroxide from Coenzyme NADH and Dioxygen with a Water-Soluble Iridium Complex and a Ubiquinone Coenzyme Analogue*. *Inorg. Chem.* **2016**, 55, 7747-7754
- [17]: Ricca, E.; Brucher, B.; Schrittwieser, J.H. *Multi-Enzymatic Cascade Reactions: Overview and Perspectives*. *Adv. Synth. Catal.* **2011**, 353, 2239-2262
- [18]: Okamoto, Y.; Kohler, V.; Ward, T.R. *An NAD(P)H-Dependent Artificial Transfer Hydrogenase for Multienzymatic Cascades*. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, 138, 5781-5784
- [19]: Lovison, D.; Berghausen, T.; Thomas, S.R.; Robson, J.; Drees, M.; Jandl, C.; Pothig, A.; Mollik, P.; Halter, D.P.; Baratta, W.; Casini, A. *Beyond Metal-Arenes: Monocarbonyl Ruthenium(II) Catalysts for Transfer Hydrogenation Reactions in Water and in Cells*. *ACS Catal.* **2023**, 13, 10798-10823