

SCUOLA DI SCIENZE

Dipartimento di Chimica Industriale “Toso Montanari”

Corso di Laurea Magistrale in

Chimica Industriale

Classe LM-71 - Scienze e Tecnologie della Chimica Industriale

**Indagine su reazioni di sulfa-Michael di
interesse in campo cosmetologico e sul
trattamento ricostruttore del capello**

Tesi di laurea sperimentale

CANDIDATO:

Benedetta Nocentini

RELATORE:

Prof.ssa Carla Boga

CORRELATORI:

Prof.ssa Paola Taddei

Dott. Gabriele Micheletti

Sessione III

Anno Accademico 2015/2016

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the reactivity of cysteinyl residues that can be found in damaged human hair with Michael acceptors under mild conditions and to gain information on the hair modifications occurring in hair bleached and then repaired with some commercial formulations.

In some patents, the use of some molecules effective for repairing damaged hair is claimed. Their structure is compatible with the occurrence of Michael addition reactions, and the need of more detailed studies about the reaction mechanism and the effect on human hair of commercial products containing hair rebuilding agents has inspired this study.

First, the investigation was focused to find Michael acceptors alternative to those claimed by the examined patents. As model reaction N-acetyl-L-cysteine was chosen as nucleophilic agent and different electrophiles, such as quinone- and maleic acid-derivatives, as well as α,β -unsaturated ketones and esters were used. Subsequently we investigated, through Raman/IR spectroscopy and electronic scanning microscopy (SEM), on the effect of hair treatment with Michael acceptors studied in the first part and also some commercial hair rebuilding formulations.

Sommario

1	INTRODUZIONE.....	1
1.1	IL CAPELLO	1
1.1.1	<i>Proprietà fisiche</i>	2
1.1.2	<i>Struttura fisica.....</i>	5
1.1.3	<i>Struttura molecolare.....</i>	6
1.2	ALTERAZIONI COSMETICHE DEL CAPELLO	8
1.2.1	<i>Deformazione permanente del capello.....</i>	9
1.2.2	<i>Decolorazione del capello</i>	10
1.3	PRODOTTI COMMERCIALI AD AZIONE RISTRUTTURANTE.....	12
1.3.1	<i>Olaplex® (Liqwd, Inc.).....</i>	14
1.3.2	<i>BC complex® (Kemon S.p.A)</i>	19
1.4	ADDIZIONE DI SULFA-MICHAEL.....	20
2	SCOPO DELLA TESI	23
3	RISULTATI E DISCUSSIONE.....	24
3.1	MODELLI DI REAZIONE	24
3.1.1	<i>Reazioni con derivati chinonici.....</i>	24
3.1.2	<i>Reazioni con derivati dell'acido maleico e fumarico.....</i>	30
3.1.3	<i>Reazione con fenilvinilsolfone.....</i>	33
3.1.4	<i>Reazioni con chetoni ed esteri α-β insaturi.....</i>	33
3.1.5	<i>Reazione con ossido di ciclopentene</i>	36
3.2	PROVE PRATICHE SU CIOCCHE.....	38
3.2.1	<i>Analisi IR/RAMAN su modelli e su fibre.....</i>	39
3.2.2	<i>Analisi SEM su fibra.....</i>	58
4	CONSIDERAZIONI FINALI	70
5	PARTE SPERIMENTALE	72
5.1	NOTE SPERIMENTALI.....	72
5.2	SINTESI E CARATTERIZZAZIONE DEI PRODOTTI USATI IN SISTEMI MODELLO	75
5.2.1	<i>Sintesi di derivati di acidi mercapturici</i>	75
5.2.2	<i>Derivati chinonici.....</i>	77
5.2.3	<i>Derivati dell'acido maleico e fumarico.....</i>	80
5.2.4	<i>Fenilvinilsolfone.....</i>	82
5.2.5	<i>Chetoni ed esteri α-β insaturi</i>	82

5.2.6	<i>Ossido di ciclopentene</i>	85
5.3	PREPARAZIONE DEI CAMPIONI PER ANALISI RAMAN, IR E SEM.....	85
5.3.1	<i>Lotto 1</i>	86
5.3.2	<i>Lotto 2</i>	86
5.3.3	<i>Lotto 3</i>	87
5.3.4	<i>Lotto 4</i>	88
5.3.5	<i>Lotto 5</i>	88
6	BIBLIOGRAFIA	90

1 Introduzione

1.1 Il capello

Il cuoio capelluto svolge nell'uomo un ruolo principalmente protettivo, assicurando il mantenimento della temperatura corporea e agendo da schermo per il cranio contro i raggi ultravioletti.

Ma la capigliatura ha posseduto nella storia anche una funzione simbolica e decorativa, essendo un ornamento biologico sfruttato per distinguersi socialmente ed identificarsi, e a cui sono state dedicate particolari attenzioni nelle culture di tutto il mondo: sin dai tempi più lontani, vi era nell'uomo primitivo l'esigenza di darsi una presenza estetica che lo distinguesse dal resto del "clan" di appartenenza, necessità che i secoli e l'evoluzione sociale hanno poi imposto come canone estetico all'uomo del nostro tempo[1].

Il capello, in ambito anatomico, costituisce l'espressione esterna del follicolo pilifero: all'interno del follicolo si trova la radice del capello ed all'estremità di questa il bulbo, la cui funzione è quella di produrre, attraverso la papilla dermica, le cellule che costituiscono la fibra. Queste cellule, infatti, invecchiando, generano il fusto del capello che fuoriesce dall'epidermide, rendendo visibile l'estremità pilifera. In prossimità della radice si trova anche la ghiandola sebacea, che fornisce al follicolo pilifero il sebo necessario per lubrificare il fusto, impedendo l'apertura delle squame di cheratina di cui è costituita la parte esterna del capello.

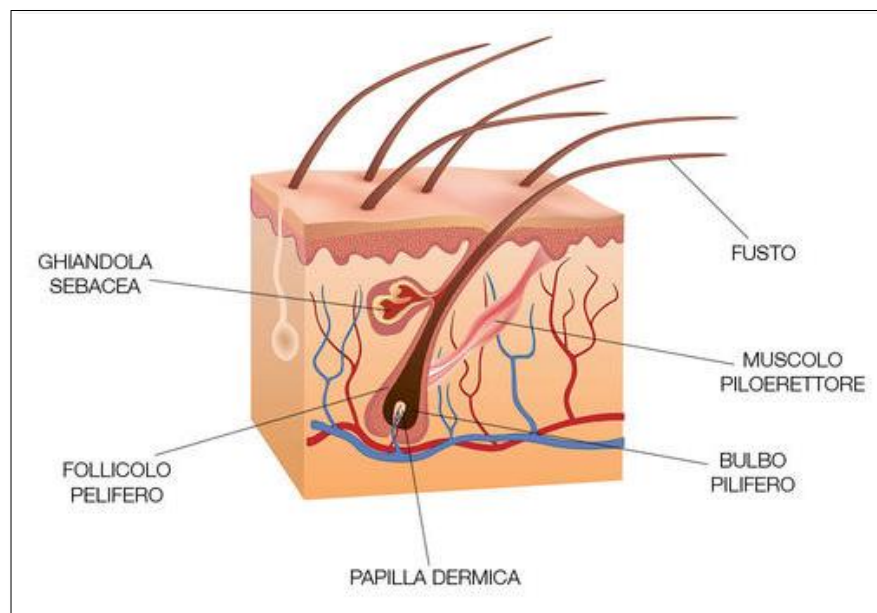


Figura 1.1: Anatomia del capello umano[2]

1.1.1 Proprietà fisiche

Le proprietà fisiche del capello dipendono dalla forma e dal diametro della fibra, che in natura variano in base all'etnia dell'individuo: la popolazione indoeuropea, ad esempio, tende ad avere un capello con una sezione ellittica, mentre la popolazione asiatica presenta un capello dalla forma più rotonda.

Nonostante la sua struttura renda il capello una fibra molto resistente, se sottoposto a trattamenti termici o chimici il capello può indebolirsi, variando permanentemente le sue proprietà fisiche.

Resistenza al carico

La resistenza della fibra capillare può essere valutata considerando che una capigliatura naturale e sana può sopportare il peso di 12 tonnellate; per rompere un singolo capello sono necessari dai 50 ai 100 g, che corrispondono ad un carico di $12 * 10^7$ Pa, valore superiore a quello del punto di rottura dell'alluminio.

La capacità di resistenza al carico varia molto con l'età e con il tipo di capello preso in considerazione. Una fibra dalla forma più ovale come quella della etnia africana, è fragile per via della struttura schiacciata che assume nelle numerose zone di torsione lungo la fibra; il capello asiatico, che presenta una struttura uniforme, invece è molto resistente alla rottura.

Sotto sforzo, prima di raggiungere il punto di rottura, il capello riesce ad essere allungato fino al 30% della sua lunghezza originale; questa caratteristica conferisce alla fibra notevole capacità elastica.

Deformazione temporanea

È stato dimostrato sperimentalmente che, stirando il capello asciutto in un range che varia dal 2% al 25%, immergendo questo in acqua e asciugandolo mantenendolo sotto trazione, la lunghezza della fibra tenderà a raggiungere un valore intermedio tra quello originale e quello di massimo allungamento. La deformazione che subisce, però, è temporanea: quando il capello non è più sottoposto a trazione, tende lentamente a tornare alla sua lunghezza originaria.

Lo stiramento della fibra oltre il 2% della sua lunghezza originaria provoca la trasformazione della struttura secondaria della proteina, che passa da α -cheratina a β -

cheratina: infatti, durante la tensione, si provoca uno scivolamento delle catene polipeptidiche una rispetto all'altra, scorrimento facilitato dalle molecole di acqua che spezzano i legami ad idrogeno e i ponti salini della struttura α .

La fase finale di asciugatura sotto trazione porta alla formazione di nuovi legami ad idrogeno e ponti salini, che impediranno parzialmente il ritorno del capello alla struttura originaria. Se invece il capello viene bagnato dopo aver subito l'asciugatura sotto tensione, e poi asciugato normalmente, la fibra tenderà a tornare immediatamente al suo stato originario.

Permeabilità all'acqua e rigonfiamento

Il capello è permeabile all'acqua, sia in forma liquida che come vapore. La cheratina è in grado di assorbire acqua fino a 35-40% del suo peso poiché il solvente si combina con la fibra attraverso diversi tipi di legame: in una prima fase di idratazione (0 – 15% di umidità relativa) l'acqua si lega ai gruppi acidi delle catene laterali, formando uno strato monomolecolare. Quando l'umidità relativa supera il 15%, le molecole di acqua che vengono assorbite si legano alle catene polipeptidiche attraverso legami ad idrogeno.

Per un'umidità relativa dal 75% in su, l'assorbimento diventa multimolecolare: le molecole di acqua assorbite condensano, andando ad unirsi ad altre molecole di acqua già legate alla struttura cheratinica e dando quindi origine a una rete regolare di legami ad idrogeno.

La principale conseguenza dell'assorbimento di acqua da parte della fibra è il rigonfiamento anisotropo: il capello, infatti, tende ad aumentare il suo diametro fino al 20%, mentre la sua lunghezza raggiunge un valore massimo del 2% rispetto alla fibra non bagnata. Questo fenomeno è possibile dal momento che la matrice presenta maggior capacità di rigonfiamento rispetto alle fibrille che si trovano al suo interno, provocando un rigonfiamento raggiato.

La capacità di permeabilità del capello dipende principalmente dal pH: il rigonfiamento è limitato a pH acido, ma viene potenziato a pH alcalino. L'urea, la formammide e l'acetammide sono solo alcuni dei composti che, in soluzione, danno un forte rigonfiamento della fibra grazie alla loro capacità di formare legami ad idrogeno con la cheratina. Le soluzioni alcaline, che arrivano a rompere i legami disolfuro della proteina, sono in grado di aumentare il rigonfiamento del capello del 300%.

Il fenomeno di rigonfiamento è stato ampiamente sfruttato in tricocosmetologia essendo correlato alla capacità di penetrazione di molecole all'interno del capello.

La resistenza dei capelli al rigonfiamento è dovuta alla presenza di legami reticolari nella sua struttura. Questi legami, infatti, non solo inibiscono l'introduzione di solvente oltre il limite massimo di rigonfiamento, ma escludono la penetrazione di molecole che hanno una massa maggiore rispetto agli spazi esistenti tra le catene polipeptidiche.

Assorbimento

La superficie del capello è in grado di trattenere molti composti organici come sebo, tensioattivi e coloranti.

Per quanto riguarda l'assorbimento di grassi, ci si riferisce al concetto di tensione superficiale: il sebo si trasferisce dal cuoio capelluto al fusto attraverso un processo fisico. L'assorbimento di tensioattivi e coloranti, invece, è un processo chimico in cui le micelle elettricamente cariche vengono attratte dalle aree ionizzate di carica opposta. In genere, si utilizzano tensioattivi cationici o coloranti basici, poiché la capacità di assorbimento dei composti acidi è più bassa rispetto ai composti carichi positivamente: infatti, lungo la sequenza amminoacidica della cheratina, vi è una maggiore probabilità di disporre di gruppi acidi liberi. Inoltre, i trattamenti chimici o i danni ambientali a cui è sottoposto il capello, molto spesso sono processi ossidativi che aumentano la natura anionica della superficie del capello: in questo modo si comprende la maggiore affinità con composti ionici.

Punto isoelettrico e punto isoionico

Il pH a cui una proteina o una particella ha un numero equivalente di cariche totali positive e negative, determinato dallo scambio protonico, è detto punto isoionico; questo valore è dovuto alle caratteristiche intrinseche del capello e si riflette nelle proprietà degli equilibri acido-base della fibra nella sua totalità.

Il punto isoelettrico, invece, viene definito dal valore di pH a cui una proteina o una particella non migra in presenza di un campo elettrico applicato ed è correlato alle proprietà degli equilibri acido-base della superficie della fibra.

Attraverso analisi di titolazione in soluzione tampone è stato possibile determinare, secondo uno studio i cui campioni derivavano da nove differenti individui, il punto isoionico della fibra vergine che corrisponde a un $\text{pH} = 5,8 (\pm 1)$ [3].

Misurando invece la mobilità elettroforetica delle particelle cheratiniche in soluzione tampone, è stato possibile condurre studi sul punto isoelettrico della fibra: in questo caso, un campione costituito da un singolo capello ha mostrato un valore di $\text{pH} = 3.67$ [4].

A livello macroscopico, all'aumentare del punto isoelettrico della fibra aumentano i fenomeni triboelettrici sulla sua superficie; in questo stato il capello può accumulare elettricità statica e liberare cariche elettriche con la semplice frizione.

È stato dimostrato che la presenza di lipidi sulla superficie del capello è fondamentale per mantenere basso il valore del punto isoelettrico, che altrimenti varierebbe fino a $\text{pH} = 4.5$ [3].

1.1.2 Struttura fisica

Analizzando la sezione trasversale del capello è possibile osservare una struttura concentrica costituita da tre strati:

- Il midollo, la parte più interna del capello, è composto da cellule disposte a colonne, arrotondate e separate da vacuoli di aria che, rimanendo trattenuta all'interno, fungono da isolante per il freddo. Infatti, nel pelo animale il midollo costituisce una percentuale relativamente alta (più del 50%) della massa fibrosa totale; nel capello umano invece, lo spessore del midollo è molto ridotto e la sua presenza dipende dall'ampiezza del diametro della singola fibra: nei capelli più fini può anche essere assente o discontinuo lungo l'asse della fibra, senza che questa mancanza vada ad intaccare le proprietà meccaniche e chimiche del fusto. Ciò fa supporre che nell'uomo il midollo abbia perso la sua funzione.
- La corteccia è la parte centrale del fusto, comprende la maggioranza della massa fibrosa ed è responsabile delle proprietà meccaniche del capello: questa sezione è infatti composta da microfibrille cheratiniche orientate longitudinalmente lungo l'asse della fibra, immerse in una matrice amorfa proteica che costituisce il 40% della corteccia totale e raggruppate a loro volta in macrofibrille (60% della corteccia totale). L'orientamento di queste strutture cheratinizzate e la naturale struttura matrice-fibra garantiscono la resistenza meccanica del capello.
- La cuticola nasce, all'interno del follicolo, come un unico strato cellulare; salendo lungo il follicolo, le cellule si appiattiscono e si sollevano leggermente verso l'alto, assumendo una conformazione a β -foglietto e sovrapponendosi l'una sull'altra nello stadio finale di cheratinizzazione per formare una struttura pluristratificata, in cui ogni

cellula è lunga in media 45 μm a 0,5 a 1 μm . Ricoprendo il capello, le cuticole hanno il ruolo di proteggere la corteccia ed il midollo da agenti esterni [5].

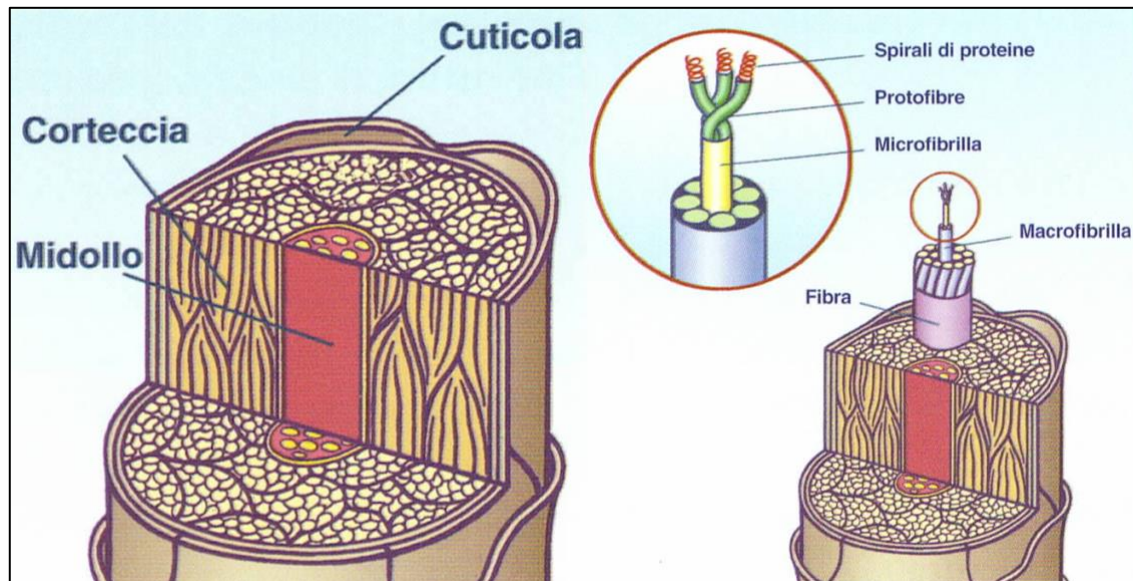


Figura 1.2: Rappresentazioni della macrosezione del capello, a sinistra, e della sua ultrastruttura, a destra [6].

1.1.3 Struttura molecolare

Dal punto di vista chimico, il capello è costituito principalmente da cheratina (65%-95%), ma anche da lipidi (1%-9%), pigmenti (0,3%-0,9%) ed oligoelementi come minerali e composti metallici in tracce. La cheratina è una catena polipeptidica con struttura quaternaria prodotta dalla condensazione di 18 amminoacidi, principalmente cistina, acido glutammico, serina ed arginina; la catena presenta una struttura ad α -elica lunga approssimativamente 450 \AA .

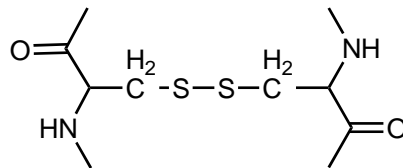
La cuticola è lo strato più ricco di componenti solforati ed ogni cellula della cuticola è costituita da tre principali sub-unità lamellari: lo strato A, più esterno, contenente percentuali di cisteina molto alte, è la zona più ricca di legami reticolati come i ponti disolfuro della cistina o i gruppi isopeptidici formati tra glutamina e lisina.

L'esocuticola è lo strato intermedio e contiene principalmente amminoacidi non polari (44%), ma anche cistina (20%) e amminoacidi acidi e basici

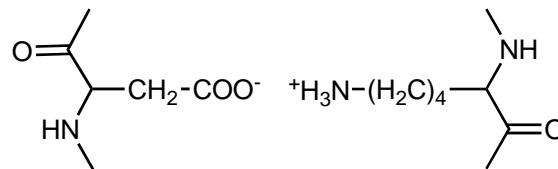
Infine, nello strato più interno, è presente l'endocuticola, meno ricco di cistina e legami reticolati: questa zona presenta invece alti livelli di amminoacidi polari che portano a supporre che questo strato di cuticola sia il più incline ad un alto grado di rigonfiamento in acqua [7].

La disposizione ad α -elica della cheratina rende possibile la coesione delle catene polipeptidiche, in cui legami chimici presenti sono di 3 tipi:

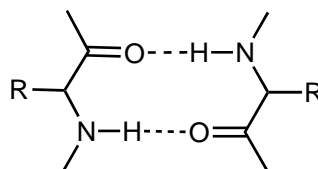
- I ponti disolfuro, che sono legami cistinici covalenti caratteristici della struttura cheratinica, la cui frequenza calcolata lungo la catena risulta in media di un ponte ogni quattro giri di elica. Rappresentano i legami più forti presenti all'interno del capello, ma anche i più suscettibili ad attacchi chimici in ambienti riducenti od ossidanti; inoltre possono essere facilmente rotti se sottoposti a stress termico, come avviene nella messa in piega.



- I legami salini, che si formano attraverso l'unione elettrostatica dei gruppi eteroatomici liberi degli amminoacidi, di natura acida e basica; al punto isoelettrico della fibra cheratinica la forza di questi legami è massima, mentre è possibile romperli immergendo il capello in una soluzione acida o alcalina, poiché la protonazione del gruppo carbossilico o la deprotonazione del gruppo ammonio causano la rottura del legame ed il fenomeno di rigonfiamento del capello.



- I legami ad idrogeno, che si formano tra gli atomi di ossigeno del gruppo CO e gli atomi di idrogeno del gruppo NH lungo la sequenza polipeptidica; questi legami possono essere facilmente rotti immergendo il capello in un solvente come l'acqua, poiché le molecole di solvente penetrano all'interno delle catene polipeptidiche influenzando il processo di rigonfiamento del capello.



La corteccia presenta una composizione chimica diversa tra matrice e fibrille: se la prima è composta principalmente da cistina e composti ricchi di zolfo, le proteine filamentose sono costituite da amminoacidi come leucina ed acido glutammico. Inoltre la corteccia presenta granuli di melanina che genera la pigmentazione del capello: in particolare,

l'eumelanina dà le sfumature dal bruno al nero, mentre la feomelanina dà sfumature dal biondo al rosso. La tonalità di colore di capelli in ciascun individuo dipende dalla dimensione dei pigmenti melanici, dalla distribuzione lungo la corteccia e dalla quantità. Il midollo del capello è costituito da amminoacidi acidi e basici come acido glutammico e lisina, mentre la percentuale di cisteina in questo strato è molto più bassa rispetto agli strati esterni.

1.2 Alterazioni cosmetiche del capello

Al giorno d'oggi, grazie ai progressi scientifici ottenuti in campo cosmetico, è possibile alterare permanentemente la forma o il colore dei capelli in base ai propri gusti attraverso trattamenti di permanente, per ottenere una capigliatura ricciola, stiraggio, per ottenere un capello liscio, o decolorazione.

La permanente prevede l'applicazione sul capello di una soluzione alcalina che ha lo scopo di sollecitare le cuticole del capello, provocandone l'apertura; si impiega inoltre un agente riducente, che deve penetrare all'interno del fusto e rompere i ponti disolfuro [8].

La rottura del legame covalente è necessaria per poter riarrangiare la struttura molecolare del capello, che viene avvolto nel bigodino per far sì che assuma la forma riccia. Lo step finale di ossidazione rende la permanente un trattamento definitivo: in questo modo infatti i ponti disolfuro del capello si riformano, riadattandosi in una struttura diversa da quella precedente. In genere sarebbe sufficiente l'esposizione del capello all'aria, ma per velocizzare il processo viene utilizzato perossido di idrogeno.

La chimica degli stiranti per capelli è simile a quella della permanente, con la differenza che i capelli vengono stressati attraverso una stiratura meccanica del capello e non avvolgendolo nel bigodino, per poi procedere allo step finale di ossidazione con un trattamento a caldo. Recentemente sono stati introdotti agenti stiranti per capelli basati sull'uso di aldeidi molto reattive quali la formaldeide ora sostituita dall'acido gliossilico [9],[10], [11].

Il processo di decolorazione modifica il tipo, la quantità e la distribuzione di pigmento melanico presente nella corteccia del capello ed è in genere effettuato per schiarire o preparare il capello all'applicazione di una tintura più chiara di quella naturale.

1.2.1 Deformazione permanente del capello

Sin dai primi anni del secolo scorso, la deformazione permanente del capello è stata una pratica di uso comune, avvalendosi dell'utilizzo di prodotti chimici spesso combinati al calore. In questo tipo di trattamento, in cui lo scopo è quello di modificare il legame covalente S-S della cistina utilizzando agenti riducenti, il ruolo del calore era quello di spostare l'equilibrio di reazione verso la rottura del ponte disolfuro; questa pratica non è più in uso per via del danneggiamento che provocava al capello.

Al giorno d'oggi, la deformazione del capello viene effettuata a freddo; come detto precedentemente, il trattamento prevede la riduzione dei ponti disolfuro che in genere viene effettuata con mercaptani, se è necessaria una riduzione forte, oppure solfiti o bisolfiti, caso di una riduzione più blanda.

Nel caso dell'utilizzo di soluzioni riducenti a base di mercaptani, come il tioglicolato, l'ambiente alcalino può provocare reazioni indesiderate nel capello, come l'idrolisi dei legami ammidici e peptidici che aumenta il rapporto tra gruppi acidi e basici nella fibra, alterando il punto isoelettrico e isoionico del capello.

che coinvolge solfiti o bisolfiti e capello è un attacco nucleofilo dello ione solfito ai ponti disolfuro della fibra e produce un equivalente di mercaptano e un equivalente di sale di Bunte:



Dopo la riduzione dei ponti disolfuro, è necessario procedere con l'ossidazione dei residui cisteinici e dei gruppi mercaptanici che permetteranno al capello di assumere permanentemente la forma richiesta.

Nonostante si sottoponga la fibra a un trattamento ossidante per riarrangiare i legami S-S, il capello risulta increspato, ed alcuni tioli liberi nella catena polipeptidica potrebbero non rimanere neutralizzati.

Studi approfonditi hanno dimostrato che il processo di deformazione permanente provoca la frammentazione delle proteine principalmente nella matrice del capello: la fibra che ha subito il trattamento permanente presenta perdite significative di cistina con corrispondente aumento di acido cisteico e cisteina [7].

1.2.2 Decolorazione del capello

La decolorazione del capello è un trattamento permanente di tipo ossidativo generalmente condotto in ambiente alcalino; la reazione che causa la decolorazione prevede la distruzione ossidativa dei gruppi cromofori dei pigmenti melanici che si trovano all'interno della corteccia. Per penetrare nel capello così in profondità sono necessarie condizioni di reazione severe, che provocano reazioni secondarie tra le proteine del capello e l'agente decolorante. In questo modo possono reagire anche i residui cistinici della matrice, nella corteccia del capello, ed altre zone ricche di cistina come lo strato A e l'esocuticola.

Analizzando la sezione del capello al microscopio è possibile distinguere due diversi tipi di pigmento: il pigmento in granuli, caratteristico dei colori dal castano chiaro al nero cupo, e il pigmento diffuso, specifico dei capelli dal biondo pallido al rosso-brunastro. Durante la decolorazione, la quantità di pigmento in granuli diminuisce regolarmente fino alla totale scomparsa, mentre emerge gradualmente la pigmentazione diffusa che rivela il riflesso predominante del capello naturale. Attraverso il processo di "bleaching" (sbiancamento), è possibile eliminare anche il pigmento diffuso, fino a ottenere il cosiddetto "color platino".

Formulazione del prodotto decolorante

In genere, per decolorare il capello si utilizzano creme decoloranti costituite da persolfati sotto forma di sali di sodio, di potassio e di ammonio. Quest'ultimo è il sale più attivo, perché diluendolo a pH alcalino porta alla formazione di ammoniaca che viene assorbita facilmente dal capello e ne permette il rigonfiamento. Questi prodotti possono contenere fino al 15% di ammoniaca, e sono principalmente costituiti da cere auto-emulsionanti, acidi grassi, tensioattivi cationici e polimeri quaternari.

Subito prima dell'uso, la crema decolorante deve essere mescolata a un'emulsione ossidante necessaria per distruggere i pigmenti melanici; in genere si utilizza il perossido di idrogeno in soluzione acquosa al 6% (20 vol), 9% (30 vol) o 12% (40 vol) e le concentrazioni vengono espresse in "volumi". Il volume di una soluzione di perossido di idrogeno è rappresentato dal numero di litri di ossigeno gassoso che possono essere sviluppati, in condizioni normali, da un litro di soluzione acquosa di H₂O₂. All'aumentare del titolo, aumenta la capacità decolorante della soluzione che al massimo della sua concentrazione (40 vol) è in grado di schiarire il capello fino a 4 toni. Questo tipo di

soluzioni è in genere instabile, per cui possono essere utilizzati agenti chelanti e/o stabilizzanti come ossichinolina solfato o acido etilendiammino-tetracetico (ETDA).

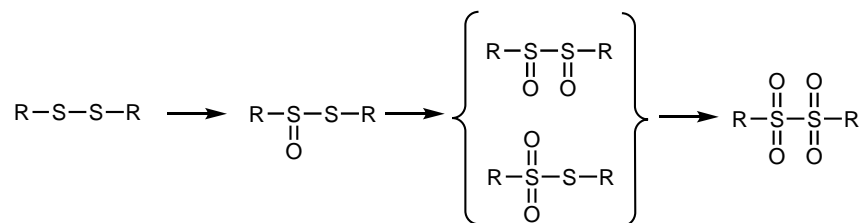
La miscela risultante viene quindi applicata al capello e lasciata in posa, di solito scaldando per velocizzare il processo.

Meccanismo di azione

La trasformazione della melanina in risposta ad un ambiente ossidante può essere definita come una depolimerizzazione, che dà luogo a derivati carbossilati solubili in ambiente alcalino facilmente eliminabili con una sciacquatura. Gli agglomerati di melanina sono legati alla cheratina per mezzo di residui polipeptidici e, per solubilizzare il pigmento melanico, è necessario rompere i ponti disolfuro presenti nella trama proteica, coinvolgendo nell'ossidazione anche la cheratina. Studi *in vitro* [12] hanno infatti dimostrato come la melanina sia molto resistente ad ambienti alcalini, ma altamente sensibile ad ambienti ossidanti.

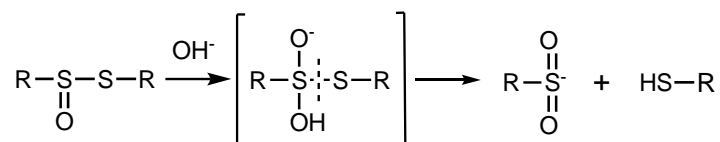
È stato constatato che la trasformazione della melanina sia dovuta a due diversi tipi di reazione: la fissazione dell'ossigeno da parte dei ponti disolfuro, seguita da una dismutazione alcalino-indotta delle specie ossidate. Infatti, poiché la decolorazione del capello viene condotta in ambiente acquoso ossidante ed alcalino, la reazione di idrolisi degli intermedi cistinici ossidati può competere con la ri-ossidazione di questi ultimi; inoltre, può avvenire la reazione di disproporzionamento degli ossidi derivati dalla cistina, rendendo più complesso lo schema di reazione.

La fissazione dell'ossigeno agli atomi del legame disolfuro è possibile grazie ai numerosi stati di ossidazione dello zolfo che permettono al ponte di legare fino a quattro atomi di ossigeno.



Schema 1.1: Fissazione dell'ossigeno sulla cheratina

I derivati ossidati della cistina mostrano una maggiore sensibilità rispetto alla cistina all'ambiente alcalino: questo provoca infatti una scissione del ponte disolfuro che porta alla formazione di un acido ossi-solfurato e tiolo.



Schema 1.2: Scissione alcalino-indotta

Numerosi studi su prodotti decoloranti attualmente in commercio mostrano che i prodotti di ossidazione intermedi della cistina, cioè i solfuri monossido, diossido, triossido non sono prodotti finali presenti in quantità significativa nel capello decolorato, al contrario dell'acido cisteico che è l'unico prodotto di ossidazione osservato.

amminoacido	mol/g di capello	
	Fibre non decolorate	Fibre decolorate
Acido aspartico	437	432
Treonina	616	588
Serina	1085	973
Acido Glutammico	1030	999
Prolina	639	582
Glicina	450	415
Alanina	370	357
Cisteina	1509	731
Valina	487	464
Metionina	50	38
Isoleucina	227	220
Leucina	509	485
Tirosina	183	146
Fenilalanina	139	129
Acido Cisteico	27	655
Lisina	198	180
Isitdina	65	55
Arginina	511	486

Tabella 1. Amminoacidi presenti nel capello non decolorato e decolorato [13]

1.3 Prodotti commerciali ad azione ristrutturante

I gruppi mercaptanici presenti nelle fibre cheratiniche possono dare addizione nucleofila agendo con le olefine più reattive, cioè quelle contenenti un forte gruppo elettron –

attrattore vicino al doppio legame come ad esempio i vinil solfoni e le maleimidi N-sostituite, dando luogo ad una addizione tiolica di Michael [14].

Questo tipo di reazione è riportato anche in letteratura, in uno studio riguardante la citotossicità di alcuni idrossi-naftochinoni nei confronti dei cheratinociti naturalmente presenti nella pelle: in particolare si fa riferimento alla deplezione di glutatione, un tripeptide situato nel citoplasma cellulare costituito da acido glutammico, cisteina e lisina, da parte di un potente elettrofilo come il 5-idrossi-1,4-naftochinone, comunemente noto come juglone [15].

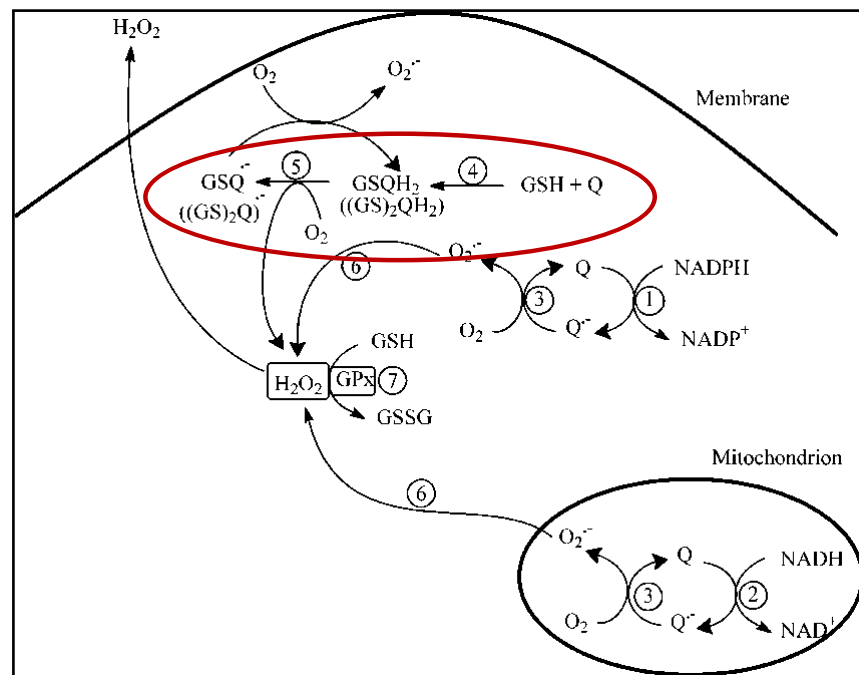


Figura 1.3: Meccanismi di azione citotossica dei chinoni in sistemi cellulari[15]

I capelli danneggiati da stress ambientali o agenti fisici e chimici possono contenere numerosi residui proteici di varia origine; lungo la sequenza amminoacidica della cheratina deteriorata sarà possibile, quindi, trovare una rilevante percentuale di componente cisteinica, che presenta il caratteristico gruppo tiolico laterale.

Secondo alcuni studi condotti negli ultimi decenni da aziende americane ed europee, sembra sia possibile ripristinare la struttura esterna del capello rovinato attraverso l'utilizzo di prodotti ricostruttori contenenti, come ingredienti attivi, molecole reattive nei confronti dei tioli. Di recente sono stati messi in commercio trattamenti per uso professionale i cui brevetti dichiarano la ricostruzione e la moltiplicazione dei ponti disolfuro; in molti di questi casi, il trattamento viene effettuato durante un processo di

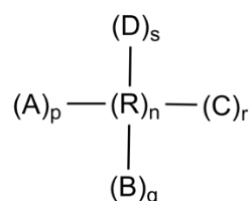
decolorazione, aggiungendo il prodotto ristrutturante alla miscela decolorante, nonostante si confermi il suo funzionamento anche applicandolo dopo un'opportuna diluizione in acqua.

1.3.1 Olaplex® (Liqwd, Inc.)

Il marchio in questione è protetto da sette brevetti depositati dalla Liqwd, Inc., Santa Barbara, CA (US), ma per esaminare i metodi utilizzati è possibile ricondursi a tre brevetti principali.

Brevetto 1: WO2015017768 (A1) – Methods for fixing hair and skin [16]

Il seguente brevetto espone un metodo per il trattamento dei capelli che comprende l'applicazione di una formula contenente almeno un ingrediente attivo, con almeno due terminazioni in grado di reagire con i tioli presenti nella struttura del capello deteriorato. La molecola può contenere o meno un linker tra le metà reattive, legato a queste ultime mediante legami ionici. L'ingrediente attivo può avere la seguente struttura



A, B, C e D sono le terminazioni reattive contenenti una o più cariche; queste molecole sono state scelte indipendentemente tra quelle appartenenti agli accettori di Michael, che comprendono gruppi succinimidici, maleimidici, vinil solfonici, isocianati, epossidici, ma anche gruppi elettrofili reattivi nei confronti dei tioli, come gruppi acrilati, stirenici, acrilammidici, metacrilammidici, maleati, fumarati, vinil eterei e vinil esterei, allil eterei ed allilesterei.

R è il linker contenente cariche di segno opposto alle metà reattive tali da rendere la molecola neutra; tra le molteplici molecole rivendicate, i linker selezionati appartengono ai gruppi alcossidi, alchilici, alchenilici, cicloalchilici, cicloalchenilici.

Alcuni esempi di agenti leganti sono riportati di seguito:

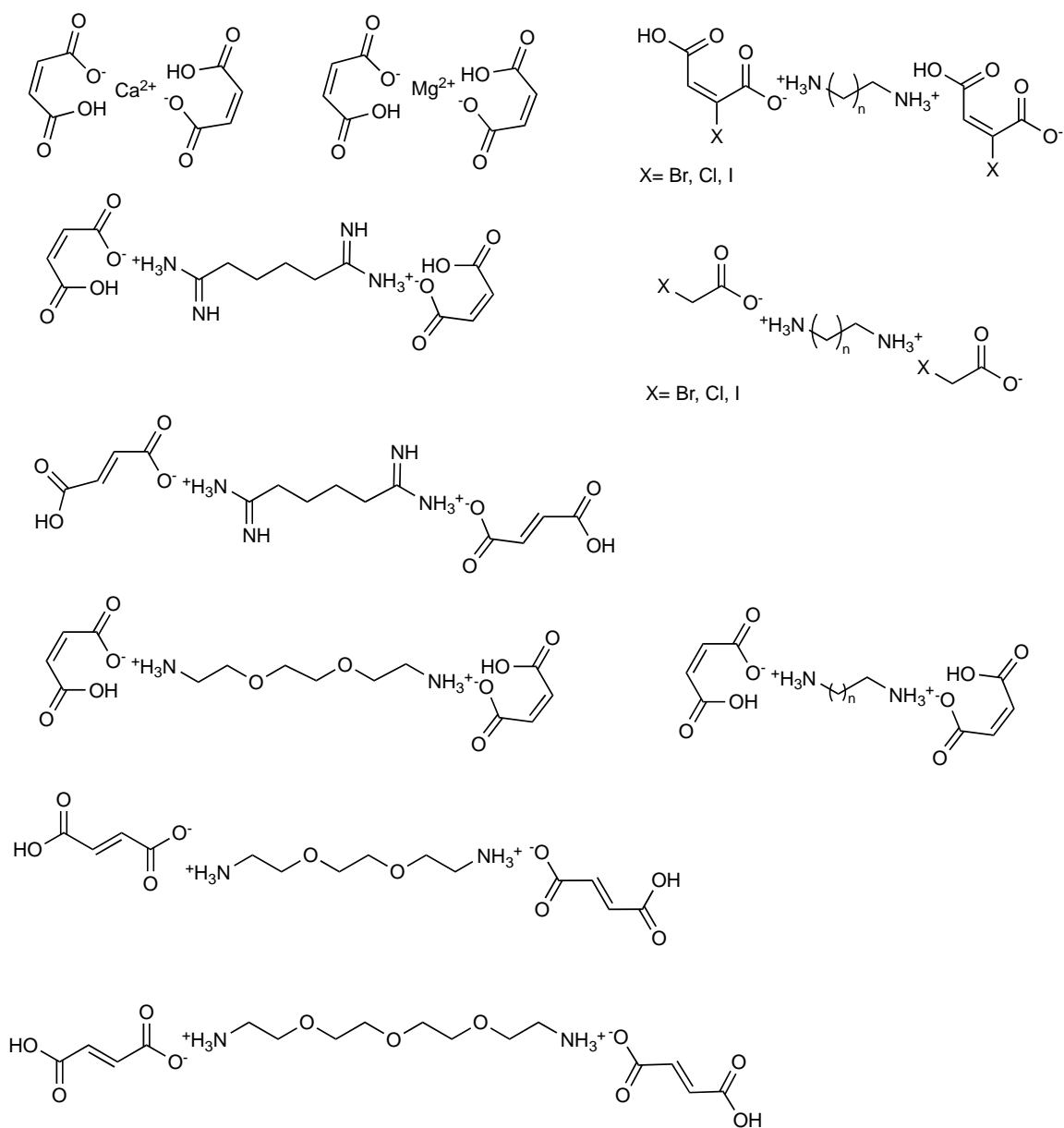


Figura 1.4: Possibili ingredienti attivi del brevetto WO2015017768 (A1)

in particolare, l'agente attivo può essere:

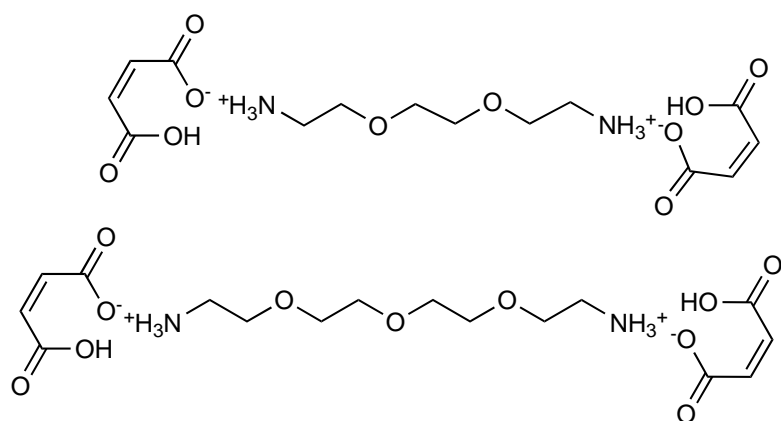


Figura 1.5: agenti attivi proposti dal brevetto WO2015017768 (A1)

La formulazione può contenere eccipienti come acqua, surfactanti, vitamine, estratti naturali, conservanti, agenti chelanti, profumi, antiossidanti, agenti coloranti, proteine, amminoacidi, emollienti, umidificanti, addensanti, agenti fissativi, opacizzanti, sali, regolatori di pH, agenti neutralizzanti, tamponi, agenti condizionanti, agenti antistatici ed anticrespo e combinazione dei suddetti.

Infatti, il prodotto può essere applicato al capello sotto forma di gel, crema, lozione, shampoo o balsamo a seconda degli eccipienti utilizzati.

È consigliato applicare il prodotto su un capello che ha subito trattamenti con agenti riducenti in grado di rompere il legame disolfuro della cistina per produrre gruppi tiolici liberi; gli agenti riducenti possono essere acidi tioglicolici e suoi derivati esterei e salini, cisteina e suoi derivati, solfiti inorganici, sodio metabisolfito, ditiotreitolo, fosfine organiche e stiranti giapponesi.

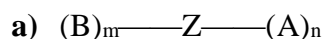
Il trattamento del capello con agenti ricostruttori è inoltre applicato al capello trattato con formulazioni contenenti agenti sbiancanti, anche questi in grado di produrre gruppi tiolici liberi.

Brevetto 2: US2015328102 (A1) – Keratin treatment formulations and Methods [17]

Il brevetto studiato rivendica un metodo per il trattamento dei capelli che comprende l'applicazione di una formula contenente almeno un ingrediente attivo composto da due unità legate tra loro direttamente o indirettamente tramite un linker.

L'ingrediente attivo è un composto contenente almeno un gruppo funzionale ionizzabile in grado di formare legami ionici e almeno un gruppo funzionale in grado di legarsi covalentemente ai gruppi tiolici.

L'ingrediente attivo può avere le seguenti strutture a), b) e c):



dove A è il gruppo funzionale ionizzabile come $-\text{COOH}$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{PO}_3\text{H}_2$, $-\text{N}(\text{R})_2$, $-\text{N}(\text{R})_3$; m ed n sono numeri interi che possono variare da 0-6 e la somma dei due valori deve essere maggiore o uguale a 2.

Z rappresenta il linker e può anche essere assente nella struttura della molecola; se presente, può essere un gruppo alchilico, alchenilico, cicloalchilico, cicloalchenilico, arilico, eterocicloarilico, eteroarilico.

B è il gruppo funzionale in grado di formare un legame covalente con un nucleofilo come ad esempio le seguenti strutture:

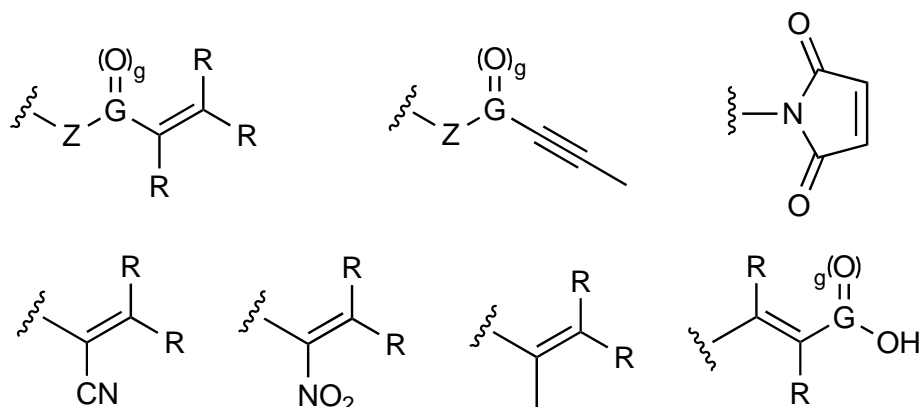
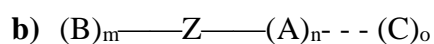


Figura 1.6: Possibili strutture di B secondo il brevetto US2015328102 (A1)

In alternativa, la formulazione può comprendere un agente attivo con la struttura descritta in seguito:



in cui A, B e Z hanno lo stesso significato precedentemente riportato.

C contiene un gruppo ionico ed un gruppo funzionale in grado di formare un legame covalente con un nucleofilo, ed ha una carica opposta a quella del gruppo ionizzabile; o è un numero intero indipendentemente scelto tra 0-6 ed è tale che la somma delle cariche C ed A è zero.

c) Se Z è assente, possono essere inclusi tra gli ingredienti attivi i seguenti acidi, compresi i derivati salini:

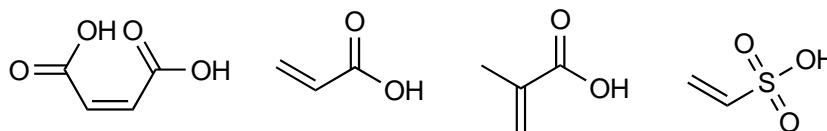


Figura 1.7: ingredienti attivo nella terza formulazione del brevetto US2015328102 (A1)

Anche in questo caso, alla formulazione possono essere aggiunti eccipienti in grado di condizionare il capello e rendere l'applicazione più omogenea.

Inoltre, come nel caso precedente, viene rivendicata l'applicazione di questo trattamento a capelli trattati con agenti riducenti o decoloranti, in grado di formare gruppi –SH liberi nella struttura del capello.

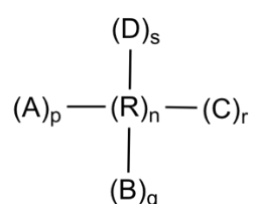
Brevetto 3: US2015/0034119 (A1) – Hair color smoothing compositions and methods [18]

Il brevetto in questione descrive un metodo per la colorazione dei capelli che comprende l'applicazione di due formulazioni:

- a) una prima formulazione contenente un agente colorante ed un agente riducente capace di rompere i ponti disolfuro nella fibra;
- b) una seconda formulazione contenente un agente reticolante in grado di reagire con un tiolo.

L'agente reticolante è formato da almeno due terminazioni reattive in grado di reagire con gruppi nucleofili, connesse tra loro da un linker.

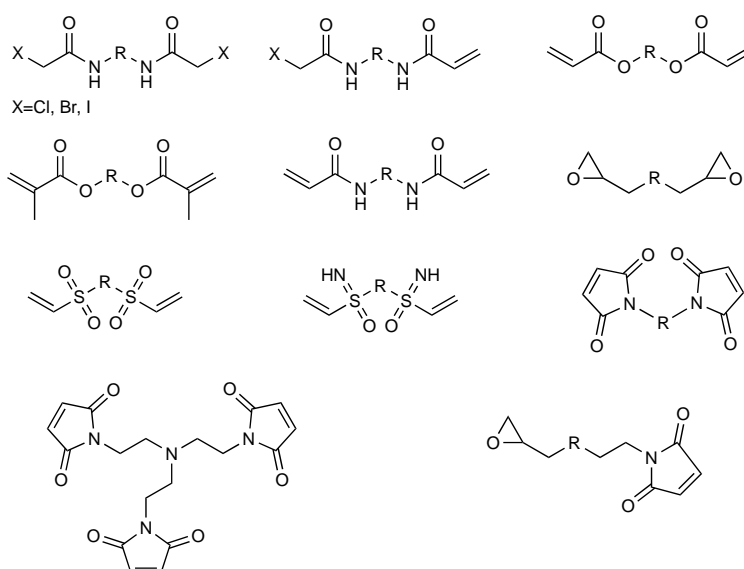
La molecola crosslinkante può avere la seguente struttura:



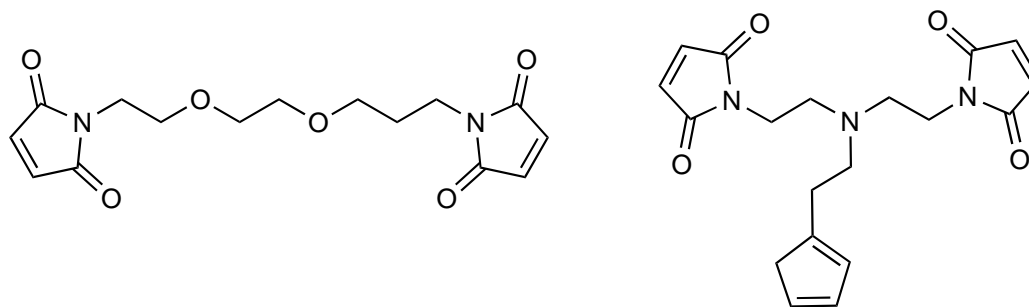
A, B, C e D sono le terminazioni reattive.

R è il linker e comprende molte molecole, inclusi i polimeri.

L'agente reticolante può avere le seguenti strutture:



ed in particolare, si preferisce che la scelta sia limitata alle seguenti molecole:



Il brevetto prevede molteplici metodi di applicazione, in cui gli steps a) e b) possono essere condotti sequenzialmente o simultaneamente, mescolando le due formulazioni.

Come nel caso precedente, alla formulazione possono essere aggiunti eccipienti in grado di condizionare il capello ed è possibile applicare questo trattamento a capelli trattati con agenti riducenti o decoloranti, in grado di formare gruppi -SH liberi nella struttura del capello.

1.3.2 BC complex® (Kemon S.p.A)

Il seguente brevetto ha lo scopo di fornire composizioni e metodi che permettono di riparare e/o rinforzare i capelli dopo trattamenti di lavaggio, di riduzione o di ossidazione.

Nel documento si dichiara di essere riusciti nella riparazione del capello, includendo nella formulazione un terpene aciclico idrocarburico C10-C40 come ingrediente attivo, preferibilmente lo squalene, che reagisce con i gruppi SH attraverso una *thiol-ene click reaction* ponendosi a ponte tra più gruppi tiolici.

Tale ingrediente attivo deve preferibilmente essere associato ad un accettore di Michael, preferibilmente acido shikimico quindi un composto α,β -insaturo in grado di fungere da elettrofilo per la reazione di addizione ed agire sinergicamente con il terpene aciclico.

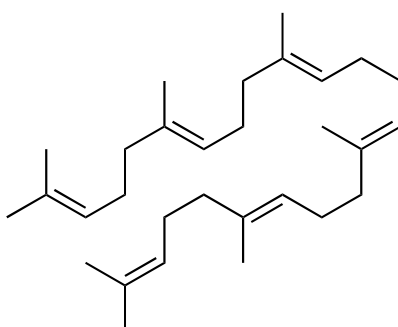


Figura 1.8: Squalene

Tale ingrediente attivo deve preferibilmente essere associato ad ulteriori componenti attivi come gli accettori di Michael, preferibilmente acido shikimico e acido sorbico quindi

composti α,β -insaturi in grado di fungere da elettrofili per la reazione di addizione ed agire sinergicamente con il terpene aciclico.

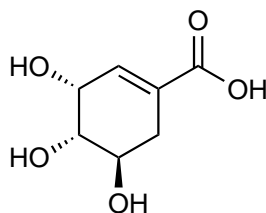


Figura 1.9: Acido shikimico

La formulazione prevede anche l'utilizzo di un catalizzatore come prolina e di un linker, cioè una molecola contenente un gruppo funzionale che può essere impiegato per legare l'accettore di Michael e/o il terpene aciclico ai gruppi tiolici del capello; esempi di molecole scelte come linker sono lisina e suoi derivati salini.

Infine, il brevetto dichiara che la composizione cosmetica può comprendere eccipienti cosmeticamente accettabili come acqua, surfactanti, vitamine, estratti naturali, conservanti, agenti chelanti, profumi, antiossidanti, agenti coloranti, proteine, amminoacidi, emollienti, umidificanti, addensanti, agenti fissativi, opacizzanti, sali, regolatori di pH, agenti neutralizzanti, tamponi, agenti condizionanti, agenti antistatici ed anticrespo e combinazione dei suddetti.

1.4 Addizione di Sulfa-Michael

L'addizione di Michael è una reazione molto conosciuta per la sua ampia applicazione in sintesi organica, data la sua capacità di dare prodotti altamente selettivi e la sua efficienza in condizioni di reazione ecologicamente sostenibili.

Questa reazione è un particolare tipo di addizione coniugata 1,4 in cui il forte attacco nucleofilo al carbonio in posizione β al carbonio carbonilico α - β insaturo porta alla formazione di un enolato intermedio carico negativamente, che dopo protonazione dà l'addotto di Michael atteso.

La reazione risulta utile per formare facilmente legami covalenti C-C (addizione "carbon-Michael"), C-N (addizione "aza-Michael"), C-S (addizione "Sulfa-Michael"), e C-O (addizione "oxa-Michael") [19]

In particolare, la reazione di Sulfa-Michael è anche definita una "click reaction" per l'estrema rapidità con cui si formano gli addotti e per la capacità di dare rese quantitative di prodotti specifici anche in soluzioni diluite. In questo tipo di reazione la versatilità fornita dal legame debole S-H del nucleofilo permette l'utilizzo di una vasta gamma di

iniziatori, anche blandi che consentono di ottenere migliori rese di reazione, come sodio metossido e NEt_3 . Data la vasta gamma di reazioni che coinvolgono tioli, è importante tenere conto che la reattività di uno specifico tiolo utilizzato in una reazione gioca un ruolo importante nel determinare la cinetica di reazione e la specificità del prodotto.

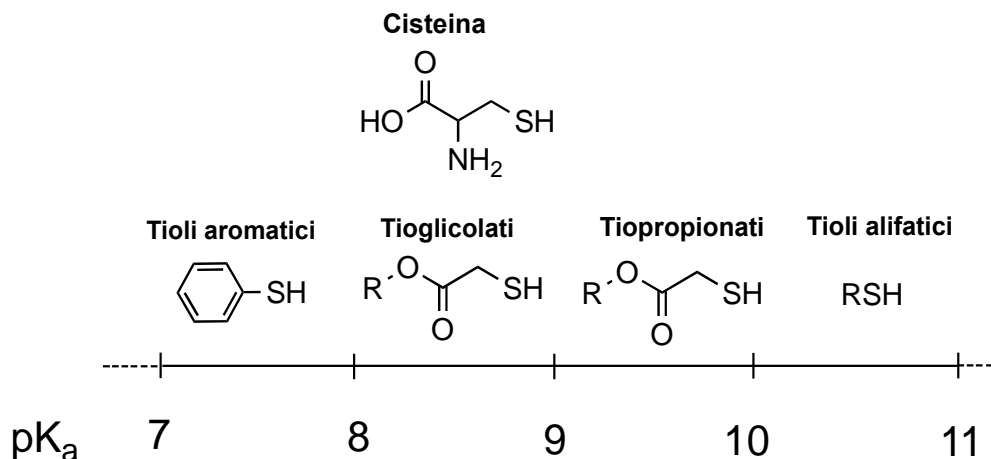
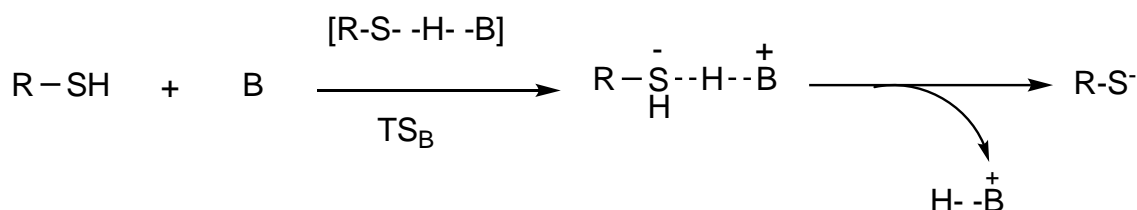
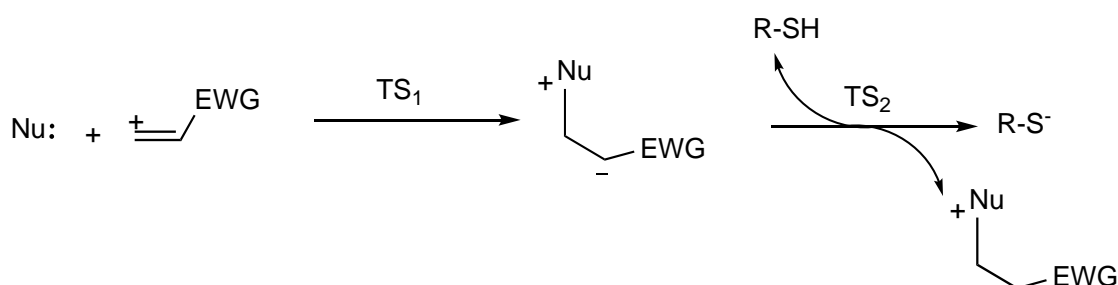


Figura 1.10: acidità SH di diversi tipi di tioli [19]

In genere, i precursori più efficienti per la reazione di sulfa-Michael sono catalizzatori basici o nucleofili, i cui meccanismi di catalisi sono mostrati di seguito:



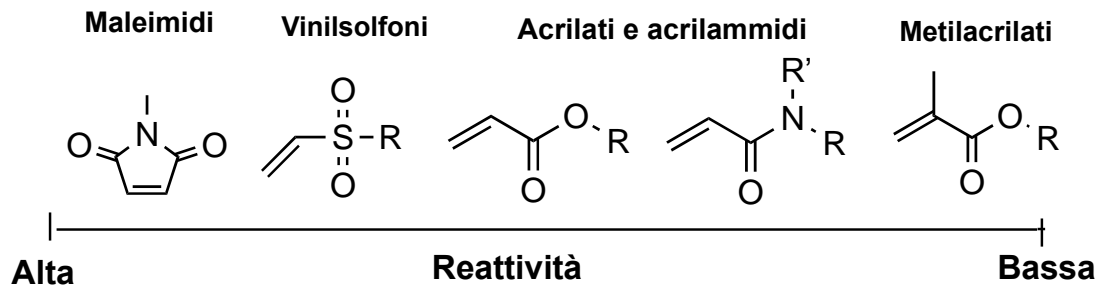
Schema 1.3: Meccanismo catalizzato da base



Schema 1.4: Meccanismo catalizzato da nucleofilo [19]

Per quanto riguarda la catalisi basica, la base strappa un protone del tiolo che genera l'anione tiolato, insieme al corrispondente acido coniugato. L'anione tiolato in genere è un forte nucleofilo e permette l'addizione dell'anione al carbonio elettrone-deficiente in posizione β al carbonio carbonilico α - β insaturo dell'accettore di Michael: questo stadio

determina la cinetica della reazione e dipende dalla basicità del catalizzatore, dall'acidità del tiolo e dall'elettrofilia dell'accettore di Michael.



Schema 1.5: Reattività dei diversi accettori di Michael [19]

Nel secondo caso di catalisi, il nucleofilo subisce addizione coniugata da parte del doppio legame attivato, generando un intermedio carbanionico stabile che deprotona il tiolo: così si forma, anche in questo caso, l'anione tiolato che dà luogo alla reazione di Michael. In questo caso, la cinetica della reazione dipende dalla nucleofilia del catalizzatore, poiché all'aumentare di questa aumenterà il numero di intermedi tiolati attivi che si possono generare [19].

2 Scopo della tesi

L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di valutare la reattività di residui cisteinici presenti nel capello umano con accettori di Michael di possibile interesse in campo biologico e cosmetologico, ipotizzando che la reazione di addizione di Sulfa-Michael sia alla base del meccanismo di funzionamento di prodotti commerciali per capelli ad azione ristrutturante; è stato infatti riscontrato da letteratura brevettuale come il processo di ricostruzione attribuito ai prodotti commerciali necessita di studi più approfonditi per quanto riguarda lo studio del meccanismo di reazione, l'effetto sul capello umano e l'utilizzo di accettori di Michael alternativi a quelli attualmente utilizzati.

In alcuni brevetti esaminati, relativi ai suddetti prodotti commerciali, viene rivendicato l'utilizzo di molecole in grado di reagire da accettori di Michael con le terminazioni tioliche della cisteina presente nel capello deteriorato.

Pertanto si è deciso, in un primo momento, di indagare sulla ricerca di accettori di Michael alternativi a quelli rivendicati dai brevetti esaminati, studiando la reazione modello tra *N*-acetil-*L*-cisteina e diversi possibili elettrofili, in condizioni operative blande.

Successivamente si è voluto investigare, attraverso spettroscopia Raman/IR e microscopia a scansione elettronica (SEM), sull'effetto del trattamento del capello con agenti ricostruttori, sia quelli studiati nelle reazioni modello, sia quelli utilizzati nei prodotti commerciali.

Lo studio in spettroscopia Raman/IR è stato effettuato dalla professoressa P. Taddei del Dipartimento di Scienze Biomediche e Neuromotorie dell'Università di Bologna.

3 Risultati e discussione

Questa parte è stata suddivisa in due sezioni: la prima focalizzata sia sulla ricerca di nuove molecole adatte a produrre interazioni con residui amminoacidici del capello che hanno subito trattamento chimico, sia su indagini volte a verificare se alcuni composti commerciali utilizzati in prodotti ricostruttori del capello potessero agire dando interazioni con i residui cisteinici.

La seconda parte è stata dedicata all'impiego di alcuni dei composti identificati nella parte iniziale su ciocche di capelli umani trattati con agenti destrutturanti.

3.1 Modelli di reazione

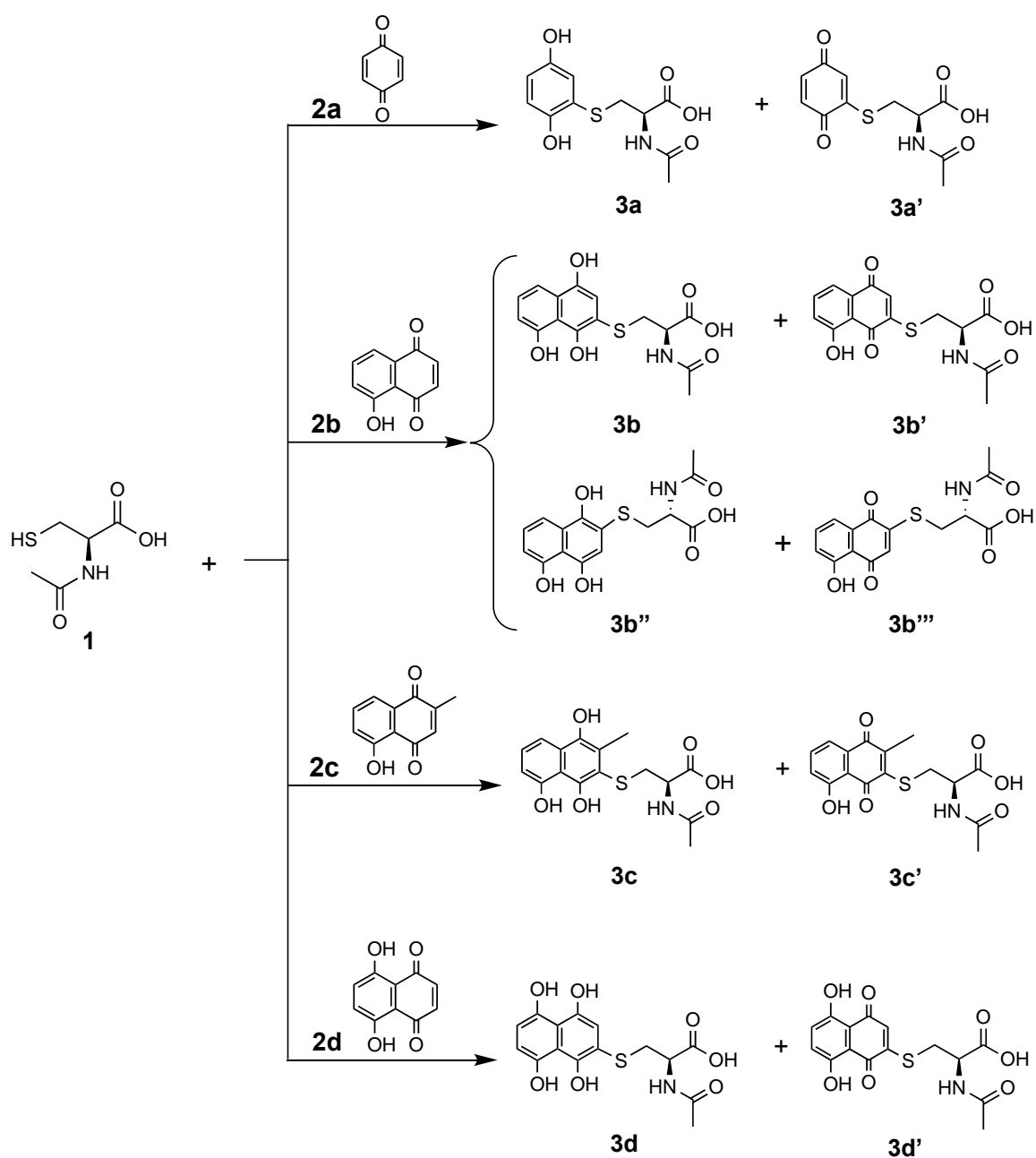
Basandosi sui dati di letteratura e sull'analisi brevettuale discussa nei capitoli introduttivi, l'approccio utilizzato è stato quello di impiegare derivati della cisteina e studiarne l'interazione con alcuni accettori di Michael. Tale reazione (la sulfa-Michael) potrebbe essere infatti responsabile dell'azione ristrutturante che ha luogo sui capelli precedentemente decolorati che, nonostante l'azione di alcuni agenti ossidanti presenti nei prodotti commerciali, potrebbero ancora contenere gruppi tiolici liberi.

Per tale motivo le reazioni modello sono state effettuate utilizzando *N*-acetil-*L*-cisteina, estere metilico dell'*N*-acetil-*L*-cisteina e, in un caso, glutatione.

Di seguito verranno discussi i risultati ottenuti suddividendoli per classi di accettori di Michael utilizzati. Particolare attenzione è stata rivolta all'uso di composti che fossero il più possibile compatibili con le condizioni a cui è sottoposta l'azione dei ricostruttori.

3.1.1 Reazioni con derivati chinonici

La reazione tra *N*-acetil-*L*-cisteina e i derivati chinonici **2a-d** è stata condotta in diverse condizioni sperimentali:



Schema 3.1: Reazioni tra N-acetil-L-cisteina (**1**) e derivati chinonici (**2a-d**)

In particolare inizialmente la reazione tra quantità equimolare di **1** e benzochinone (**2a**) è stata condotta in acqua per creare un ambiente molto simile a quello presente durante il trattamento del capello, nonostante la bassa solubilità di **2a**. L'andamento della reazione è stato seguito mediante TLC e dopo circa 2 h la miscela è stata trattata con acetato di etile.

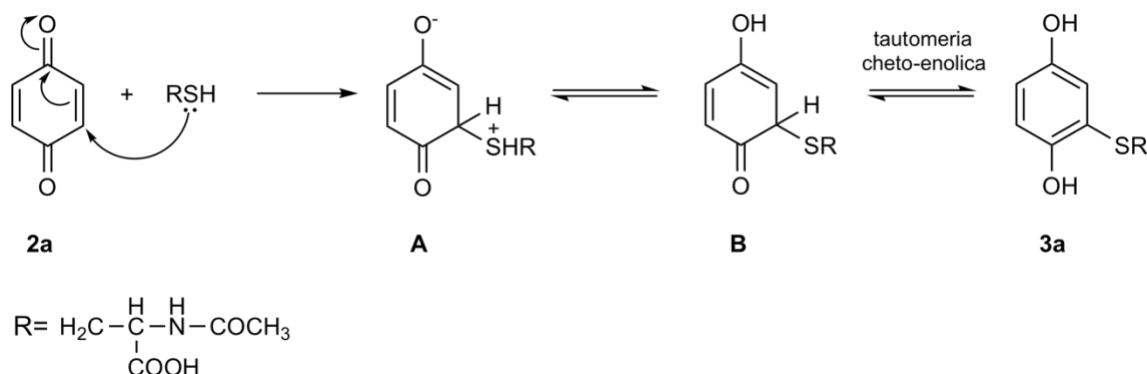
L'estratto organico, dopo anidrifcazione, filtrazione e concentrazione, è stato sottoposto ad analisi ^1H NMR in CD_3CN . Lo spettro ha mostrato la presenza di numerosi segnali, alcuni dei quali compatibili con quelli degli addotti di Michael.

Dati i risultati promettenti, la reazione è stata ripetuta e il grezzo di reazione sottoposto a cromatografia su colonna di gel di silice. Sono state ottenute due frazioni. Lo spettro ^1H NMR di una di queste è compatibile con quello della struttura **3a** e in accordo con i dati di letteratura.

La seconda frazione, isolata in tracce, presenta uno spettro ^1H NMR compatibile con una struttura del tipo e **3a'**.

Va osservato che il prodotto ottenuto non corrisponde a quello atteso derivante da una classica reazione di sulfa-Michael su sistemi carbonilici alfa-beta insaturi. Questo è in accordo con quanto riportato in letteratura dove è stata descritta la reazione di addizione di mercaptani su **2a**: i prodotti ottenuti, anche in questo caso, sono di tipo idrochinonico [25].

L'ottenimento del prodotto idrochinonico **3a** può essere spiegato ipotizzando il percorso meccanicistico mostrato nello Schema 3.2.



Schema 3.2: meccanismo di reazione che porta al prodotto idrochinonico (**3a**)

Il primo passaggio consiste in una addizione di tipo sulfa-Michael che porta all'intermedio **A**, che verosimilmente evolve molto velocemente verso l'intermedio neutro **B**. Quest'ultimo, per tautomeria cheto-enolica, dà luogo al prodotto **3a** grazie alla stabilizzazione di risonanza del sistema aromatico che si forma.

In seguito la reazione è stata condotta in miscela $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ 9:1 v/v con eccesso di **2a**, in condizioni simili a quelle riportate in un lavoro presente in letteratura [20]. Queste condizioni permettono un'omogeneità della soluzione grazie alla solubilità in CH_3OH del chinone. In tali condizioni, dopo cromatografia, è stata isolata una frazione il cui spettro

^1H NMR corrisponde a quello del prodotto **3a** la cui resa è stata superiore a quella ottenuta nel caso precedente.

Dopo aver appurato che le migliori condizioni di reazione prevedono l'utilizzo di CH_3OH come solvente, l'attenzione è stata rivolta all'uso di altri derivati benzochinonici. A questo scopo sono stati impiegati i composti **2b-d**, derivati naftochinonici attivi in sistemi naturali: i composti **2b** e **2c**, noti rispettivamente come juglone e naftazarina sono presenti, rispettivamente, in diverse parti di piante della famiglia delle Juglandaceae e delle Proteaceae (genere *Lomatia*). La plumbagina è stata isolata da radici di piante appartenenti alla famiglia delle plumbaginacee [21], [22], [23].

La reazione tra **1** e **2b** potrebbe portare, in linea di principio, ai 4 isomeri indicati come **3b**, **3b'**, **3b''** e **3b'''** nello Schema 3.1.

Dopo purificazione mediante FC su colonna di gel di silice, è stata isolata una frazione contenente 2 regioisomeri in rapporto 70:30.

Le analisi ^1H NMR, ^{13}C NMR e di massa sono in accordo con le strutture **3b'** e **3b''**.

Questo risultato è inatteso in quanto sulla base del meccanismo riportato nello Schema 3.2, ci si attendeva anche per lo juglone un prodotto naftoidrochinonico, nelle sue due forme regioisomeriche **3b** e **3b''**. Il fatto di aver isolato le forme ossidate **3b'** e **3b'''** potrebbe essere dovuto alla forte predisposizione dei prodotti idrochinonici a subire ossidazione [6] anche in presenza di ossigeno atmosferico o luce, a causa della elevata tendenza a formare specie radicaliche.

Infatti è noto come i derivati benzochinonici siano suscettibili di reazioni implicanti intermedi di tipo radicalico e anche di ossidazione all'aria, che implicano spesso il verificarsi di reazioni complesse [24].

Occorre inoltre osservare che da una ricerca bibliografica è emerso un limitatissimo numero di studi sulla reattività dello juglone, pur essendo tale composto noto da secoli e utilizzato come agente cosmetico che imita l'abbronzatura, oltre che come colorante.

Talvolta l'effetto dell'interazione dello juglone con l'epidermide, che genera pigmentazione, è stato attribuito alla formazione di non ben specificato "sclerojuglone" ma non sono stati riportati lavori scientifici sulla reazione chimica che avviene per dare questo effetto. Come si vedrà in seguito nella sezione applicativa, l'uso di juglone sul capello decolorato ha portato a un miglioramento della sua struttura a livello cuticolare.

La reazione tra **1** e plumbagina (**2c**) ha dato formazione di un numero molto elevato di prodotti non identificati che, nonostante i numerosi tentativi di purificazione mediante cromatografia (FC, TLC preparativa) non sono stati isolabili.

Anche la reazione tra (**1**) e naftazarina (**2d**) ha dato un ^1H NMR del grezzo di reazione piuttosto complesso.

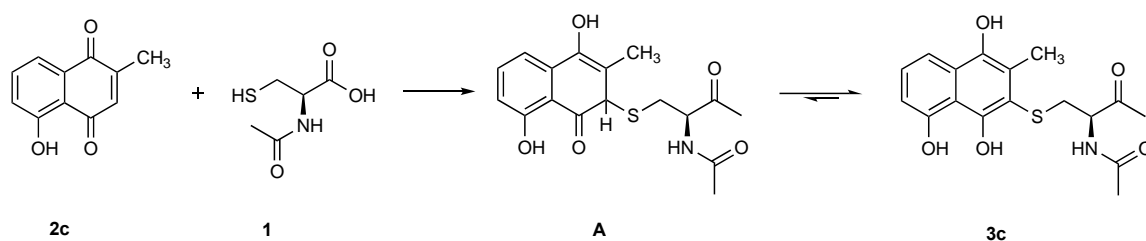
A questo punto si è pensato di seguire l'andamento delle reazioni in esame attraverso spettroscopia ^1H NMR conducendo le stesse direttamente nel tubo per NMR in CD_3OD come solvente.

Lo spettro ^1H NMR, dopo 30 minuti dal mescolamento di **1** e **2a** ha mostrato conversione del 63% nel prodotto **3a**; tale valore è rimasto invariato anche dopo 2.5 h.

Nel caso della reazione fra **1** e juglone (**2b**), dopo 30 minuti dal mescolamento lo spettro ^1H NMR in metanolo deuterato ha mostrato la presenza di reagenti assieme a numerosi segnali di difficile attribuzione alcuni dei quali, dopo 2.5 h sono aumentati di intensità. Nonostante l'indicazione all'NMR della formazione di più specie, dopo purificazione mediante cromatografia è stata isolata una miscela di due prodotti identificati come **3b'** e **3b''** suddetti e questo si è verificato anche ripetendo più volte l'esperimento. Questo suggerisce di essere in presenza di più reazioni che danno un sistema piuttosto complesso; tuttavia, lo spettro ^1H NMR della miscela grezza di reazione, registrato dopo 3 giorni, ha mostrato un numero di segnali minore di quelli ottenuti a poche ore dalla miscelazione dei due reagenti, confermando così quanto suddetto relativamente all'isolamento dei prodotti di reazione.

La reazione in tubo NMR fra **1** e plumbagina (**2c**) ha dato, dopo 30 minuti, conversione del 17% in 2 prodotti in rapporto relativo percentuale di 86/14. Dopo 2.5 h la conversione è diventata del 46% e il rapporto relativo fra i due prodotti è divenuto 63/37. Una possibile spiegazione, sulla base del fatto che del prodotto più abbondante non se ne sia trovata evidenza dopo la classica procedura di estrazione della miscela di reazione quando la stessa era stata condotta in condizioni usuali e non direttamente in tubo per NMR, è che il primo composto che si forma possa essere un intermedio di reazione che poi evolve verso il prodotto finale (Schema 3.3). Questa ipotesi è supportata dal fatto che lo spettro ^1H NMR della miscela, registrato dopo 5 giorni ha mostrato assenza dei segnali appartenenti sia a **2c** che al composto indicato con **A** e presenza dei segnali attribuiti a **3c** oltre a tracce di **1** e di un altro prodotto (x) in rapporto relativo percentuale di 30/70 con i segnali ascritti a **3c**.

Il campione è stato quindi analizzato per registrarne lo spettro ^{13}C NMR: dopo l'acquisizione, durata 12 h, lo spettro ^1H NMR ha mostrato segnali di **3c** ma anche quelli dell'altra specie denominata x in quantità quasi equimolare con **3c** che, sulla base di considerazioni spettroscopiche è stata ascritta alla forma chinonica **3c'**. L'analisi di massa ESI della miscela ha dato conferma della presenza di entrambe le specie **3c** e **3c'**, indicando l'evoluzione che tali sistemi possono subire e spiegando al contempo sia le difficoltà di separazione incontrate che la scarsità di dati presente in letteratura.



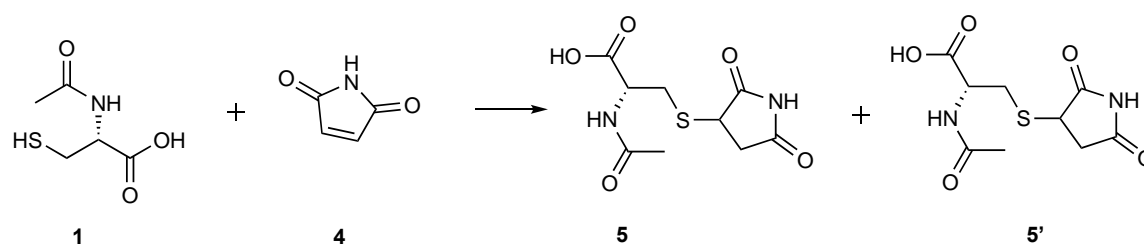
Schema 3.3: Possibile meccanismo di reazione fra plumbagina (**2c**) e *N*-acetyl-*L*-cisteina (**1**)

Infine la reazione fra quantità equimolari di naftazarina (**2d**) e *N*-acetyl-*L*-cisteina (**1**), condotta in tubo NMR in metanolo deuterato ha dato, dopo 30 minuti, uno spettro ^1H NMR in cui erano presenti i segnali dei reagenti molto intensi e, assieme a tracce di altri composti non identificati, alcuni segnali sono stati tentativamente attribuiti al prodotto di reazione **3d**, i cui segnali dopo 2,5 h sono aumentati di intensità rispetto a quelli dei reagenti. L'analisi di massa ESI, sia in modalità ioni positivi che ioni negativi della miscela di reazione ha indicato presenza sia di **3d** che **3d'**.

In base ai risultati ottenuti con derivati chinonici, si può affermare che la reazione di sulfa-Michael con *N*-acetyl-*L*-cisteina, finora mai esplorata con i substrati **2b-d** ha dato, quando effettuata direttamente in tubo per spettroscopia NMR e monitorata nel tempo, evidenze di formazione di uno o più prodotti di reazione ma ha altresì mostrato difficoltà nell'isolamento degli stessi mediante classico 'work-up' e purificazione tecniche cromatografiche e ha indicato l'esigenza di mettere a punto il metodo di trattamento del grezzo e di purificazione dei prodotti. Inoltre occorre osservare che lo spettro ^1H NMR delle reazioni suddette ha mostrato presenza di segnali molto stretti, ad indicare che la reazione non implica, almeno nelle condizioni utilizzate, l'intervento di specie radicaliche.

3.1.2 Reazioni con derivati dell'acido maleico e fumarico

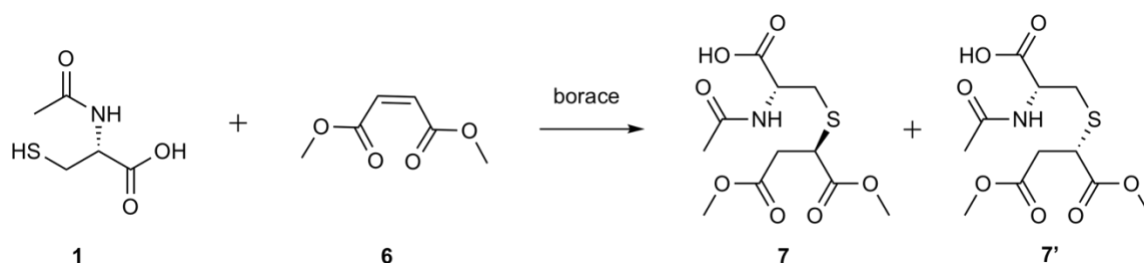
I derivati ciclici dell'acido maleico ed in particolare la maleimide sono riconosciuti come ottimi accettori per reazioni di Michael [19]. Dato che nella letteratura brevettuale relativa a trattamenti ristrutturanti per capelli sono stati indicati composti aventi una terminazione maleimidica [18], e considerando che nei capelli ci sono gruppi in grado di fungere da donatori di Michael, come gruppi β -amminici della lisina o anche tiolici della cisteina (presente specialmente in fibre deteriorate), abbiamo voluto provare la reazione tra **1** e maleimide **4** (Schema 3.4).



Schema 3.4: Reazione tra *N*-acetil-*L*-cisteina (**1**) e maleimide (**4**)

La reazione è stata condotta in metanolo, a temperatura ambiente e dopo 4 h la soluzione è stata concentrata e il residuo purificato con cromatografia su colonna di gel di silice; è stato così ottenuta la miscela di diastereoisomeri **5** e **5'** con resa del 30%.

La reazione con maleimmide è stata testata anche sul glutatione, un tripeptide costituito da tre amminoacidi legati in quest'ordine: acido glutammico, cisteina e glicina. La reazione è stata condotta come nel caso precedente ed ha dato indicazioni della formazione del prodotto di addizione, ma purtroppo in tracce e non è stato possibile ottenerlo in forma pura. Inoltre, poiché nella composizione di un prodotto commerciale (Olaplex[®]) per il trattamento ricostruttore del capello è presente anche il dimetilmaleato, abbiamo voluto provare la reazione con il composto **1** (Schema 3.5).



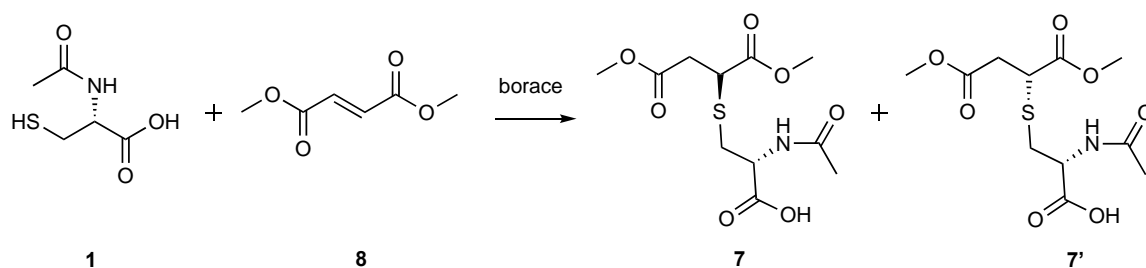
Schema 3.5: Reazione tra *N*-acetil-*L*-cisteina (**1**) e dimetilmaleato (**6**)

La reazione è stata condotta in CH₃OH/H₂O 1:1 (v/v) a temperatura ambiente, ma dopo 12 h l'analisi TLC del grezzo non ha dato indicazione di elevata conversione. Si è comunque proceduto a lavorare il grezzo di reazione ma, dopo cromatografia su colonna, è stata ottenuta una frazione contenente tracce di prodotto di addizione e notevoli quantità del reagente **1**.

Per aumentare la resa di reazione è stata quindi introdotta una variante, conducendo la reazione in presenza di borace [25], un metodo già descritto in letteratura nel caso di reazioni con dimetil fumarato.

In tal modo, dopo trattamento del grezzo di reazione nel modo consueto, i prodotti di addizione **7** e **7'** sono stati ottenuti in miscela ed i loro dati spettroscopici sono risultati in accordo con quelli riportati in letteratura [26]; la miscela è quindi stata utilizzata per prove su ciocche di capelli da analizzare mediante microscopia a scansione elettronica (SEM) e spettroscopia IR/Raman per confrontarle con ciocche trattate con Olaplex[®].

La reazione è stata provata anche tra **1** e dimetil fumarato **8**, sempre in presenza di borace (Schema 3.6).



Schema 3.6: Reazione tra *N*-acetil-*L*-cisteina (**1**) e dimetilfumarato (**8**)

Anche in tal caso è stata ottenuta, dopo purificazione cromatografica, la miscela di prodotti di addizione **7** e **7'** con resa 10% e con un rapporto relativo percentuale fra i due isomeri di 52:48, verosimilmente dovuto ad arricchimento preferenziale durante la separazione cromatografica [26]. È riportato che la reazione produce i due diastereoisomeri in rapporto equimolare e questo ha permesso di poterne attribuire i segnali NMR pur senza poterli distinguere dal punto di vista stereochimico.

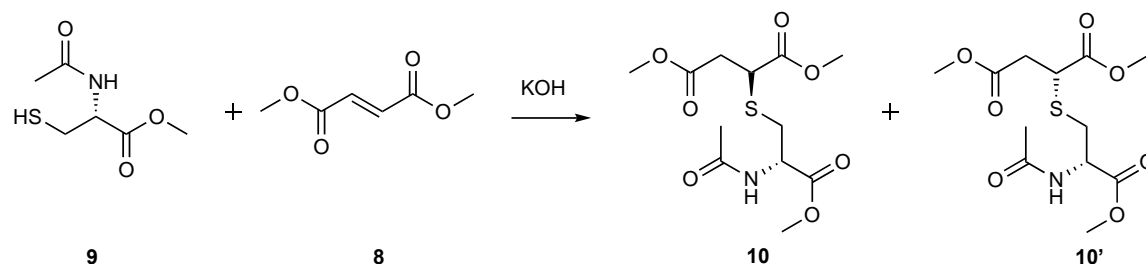
Una volta isolata la miscela di prodotti di addizione, abbiamo voluto tentare la stessa reazione usando condizioni più simili a quelle del trattamento del capello, che va difatti trattato con soluzioni basiche per favorire l'apertura delle squame.

Il composto **1** è stato trattato con una quantità equimolare di KOH in soluzione metanolica, quindi con il reagente **8** (Schema 3.7).

3. Risultati e discussione

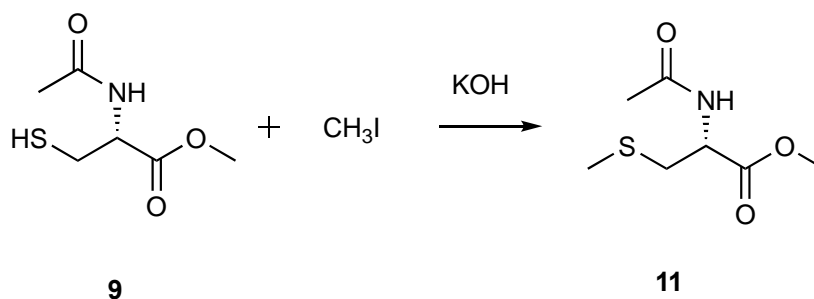
In tal caso sono state incontrate difficoltà nell'isolamento del prodotto, probabilmente a causa della formazione di sali durante il "work-up" che hanno portato ad un recupero in quantità minima del prodotto.

Per ovviare a questo inconveniente siamo passati all'uso dell'estere metilico dell'*N*-acetil-*L*-cisteina **9**.



Schema 3.7: Reazione tra *N*-acetil-*L*-cisteina metilestere (**10**) e dimetil fumarato (**8**)

Il reagente **9** è stato trattato con una quantità equimolare di KOH e, per essere certi della formazione del corrispondente tiolato, abbiamo prelevato un'aliquota della soluzione e a questa abbiamo addizionato un eccesso di ioduro di metile (Schema 3.8). Dopo concentrazione della soluzione è stato eseguito uno spettro ^1H NMR del grezzo che ha indicato scomparsa dei segnali di **9** e comparsa di quelli relativi al derivato metioninico **11**, in accordo con i dati riportati in letteratura [27].



Schema 3.8: Reazione di metilazione dell'estere metilico di *N*-acetil-*L*-cisteina (**9**)

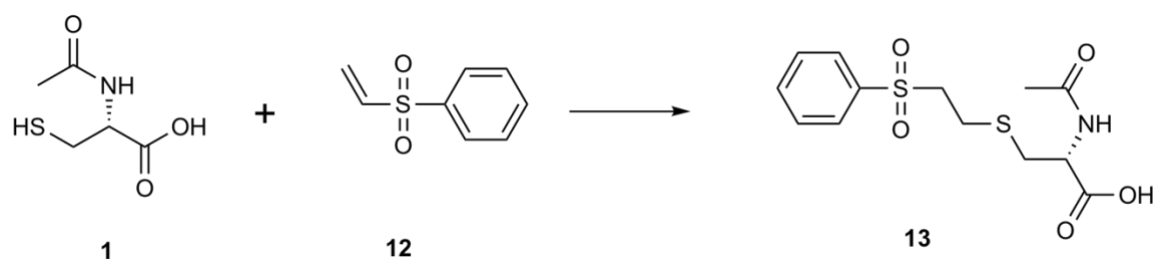
Il resto della soluzione è stato trattato con dimetil fumarato e, dopo usuale "work-up", è stata isolata una miscela di **10** e **10'**; analogo risultato è stato ottenuto con il dietil fumarato. Concludendo, si può affermare che substrati quali derivati dell'acido maleico e fumarico reagiscono in condizioni relativamente blande e perciò sono compatibili con quelle usate nella ristrutturazione del capello. È plausibile che prodotti commerciali contenenti alcuni di questi reagenti o gruppi possano agire attraverso reazione di Michael con residui amminoacidici del capello. Tali residui possono essere identificati con quelli cisteinici, qualora il capello abbia subito trattamento che produce tali residui, ma non possiamo escludere anche le analoghe reazioni con residui amminici quali, ad esempio, quelli della lisina [28].

3.1.3 Reazione con fenilvinilsolfone

In letteratura [19] è stata riportata la seguente scala di reattività dei gruppi vinilici nella reazione di sulfa-Michael:

maleimide > vinilsolfone > fumarati > maleati > acrilati/acrilammidi > acrilonitrili > crotonati > cinnamati > metacrilati/metacrilammidi.

Abbiamo quindi voluto provare la reazione di **1** e fenilvinilsolfone **12** come mostra lo schema 3.9:



Schema 3.9: Reazione tra *N*- acetilcisteina (**1**) e fenilvinilsolfone (**12**)

La reazione ha dato il prodotto di addizione in buone rese e in tempi brevi, mostrando un suo potenziale applicativo; a tal proposito occorre segnalare che in un brevetto relativo al trattamento dei capelli [17] è stato riportato anche un derivato vinilsolfonico, ma diverso da quello qui preso in esame.

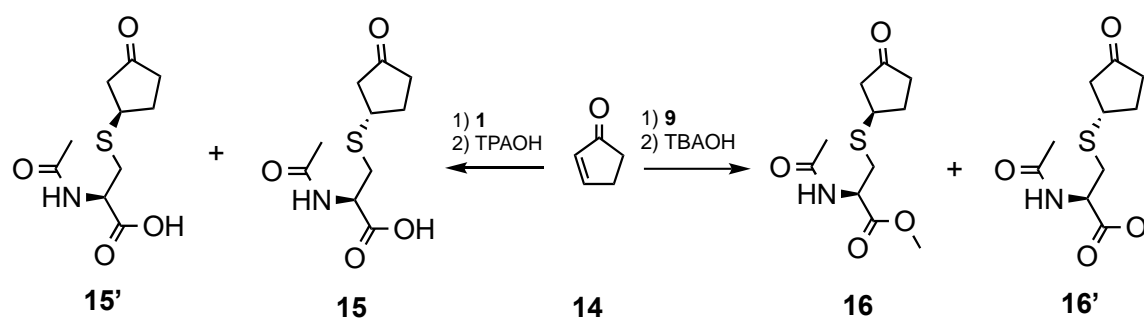
Tenendo in considerazione la scala di reattività di cui sopra, non si è ritenuto opportuno effettuare reazioni con derivati acrilici, inadatti al trattamento qui preso in considerazione a causa della loro tossicità. Sono state quindi prese in considerazione reazioni, descritte di seguito, con accettori di Michael meno attivati.

3.1.4 Reazioni con chetoni ed esteri α - β insaturi

La reazione di addizione è stata infine provata anche con accettori di Michael meno attivati rispetto ad alcuni di quelli utilizzati nei casi descritti in precedenza. In particolare sono stati impiegati 2-ciclopenten-1-one e 4-fenil-3-buten-2-one come chetoni, cinnamato di metile e shikimato di metile come composti esterei α , β -insaturi.

La reazione con 2-ciclopenten-1-one (**14**) è stata provata sia con *N*-acetil-*L*-cisteina, che con il corrispondente estere metilico **9**.

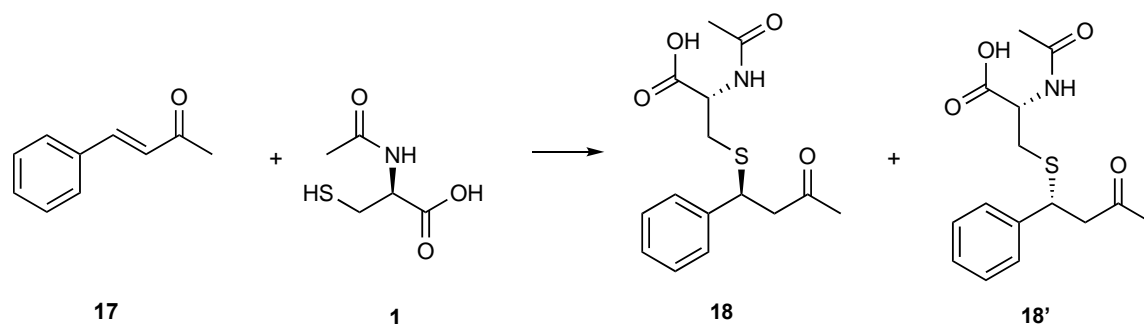
3. Risultati e discussione



Schema 3.10: Reazione tra ciclopentenone e **1** e tra ciclopentenone e **10**. TPAOH = tetrapropilammonio idrossido (1M in metanolo); TBAOH = tetrabutilammonio idrossido (10% wt in acqua).

La reazione ha dato, in entrambi i casi, evidenza di formazione del prodotto di addizione quando è stata condotta in etanolo ed in presenza 1 mol% di idrossido di sali di ammonio quaternario (Schema 3.10), secondo un procedimento descritto in letteratura per la reazione tra ciclopentenone e derivati tiolici [29].

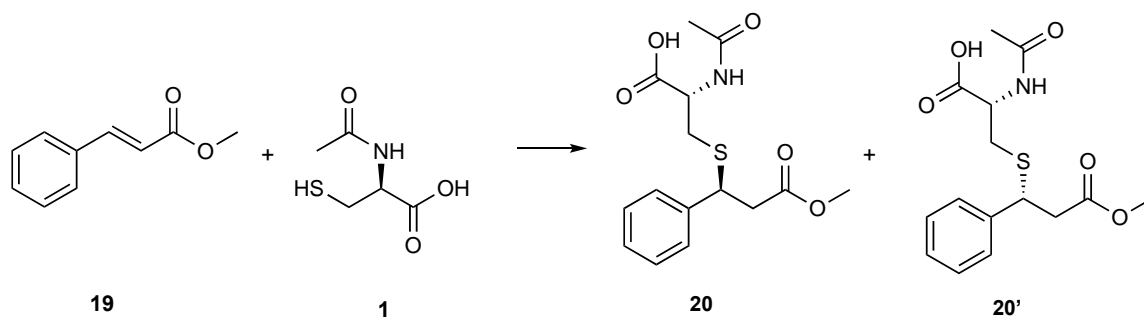
La reazione con 4-fenil-3-buten-2-one (**17**), condotta in CH₃OH/H₂O a temperatura ambiente (Schema 3.11) per 24 h ha dato conversione molto modesta nella miscela diastereoisomerica di prodotti **18** e **18'** isolati in miscela con il derivato cisteinico di partenza.



Schema 3.11: Reazione fra 4-fenil-3-buten-2-one (**17**) ed *N*-acetil-*L*-cisteina (**1**).

Siamo passati poi a testare le reazioni con esteri α - β insaturi.

La reazione tra **1** e cinnamato di metile (**19**) ha portato, dopo 12 h a 40°C in miscela solvente H₂O/CH₃OH (1:5 v/v), alla formazione del prodotto di addizione; il grezzo di reazione è stato sottoposto a cromatografia su gel di silice che ha dato il prodotto come miscela di diastereoisomeri **20** e **20'** con tracce di *N*-acetil-*L*-cisteina.

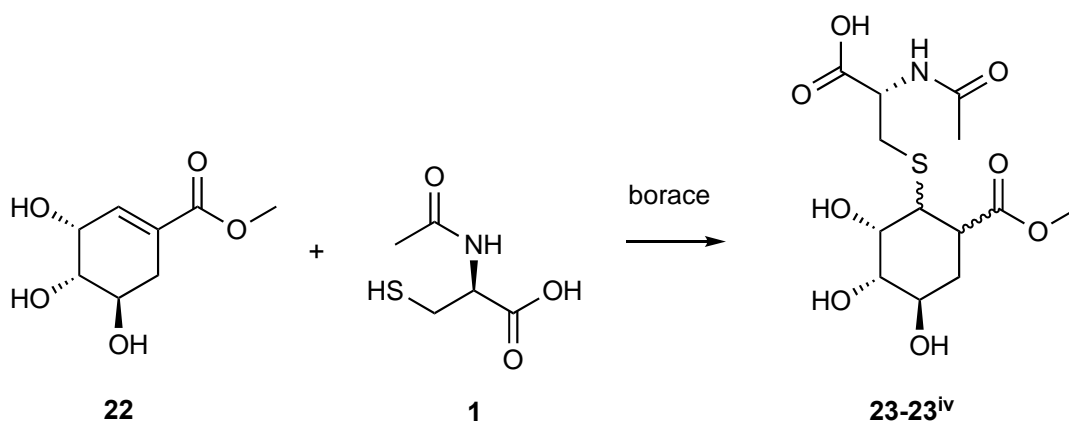


Schema 3.12. Reazione fra cinnamato di metile (19) ed *N*-acetil-*L*-cisteina

Siamo infine passati ad impiegare come accettore di Michael l'acido shikimico (**21**), che è presente in una formulazione commerciale per la ristrutturazione del capello.

La reazione tra acido shikimico e **1** è stata condotta in acqua, in presenza di borace e, dopo 5 h, è stata acidificata; il grezzo di reazione è stato quindi sottoposto a TLC preparativa. L'analisi ^1H NMR delle frazioni ottenute ha evidenziato la presenza, in tracce, di prodotti non identificati in miscela con i reagenti.

Si è deciso quindi di effettuare la reazione con lo shikimato di metile (**22**). Quest'ultimo è stato ottenuto per metilazione di acido shikimico con BF_3 in CH_3OH a 70°C per 2 h. La reazione dello shikimato di metile (**22**) con **1** (Schema 3.13) è stata effettuata prima in tubo per spettroscopia NMR in CD_3OD ma, dopo 2 h, non avendo osservata nessuna conversione dei reagenti, è stato addizionato borace in quantità semimolare rispetto ai reagenti.

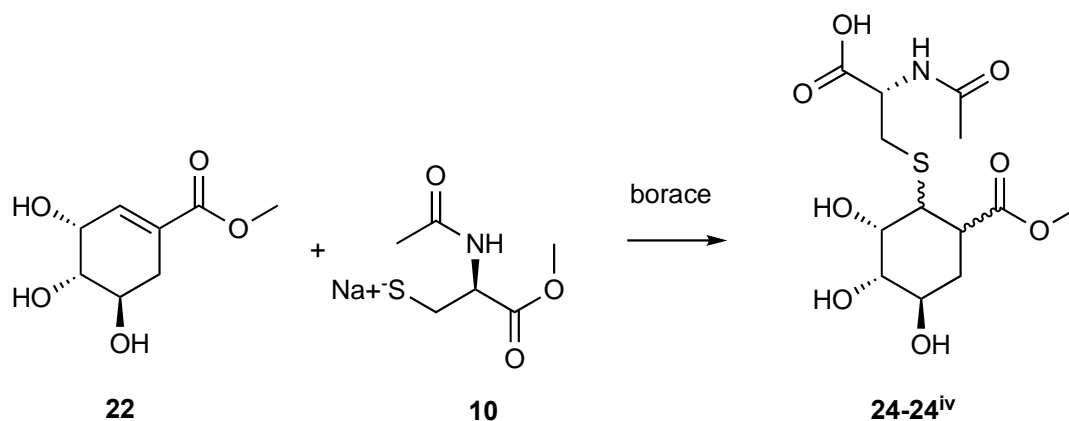


Schema 3.13 Reazione fra shikimato di metile (22) ed *N*-acetil-*L*-cisteina

Questo ha prodotto formazione di nuovi segnali riconducibili a prodotti di addizione; quindi la reazione è stata condotta in un pallone diverse volte ottenendo, dopo

cromatografia, una frazione il cui spettro ^1H NMR mostra numerosi segnali dovuti alla formazione di una miscela di diastereoisomeri oltre a tracce di reagenti.

Infine, **9** è stato trattato con metilato di sodio per ottenere il tiolato e questo è stato fatto reagire con lo shikimato di metile (**22**) per dare il corrispondente prodotto di addizione come miscela di diastereoisomeri **24–24^{iv}** (Schema 3.14).



Schema 3.14. Reazione fra shikimato di metile (**22**) ed estere metilico della *N*-acetil-*L*-cisteina salificata come tiolato

Anche in questo caso il grezzo di reazione, analizzato attraverso spettroscopia ^1H NMR, ha dato indicazioni della formazione del prodotto di addizione, pur con presenza di notevoli quantità di reagenti.

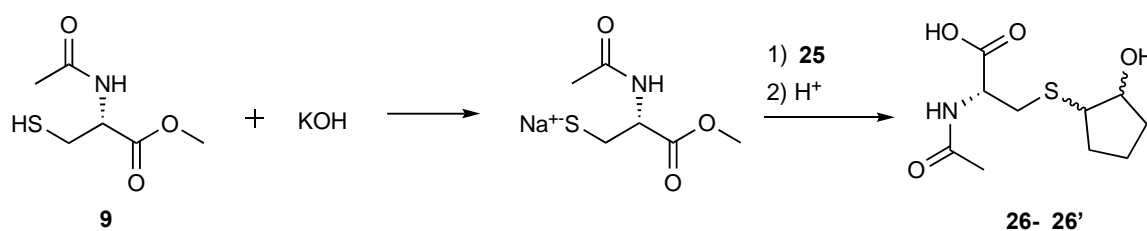
3.1.5 Reazione con ossido di ciclopentene

Un ultimo substrato di cui abbiamo voluto provare la reattività con *N*-acetil-*L*-cisteina è stato l'ossido di ciclopentene. Questa reazione, pur non essendo una reazione di sulfa-Michael bensì una addizione di apertura d'anello per opera di un nucleofilo, è stata trovata anche nella letteratura brevettuale per il trattamento ricostruttore del capello, in particolare sono stati indicati composti aventi una catena alifatica con le due terminazioni epossidiche [18].

La reazione tra **1** e ossido di ciclopentene (**25**) non ha dato, nelle condizioni usuali (in metanolo, a temperatura ambiente) una apprezzabile conversione dei reagenti; a questo punto è stata ripetuta, utilizzando questa volta *N*-acetil-*L*-cisteina metilestere (**9**) trattato con quantità equimolare di idrossido di potassio in modo da ottenere il corrispondente tiolato.

La reazione, analizzata dopo 5 h a temperatura ambiente, ha indicato completa conversione del reagente e, dopo acidificazione, estrazione, concentrazione e cromatografia, ha dato

una frazione il cui spettro ^1H NMR è compatibile con quello dei prodotti di apertura d'anello (**26** e **26'**).



Schema 3.15: Reazione tra *N*-acetil-*L*-cisteina metil estere salificata come tiolato e ossido di ciclopentene (**25**)

Questi primi risultati, se pur preliminari, hanno dato indicazioni per un possibile approfondimento ed estensione dell'indagine a reazioni diverse da quella di addizione 1,4 su composti carbonilici -insaturi implicanti derivati della cisteina o altri derivati amminoacidici che possano fungere da modelli per siti nucleofili nella cheratina.

3.2 Prove pratiche su ciocche

Allo scopo di valutare le modificazioni che hanno luogo sulla fibra sia a seguito di un trattamento decolorante o riducente che a seguito di un trattamento ricostruttore, sono stati analizzati diversi campioni di capello umano attraverso spettroscopia ATR-FT-IR e Raman e mediante microscopio elettronico a scansione (SEM).

Si è deciso di partire da un campione “controllo” decolorato precedentemente e quindi di trattare una fibra già ampiamente deteriorata, in maniera tale da rendere il successivo trattamento ricostruttore più evidente sia a livello di legami chimici riformati, determinabili attraverso spettroscopia ATR-FT-IR e Raman, sia a livello morfologico utilizzando il microscopio a scansione elettronica.

Il campione di partenza, in questo lavoro nominato “ciocca controllo”, è una ciocca di 10 g precedentemente decolorata per tre volte consecutive con una miscela di due prodotti commerciali: Lunex Ultra Cream[®], che è il nome commerciale della crema a base di sali solfonati e UniColor Oxi[®] che è il nome commerciale della soluzione ossidante a 40 volumi a base di acqua ossigenata.

Dalla “ciocca controllo” ne sono state ricavate numerose, suddivise in lotti da 5 ciocche, ciascuna da 0,35 g.

Ogni lotto è stato trattato diversamente sia a seconda sia del tempo di applicazione del prodotto che in base al tipo di trattamento effettuato, come illustra la tabella 3.1:

	<u>Decolorazione:</u>		<u>Riduzione:</u>	Tempi di applicazione
	Lunex Ultra Cream	UniColor Oxi		
<i><u>Lotto 1</u></i>	x	x		45
<i><u>Lotto 2</u></i>	x	x		15
<i><u>Lotto 3</u></i>				
<i><u>Lotto 4</u></i>			x	5
<i><u>Lotto 5</u></i>	x			15

Tabella 2: Descrizione dei trattamenti effettuati nei diversi lotti

Il lotto 1 ed il lotto 2 sono stati trattati attraverso gli stessi processi di decolorazione, ma con tempi diversi di applicazione della miscela decolorante.

Il lotto 3 non ha subito ulteriori decolorazioni oltre ai tre trattamenti consecutivi di decolorazione relativi alla ciocca “controllo”.

Con l’intento di imitare le condizioni di stiratura del capello, il lotto 4 è stato trattato prima con una soluzione di KOH a pH \approx 9 per 5 minuti per permettere il rigonfiamento della fibra

e, poi con una soluzione riducente di NaHSO_3 per altrettanti 5 minuti per provocare la rottura dei ponti disolfuro presenti nel capello.

Il lotto 5 è stato trattato soltanto con il prodotto commerciale a base di sali solfonati (Lunex Ultra Cream[®]) per evitare che la miscela ossidante generasse prodotti indesiderati, come acido cisteico, sulla fibra capillare.

Dopo aver effettuato i suddetti trattamenti ai cinque lotti, ogni ciocca di ciascun lotto è stata trattata con un diverso prodotto ricostruttore:

	<u>Trattamento di ricostruzione</u>
<i>Ciocca X.1</i>	non trattato (bianco)
<i>Ciocca X.2</i>	juglone 5% mol/mol in CH_3OH
<i>Ciocca X.3</i>	acido shikimico 5% mol/mol in CH_3OH
<i>Ciocca X.4</i>	Olaplex
<i>Ciocca X.5</i>	Lunex Restore
<i>Ciocca X.6</i>	dimetilmaleato 5% mol/mol in CH_3OH

Tabella 3: Descrizione dei trattamenti di ricostruzione effettuati su ogni ciocca

Dove X sta ad indicare il lotto a cui appartiene il singolo campione.

Per il lotto 5 non è possibile fare riferimento a questa tabella poiché in questo caso sono state trattate soltanto due ciocche oltre alla ciocca di riferimento (campione 5.1): una ciocca (campione 5.2) è stata trattata con la soluzione di juglone in CH_3OH , dato che le analisi effettuate sui lotti precedenti hanno mostrato un'alta reattività di questa molecola con il capello. La seconda ciocca (campione 5.3) è stata trattata con dimetilmaleato 5% mol/mol, per investigare sul funzionamento del prodotto commerciale Olaplex[®] che contiene questa molecola come ingrediente attivo.

3.2.1 *Analisi IR/RAMAN su modelli e su fibre*

Spettri Raman e IR dei capelli decolorati

La Figura 3.1 mostra gli spettri Raman dei capelli della ciocca “controllo” e dopo un'ulteriore decolorazione di 15 minuti (campione 2.1).

Entrambi gli spettri sono in accordo con i risultati Raman riportati in letteratura su capelli sbiancati e bianchi [43]. Le bande Amide I e Amide III, osservate rispettivamente a 1656 e 1275 cm^{-1} , sono caratteristiche della struttura α -elica [42], a questa conformazione va

3. Risultati e discussione

assegnata anche la banda prominente a 935 cm^{-1} (stretching C-C dello scheletro [38][47]). La componente Amide III a 1251 cm^{-1} è invece attribuibile alla conformazione disordinata, mentre la spalla a circa 1670 cm^{-1} nella regione Amide I è assegnabile alle conformazioni disordinata e/o β -foglietto. L'individuazione di queste diverse conformazioni di struttura secondaria non è inattesa; infatti, è ben noto che le microfibrille della corteccia hanno struttura prevalente ad α -elica, mentre nella cuticola, ossia nello strato più esterno della fibra (a distanze dalla superficie della fibra comprese tra 1 e $3\text{ }\mu\text{m}$ [30],[45]), le conformazioni prevalenti sono quelle a β -foglietto e disordinata [31][32]. I nostri spettri Raman sono in accordo con quelli registrati da Kuzuhara e Hori nella regione corticale dei capelli bianchi (a distanze dalla superficie della fibra comprese tra 3 e $30\text{ }\mu\text{m}$) [30],[33]; in effetti, i nostri spettri sono prevalentemente rappresentativi del bulk del campione e non è quindi sorprendente che la conformazione prevalente appaia essere quella ad α -elica.

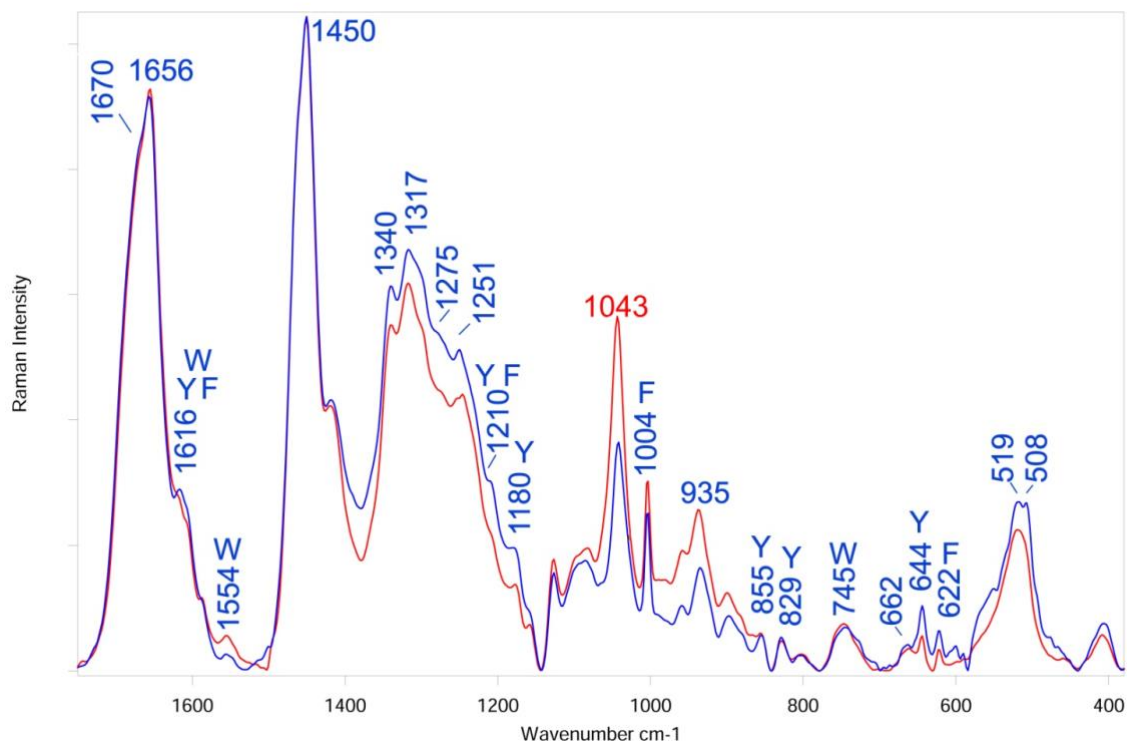


Figura 3.1: Spettri Raman dei capelli decolorati tre volte (ciocca “controllo”, spettro blu) e dopo un'ulteriore decolorazione (campione 2.1, spettro rosso). Le bande assegnabili a specifici amminoacidi sono indicate: F = fenilalanina; Y = tirosina; W = triptofano. Gli spettri sono normalizzati sulla banda a 1450 cm^{-1} (bending CH_2).

La banda larga attorno a 500 cm^{-1} (Figura 3.1) è attribuibile al modo di stiramento dei ponti disolfuro ($\nu\text{S-S}$) [42]. Come riportato in Tabella 4, il sistema $\text{C}_\alpha\text{-C}_\beta\text{-S-S-C}_\beta\text{-C}_\alpha$ può assumere conformazioni diverse, distinguibili mediante spettroscopia Raman. La

conformazione a energia potenziale più bassa (e prevalente nelle cheratine naturali) è quella gauche-gauche-gauche, identificabile attraverso una banda Raman a circa 505 cm^{-1} (Tabella 4).

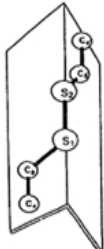
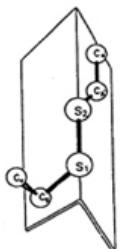
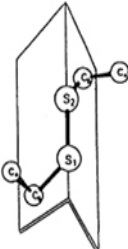
Posizione della banda Raman $\nu\text{S-S}$ (cm^{-1})	Conformazione del sistema $\text{C}_\alpha\text{-C}_\beta\text{-S-S-C}_\beta\text{-C}_\alpha$
540	<div style="text-align: center;">C_α</div>  <div style="text-align: center;"><i>trans-gauche-trans</i></div>
520	 <div style="text-align: center;"><i>gauche-gauche-trans</i></div>
505	 <div style="text-align: center;"><i>gauche-gauche-gauche</i></div>
493	tesa

Tabella 4.: Possibili conformazioni del sistema $\text{C}_\alpha\text{-C}_\beta\text{-S-S-C}_\beta\text{-C}_\alpha$ e relativa posizione della banda $\nu\text{S-S}$ (cm^{-1})[42].

Come si può vedere in Figura 3.1, nei capelli della ciocca “controllo” questa banda è presente insieme a una componente leggermente più debole a 519 cm^{-1} , assegnabile alla conformazione gauche-gauche-trans (Tabella 4). Quest’ultima banda diventa quella

prominente dopo un'ulteriore decolorazione, quindi nel campione 2.1, a indicare che in questo campione la conformazione gauche-gauche-trans è diventata quella predominante. È ancora più interessante osservare che in seguito a questa ulteriore decolorazione, l'area della banda assegnabile ai ponti disolfuro si è ridotta, mentre è aumentata corrispondentemente di intensità la banda a 1043 cm^{-1} , assegnabile allo stretching S-O dell'acido cisteico [43]. Questi andamenti sono pienamente in accordo con i dati riportati in letteratura da Akhtar et al. [34] su capelli sbiancati con preparazioni commerciali a base di acqua ossigenata, e da Kuzuhara [33] su capelli sbiancati con persolfato e acqua ossigenata. Inoltre, come osservato da quest'ultimo autore, in seguito all'ulteriore decolorazione, non si osserva una diminuzione di intensità dello stretching dei legami C-S a 662 cm^{-1} . I nostri dati mostrano che il trattamento di decolorazione coinvolge sensibilmente anche la regione corticale del capello, di cui i nostri spettri Raman sono rappresentativi, come sopra riportato.

Il contenuto relativo in ponti disolfuro e acido cisteico è stato valutato attraverso i rapporti Raman $As-s/A1450$, $A1040/A1450$, $As-s/A1004$ e $A1040/A1004$; il loro andamento è riportato in Figura 3.2. Come si può vedere, a conferma dei risultati qualitativi sopra commentati, passando dalla ciocca "controllo" al campione 2.1, si osserva una diminuzione significativa dei rapporti $As-s/A1450$ e $As-s/A1004$, e un aumento significativo dei rapporti $A1040/A1450$ e $A1040/A1004$. È importante osservare che le variazioni percentuali dei rapporti $As-s/A1450$ versus $As-s/A1004$ e $A1040/A1450$ versus $A1040/A1004$ sono in ottimo accordo; pertanto, in questo caso, l'utilizzo delle due diverse bande come standard interno è assolutamente indifferente. Inoltre, si può anche dedurre che, in seguito a decolorazione, il contenuto in gruppi CH_2 non varia nella regione corticale dei capelli; Akhtar et al. [34] hanno riportato, a questo proposito, un andamento differente.

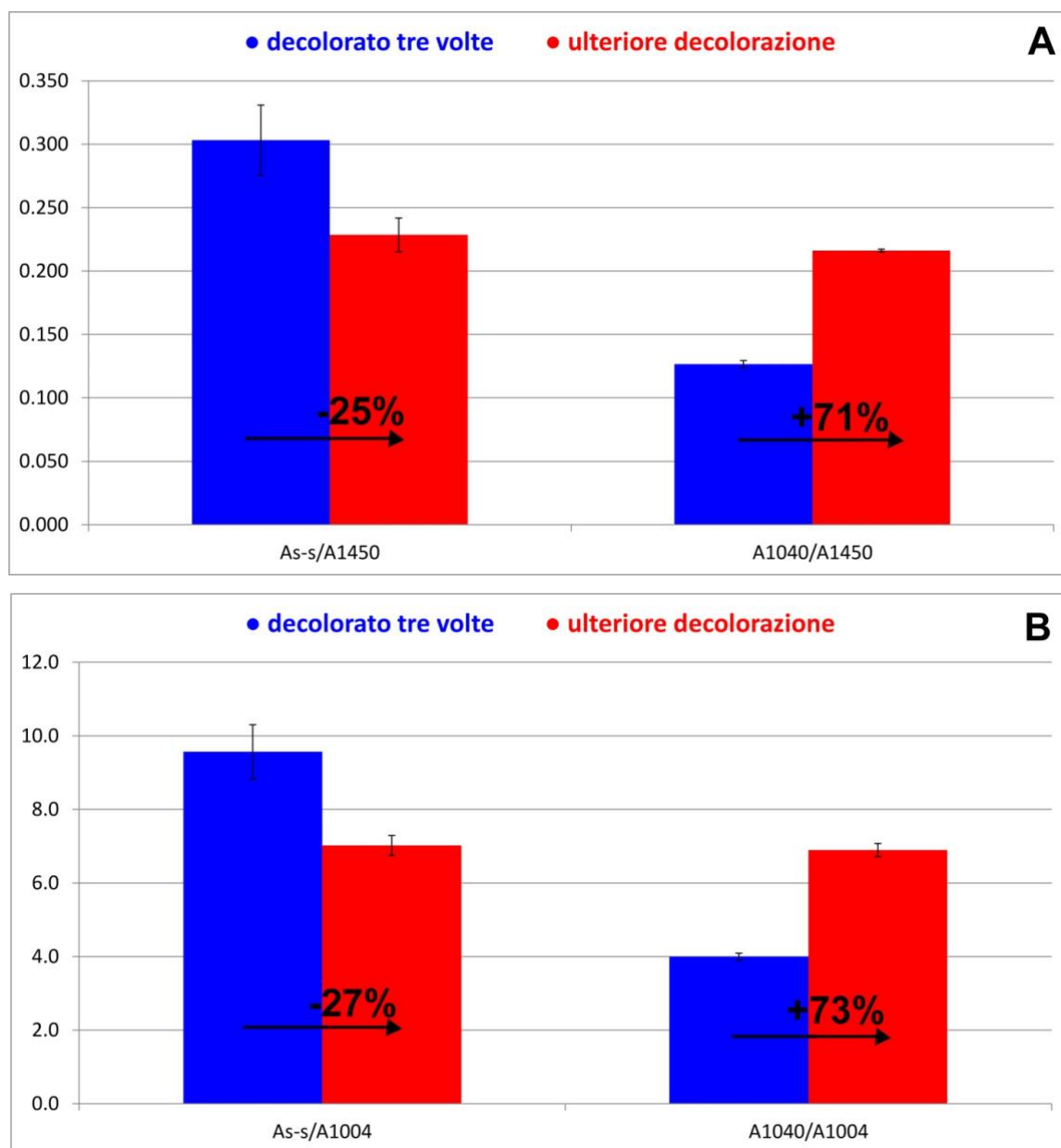


Figura 3.2: Andamento dei rapporti As-s/AI450, A1040/AI450 (A) e As-s/AI004, A1040/AI004 (B) calcolati dagli spettri Raman registrati sui capelli decolorati tre volte (ciocca “controllo”) e dopo un’ulteriore decolorazione (campione 2.1). Sono riportate le variazioni percentuali rispetto al controllo.

Sulla base dei risultati ottenuti, si può confermare quanto già riportato in letteratura: in seguito a decolorazione, i ponti disolfuro si rompono e il prodotto della loro ossidazione è l’acido cisteico [35] [36].

Gli spettri riportati in Figura 3.1 permettono di valutare anche se la decolorazione (e quindi la rottura dei ponti disolfuro e la loro ossidazione) ha determinato modificazioni conformazionali nella cheratina; in seguito alla quarta decolorazione, si possono osservare alcune lievi variazioni di intensità relativa nelle componenti Amide I e Amide III sopra citate, il che farebbe pensare a piccoli riarrangiamenti della conformazione della cheratina.

In particolare, nel range Amide III, la componente a circa 1250 cm^{-1} , assegnata alla conformazione disordinata, sembra diventare più prominente rispetto alla componente a 1275 cm^{-1} caratteristica dell' α -elica; un analogo risultato è stato riportato da Kuzuhara in seguito a decolorazione con persolfato e acqua ossigenata [43]. In accordo a questo studio, l'andamento osservato può essere spiegato considerando che alcune catene presenti nella regione corticale assumono una struttura disordinata in seguito al trattamento. Allo stesso tempo, il contenuto in α -elica non sembra modificarsi, come indicato dalla costanza del rapporto A_{935}/A_{1450} (Figura 3.3). Un risultato analogo è stato riportato da Kuzuhara e Hori in seguito a riduzione della cheratina del capello (ossia scissione dei ponti disolfuro S-S) con acido tioglicolico o cisteina [33],[30]. La struttura ad α -elica non è quindi influenzata, né dalla riduzione dei gruppi S-S (in base a quanto riportato da questi autori), né dalla loro rottura e ossidazione; del resto Fraser et al. sostengono che questi ponti non si formano nell' α -elica [36].

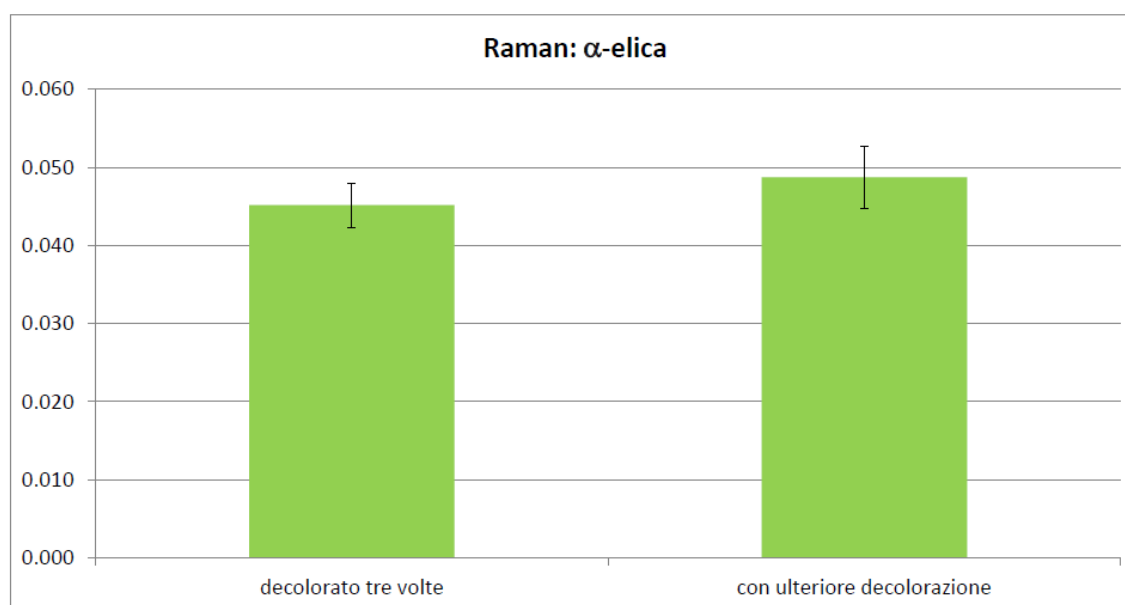


Figura 3.3: Andamento del rapporto A_{935}/A_{1450} calcolato dagli spettri Raman registrati sui capelli decolorati tre volte (ciocca "controllo") e dopo un'ulteriore decolorazione (campione 2.1).

In seguito alla quarta decolorazione, la banda a circa 1340 cm^{-1} cala di intensità relativa rispetto alla banda a 1317 cm^{-1} ; un analogo andamento è stato riportato da Akhtar et al. su capelli sbiancati con preparazioni commerciali a base di acqua ossigenata. Anche questo andamento può essere interpretato come un'alterazione della conformazione dello scheletro cheratinico in seguito alla scissione dei legami S-S.

Alcune bande Raman possono essere attribuite ad amminoacidi specifici, come indicato nella Figura 3.1. Come si può notare, alcune bande diminuiscono di intensità in seguito

all'ulteriore decolorazione. In particolare, la diminuzione di intensità delle bande della tirosina è in accordo con Akhtar et al. [40] e Kuzuhara [43]: in quest'ultimo studio, l'analisi amminoacidica ha mostrato che la decolorazione con persolfato e acqua ossigenata determina una diminuzione del contenuto di tirosina.

La Figura 3.4 riporta gli spettri ATR-IR dei capelli scuri e decolorati tre volte (ciocca "controllo");

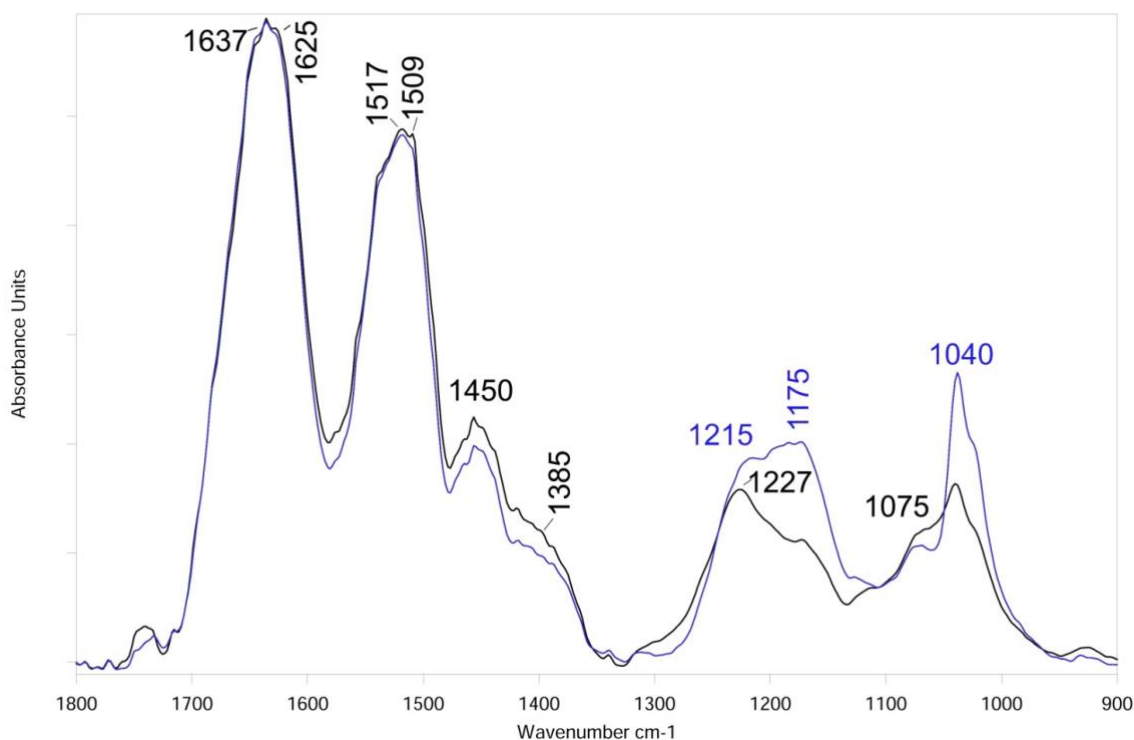


Figura 3.4: . Spettri ATR-IR dei capelli scuri (spettro nero) e decolorati tre volte (ciocca "controllo", spettro blu). Gli spettri sono normalizzati rispetto alla banda Amide I.

Per quanto riguarda i capelli scuri, non decolorati, la posizione delle bande Amide I, Amide II e Amide III (rispettivamente a 1637-1625, 1517-1509 e 1227 cm⁻¹) suggerisce che la struttura prevalente è del tipo β -foglietto/disordinata [29], in accordo ad altri studi su cheratine [32] [37]. Questo risultato (e soprattutto questo apparente disaccordo con i dati Raman) non è sorprendente se si pensa che la tecnica ATR con il cristallo in diamante permette di analizzare i primi 2 μm di spessore presenti sulla superficie del campione. Come già ricordato, nella cuticola, ossia nello strato più superficiale (di spessore fino a 3 μm , quindi quello analizzabile mediante la tecnica ATR), le conformazioni prevalenti sono quella disordinata e a β -foglietto.

3. Risultati e discussione

Alcune bande in Figura 3.4 sono attribuibili al relativamente alto contenuto di serina della cuticola: le bande a circa 1385 and 1075 cm^{-1} sono assegnabili ai modi di bending del gruppo OH [38] e di stiramento del legame CO [39].

In seguito alle tre decolorazioni, l'effetto principale nella ciocca "controllo" è il notevole incremento di intensità delle bande a circa 1175 e 1040 cm^{-1} , entrambi attribuibili all'acido cisteico [48],[40]. Nel range Amide III, il massimo della banda si sposta a 1215 cm^{-1} (con un contemporaneo aumento di intensità), probabilmente a causa del contributo di un prodotto di ossidazione; in effetti, nei range dell'Amide I e dell'Amide II non si osservano variazioni rilevanti.

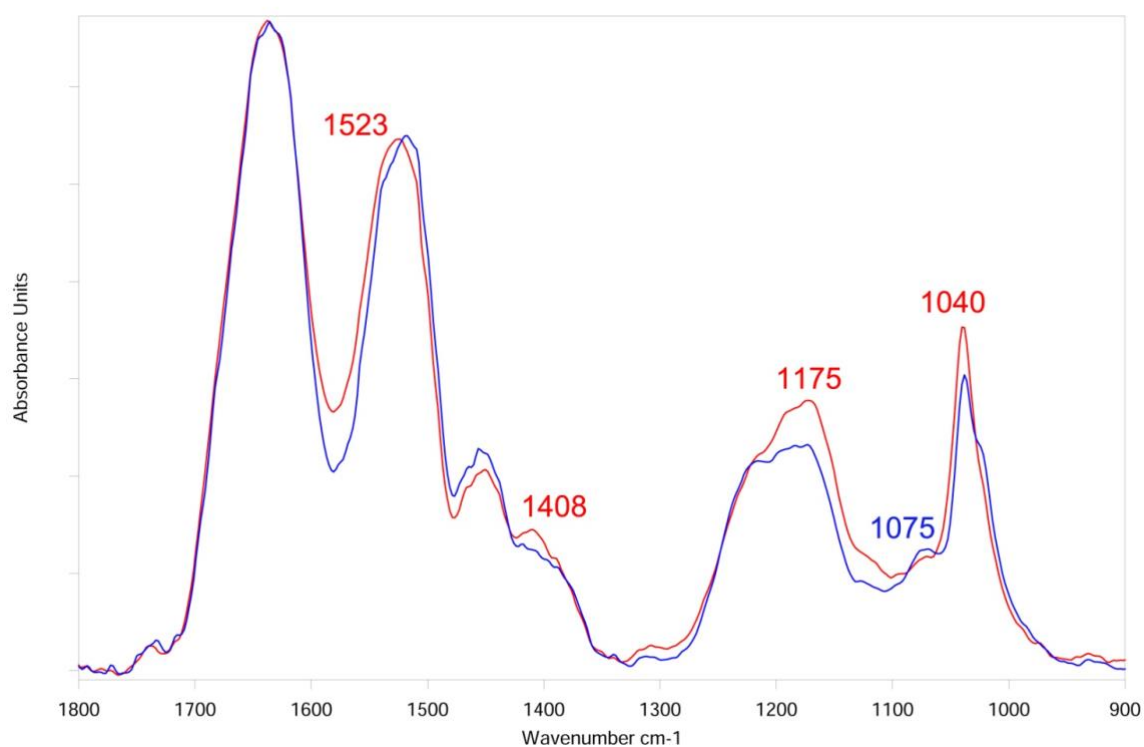


Figura 3.5: Spettri ATR-IR dei capelli scuri decolorati tre volte (ciocca "controllo", spettro blu) e dopo un'ulteriore decolorazione (campione 2.1, spettro rosso). Gli spettri sono normalizzati rispetto alla banda Amide I.

In seguito a un'ulteriore decolorazione (Figura 3.5), gli effetti sopra commentati diventano in generale più evidenti, e in particolare si osserva un'ulteriore aumento delle bande assegnate all'acido cisteico. I rapporti di intensità $I_{1040}/I_{\text{Amide I}}$, $I_{1175}/I_{\text{Amide I}}$, sono stati calcolati per valutare in modo relativo l'andamento del contenuto di acido cisteico nei vari campioni (Figura 3.6). A conferma di quanto detto qualitativamente, questi rapporti mostrano che passando dal capello scuro a alla ciocca "controllo" e al campione 2.1, il contenuto di acido cisteico aumenta progressivamente; l'aumento nettamente più considerevole si rivela passando dal capello scuro a quello decolorato tre volte (ciocca

controllo). Nel campione 2.1, l'incremento osservato in seguito alla quarta decolorazione in IR, seppure significativo, appare minore rispetto a quello osservato in Raman (Figura 3.2); questo farebbe pensare che, almeno in questa fase (ossia quando il capello ha già subito tre decolorazioni), l'effetto principale si abbia sulla regione corticale piuttosto che sulla cuticola. A questo proposito, bisogna osservare che Kuzuhara ha riportato che in seguito a decolorazione con persolfato e acqua ossigenata [43], le variazioni del contenuto di acido cisteico e ponti disolfuro sono maggiori nella cuticola che nella regione corticale. Queste differenze possono essere ascritte a differenze nel trattamento.

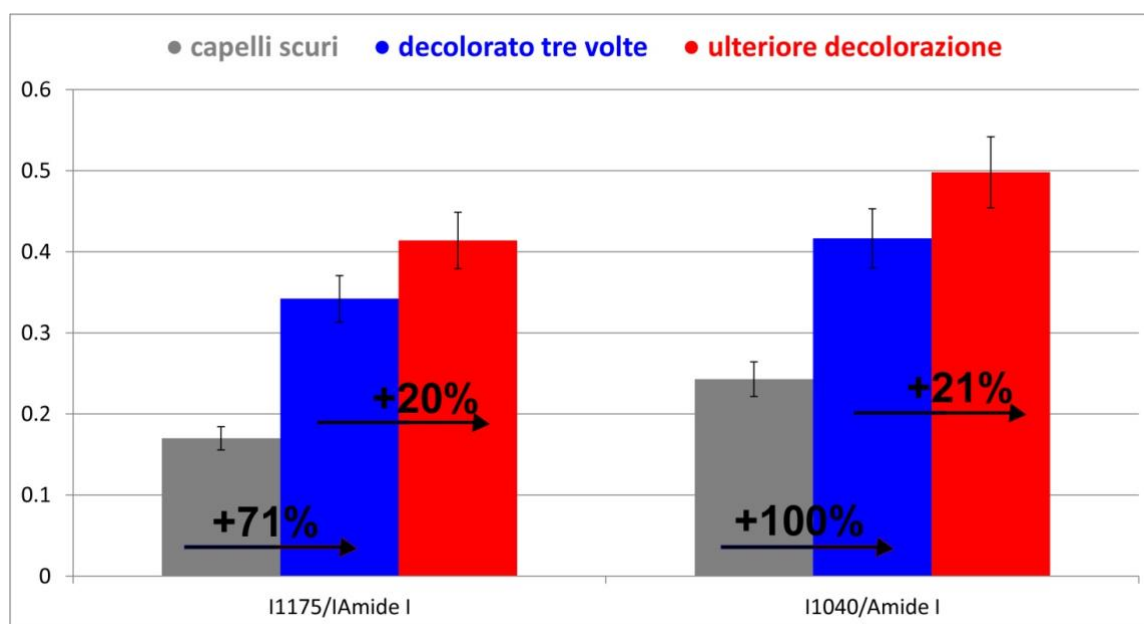


Figura 3.6: Andamento dei rapporti I1175/Amide I e I1040/Amide I calcolati dagli spettri ATR-IR registrati sui capelli scuri, decolorati tre volte (notazione che corrisponde alla ciocca "controllo") e dopo un'ulteriore decolorazione (notazione riferita al campione 2.1). Sono riportate le variazioni percentuali rispetto allo stadio precedente

Si può osservare nel campione 2.1 che in seguito all'ulteriore decolorazione, la banda Amide II si sposta a frequenza più alta e il profilo della larga banda in cui cadono i bending dei gruppi CH si modifica sensibilmente: il suo massimo cade a 1408 cm^{-1} . La banda a 1075 cm^{-1} , precedentemente assegnata alla serina, cala di intensità.

Lo studio spettroscopico vibrazionale ha quindi mostrato che i processi di decolorazione coinvolgono sia il bulk delle fibre (quindi la regione corticale) che la loro superficie (quindi la cuticola).

D'altro canto, la formazione dell'acido cisteico è una diretta conseguenza della presenza dell'acqua ossigenata; le Figure 3.7 e 3.8 mostrano rispettivamente gli spettri Raman e ATR-IR del campione 2.1, della ciocca controllo e del campione 5.1.

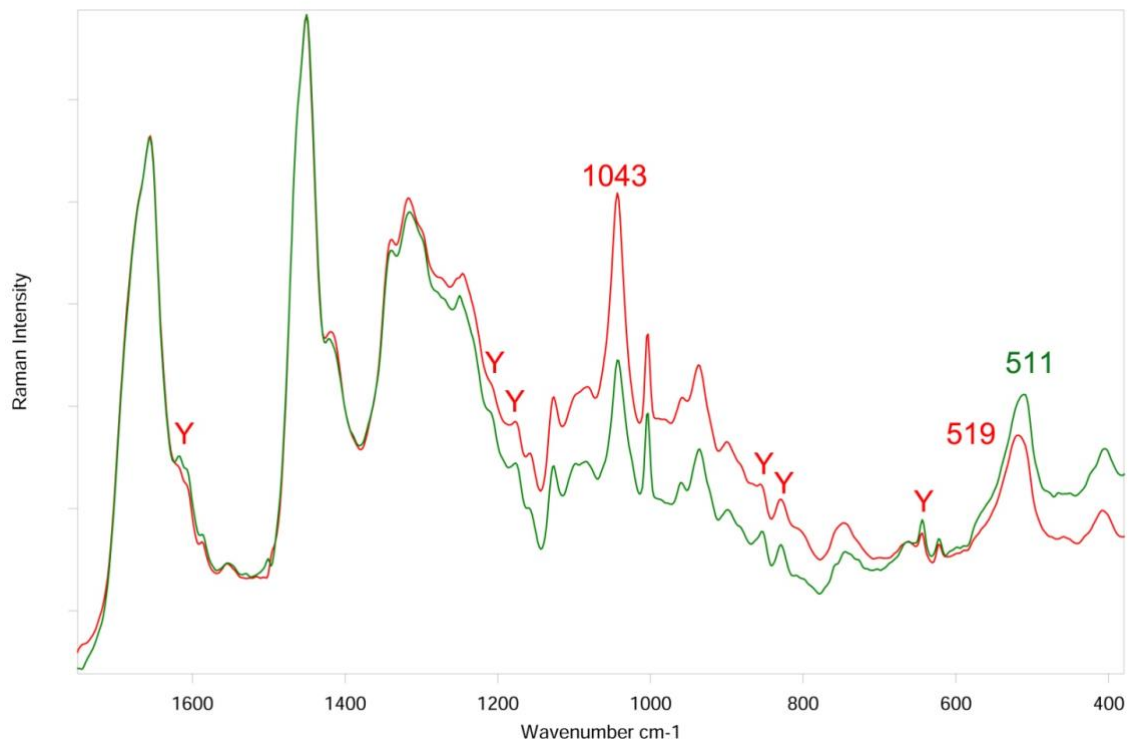


Figura 3.7: Spettri Raman del campione 2.1 (spettro rosso) e del campione 5.1 (spettro verde)

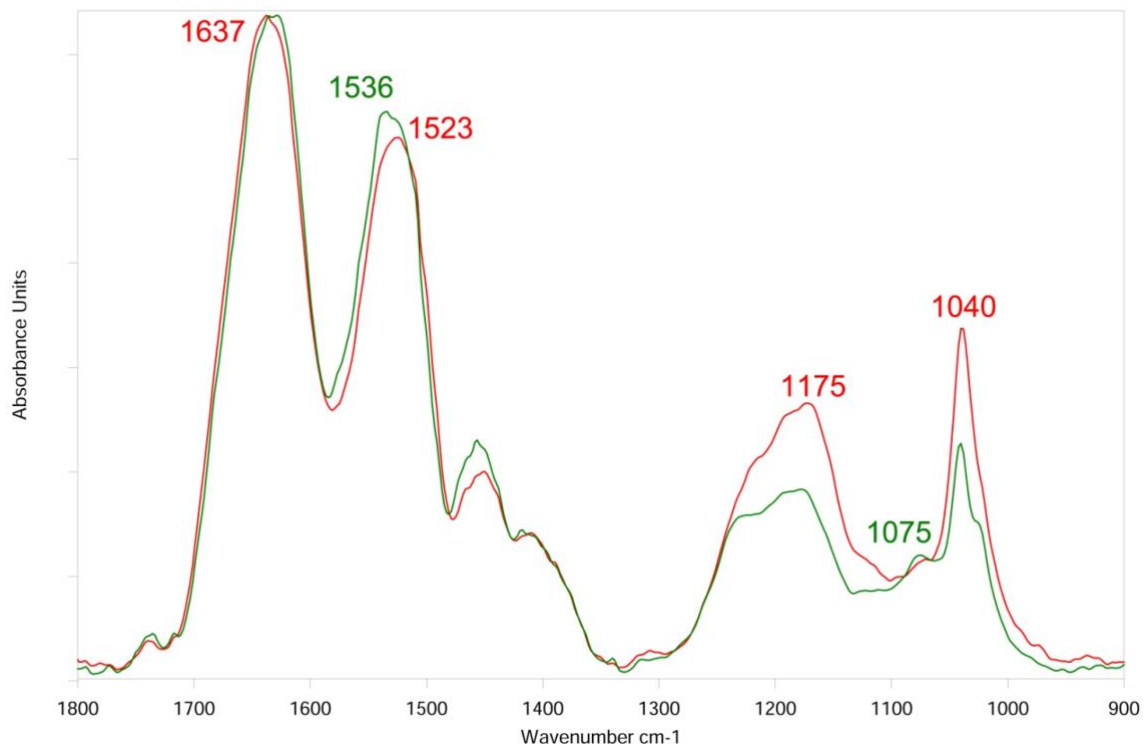


Figura 3.8: Spettri ATR-IR del campione 2.1 (spettro rosso) e del campione 5.1 (spettro verde). Gli spettri sono normalizzati rispetto alla banda Amide I.

Il confronto tra gli spettri mostra che il campione 5.1 è meno degradato dell'altro. Gli spettri Raman mostrano, per esempio, che il suo contenuto di tirosina è maggiore del quello

che ha subito la ciocca “controllo”. Il risultato sicuramente più significativo riguarda il contenuto di acido cisteico e ponti disolfuro.

I rapporti Raman As-s/A1450 e As-s/A1004 mostrano che il campione 5.1 ha un più alto contenuto di ponti disolfuro del 2.1 (Figura 9); i rapporti Raman A1040/A1450 e A1040/A1004 (Figura 3.9) e i rapporti IR I1175/Iamide I e I1040/Iamide I (Figura 3.10) mostrano invece che il primo ha un più basso contenuto di acido cisteico. E' interessante osservare che la banda dello stretching SH a circa 2570 cm^{-1} non è stata osservata né in Raman né in IR; quindi, anche in queste condizioni meno ossidanti, i residui di cisteina ridotti non sono stati rivelati.

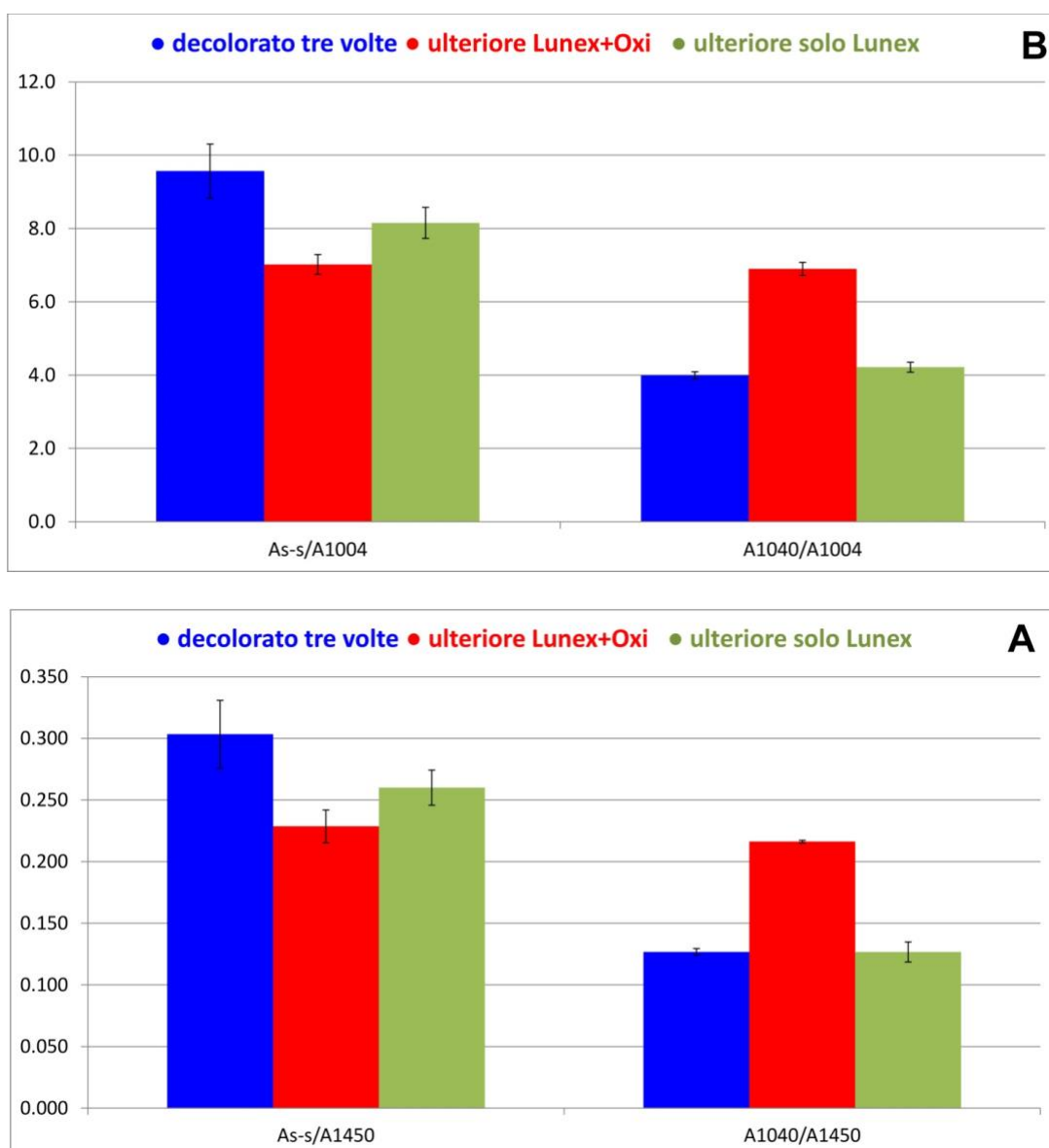


Figura 3.9: Figura 9. Andamento dei rapporti Raman As-s/A1450, A1040/A1450 (A), As-s/A1004 e A1040/A1004 (B) calcolati dagli spettri del campione 2.1 (ulteriore Lunex+Oxi) e del campione 5.1 (Ulteriore solo lunex). I valori relativi al campione decolorato tre volte (ciocca “controllo”) sono riportati per confronto.

3. Risultati e discussione

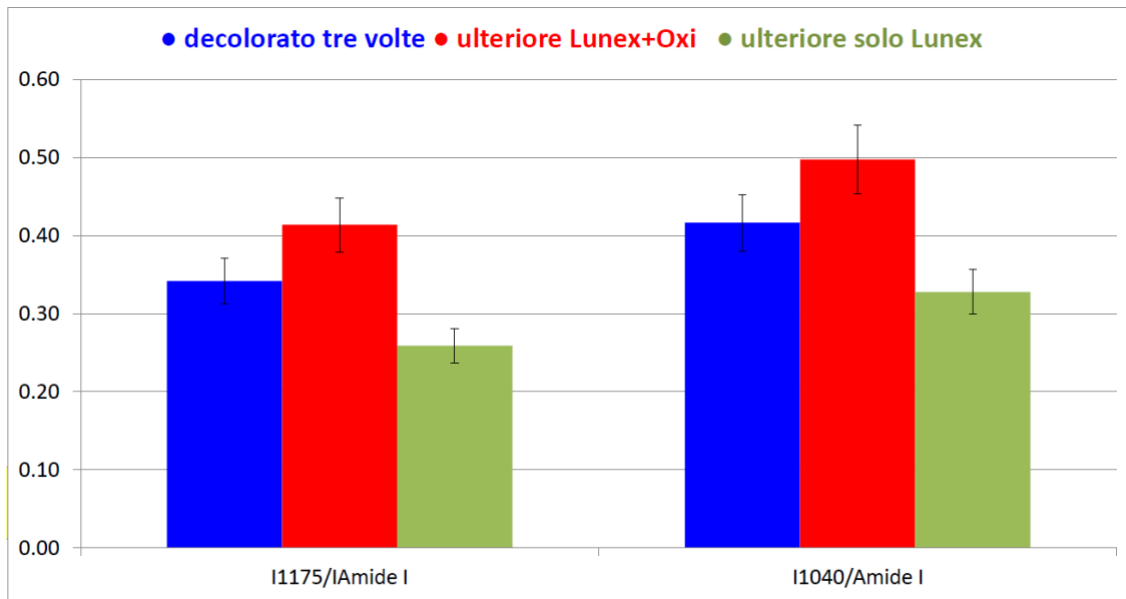


Figura 3.10: Andamento dei rapporti IR 11175/Amide I e 11040/Amide I calcolati dagli spettri del campione che ha subito le quattro decolorazioni e campione 5.1 . I valori relativi al campione decolorato tre volte sono riportati per confronto.

Trattamenti con ristrutturanti

Le Figure 3.11-3.14 mostrano gli spettri Raman del 2.1 prima e dopo trattamento con Lunex Restore® (campione 2.5), Olaplex® (campione 2.4), acido shikimico (campione 2.3) e dimetilmaleato (campione 2.6) .

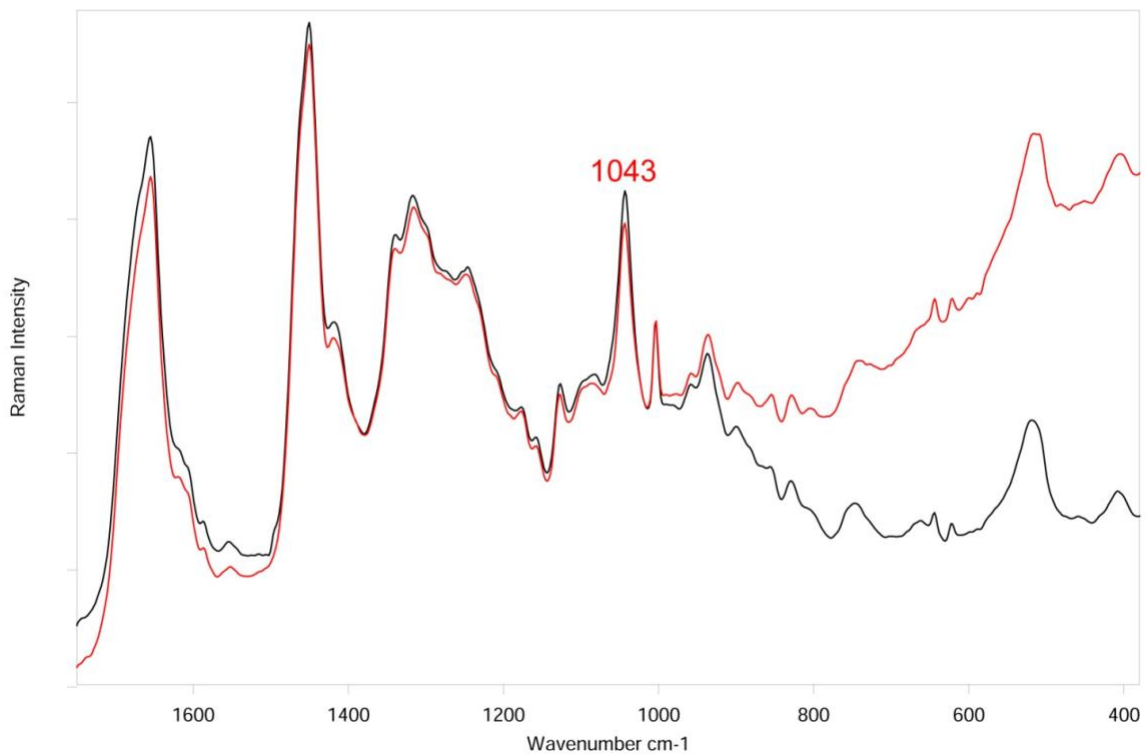


Figura 3.11: Spettri Raman del campione 2.1 prima (spettro nero) e dopo trattamento con Lunex Restore (campione 2.5, spettro rosso). Gli spettri sono normalizzati rispetto alla banda a 1450 cm^{-1} .

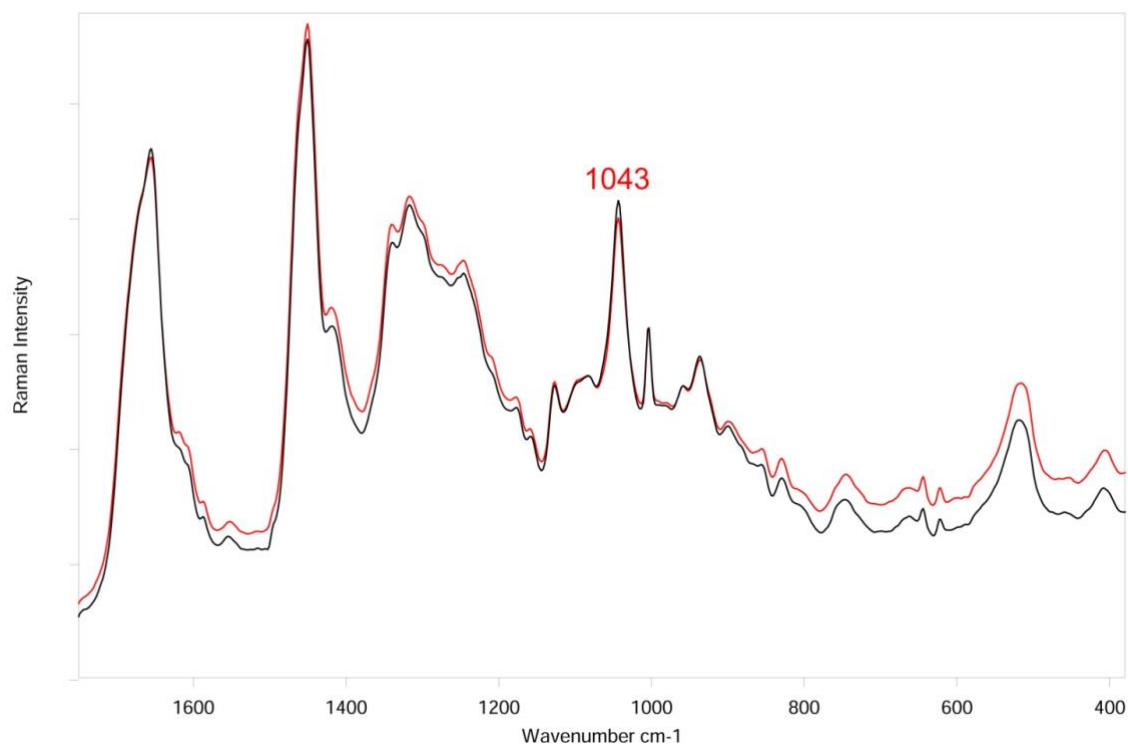


Figura 3.12: Spettri Raman del campione 2.1 prima (spettro nero) e dopo trattamento con Olaplex (campione 2.5, spettro rosso). Gli spettri sono normalizzati rispetto alla banda a 1450 cm^{-1} .

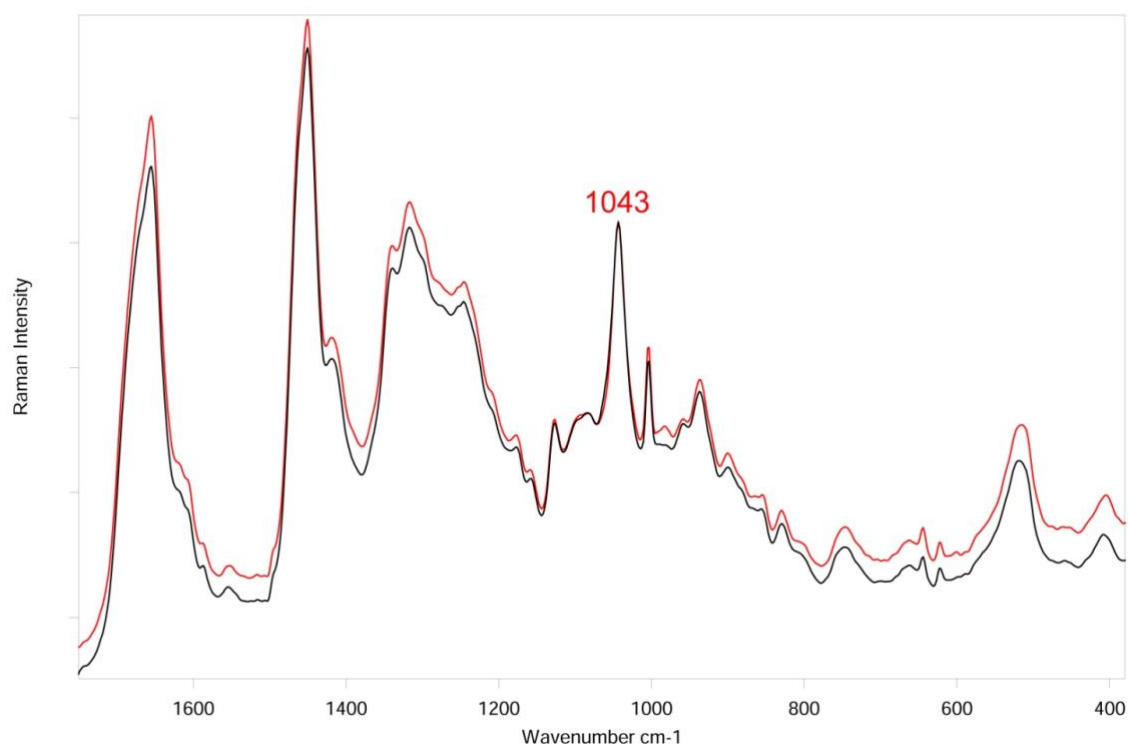


Figura 3.13: Spettri Raman del campione 2.1 prima (spettro nero) e dopo trattamento con acido shikimico (campione 2.3, spettro rosso). Gli spettri sono normalizzati rispetto alla banda a 1450 cm^{-1} .

3. Risultati e discussione

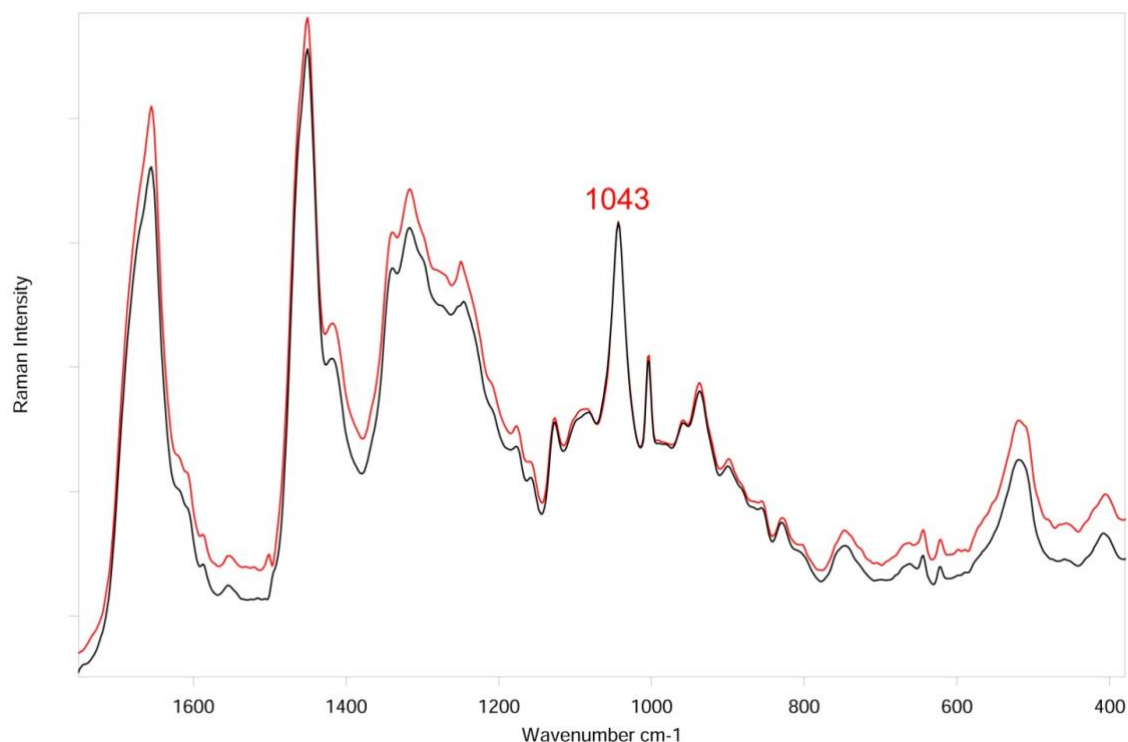


Figura 3.14: Spettri Raman del campione 2.1 prima (spettro nero) e dopo trattamento con dimetilmaleato (campione 2.6, spettro rosso). Gli spettri sono normalizzati rispetto alla banda a 1450 cm⁻¹.

La Figura 3.15 mostra l'andamento dei rapporti As-s/A1450 e A1040/A1450 calcolati dagli spettri Raman del campione decolorato quattro volte prima e dopo trattamento con Lunex Restore, Olaplex[®], acido shikimico e dimetilmaleato.

Dai dati riportati in Figura 3.15, si può dedurre che in seguito ai vari trattamenti, il contenuto in ponti disolfuro resta circa lo stesso, mentre in seguito a trattamento con Lunex Restore[®] (campione 2.5) e Olaplex[®] (campione 2.4) si vede una certa diminuzione nel contenuto di acido cisteico (maggiore nel primo che nel secondo), che non si osserva allo stesso modo in seguito a trattamento con i composti modello (acido shikimico e dimetilmaleato).

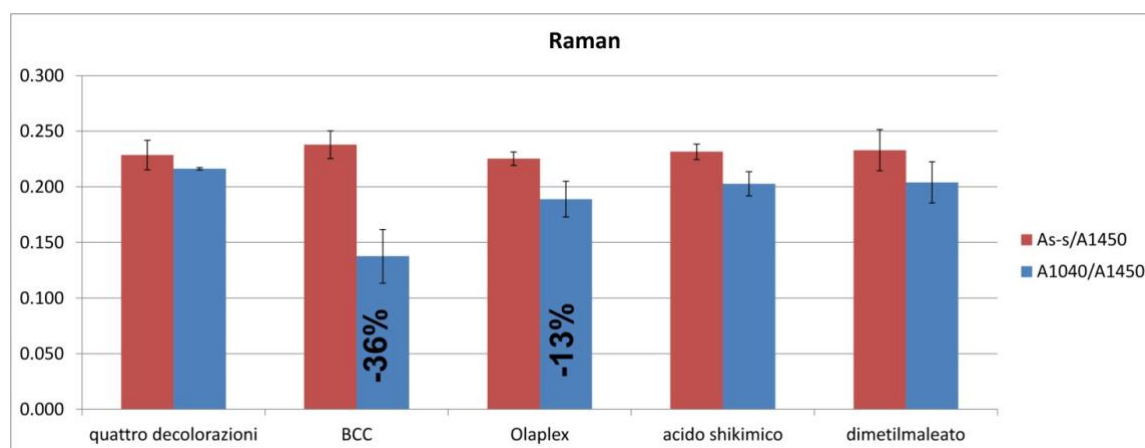


Figura 3.15: Andamento dei rapporti A_{s-s}/A_{1450} e A_{1040}/A_{1450} calcolati dagli spettri Raman del campione 2.1 (quattro decolorazioni), del campione 2.5 (BCC in figura), del campione 2.4 (Olaplex in figura), del campione 2.3 (acido shikimico in figura) e del campione 2.6 (dimetilmaleato in figura). Laddove si sono osservate variazioni significative, sono riportate le variazioni percentuali rispetto al controllo.

Non si osservano variazioni significative nelle intensità relative e nella frequenza delle bande assegnate alla conformazione della cheratina. Anche il valore del rapporto A_{935}/A_{1450} , indice del contenuto in α -elica, resta costante in seguito a tutti i trattamenti (andamenti non mostrati).

Le Figure 3.16-3.20 mostrano gli spettri ATR-IR del campione 2.1 prima e dopo trattamento con Lunex Restore[®], Olaplex[®], acido shikimico, dimetilmaleato e juglone.

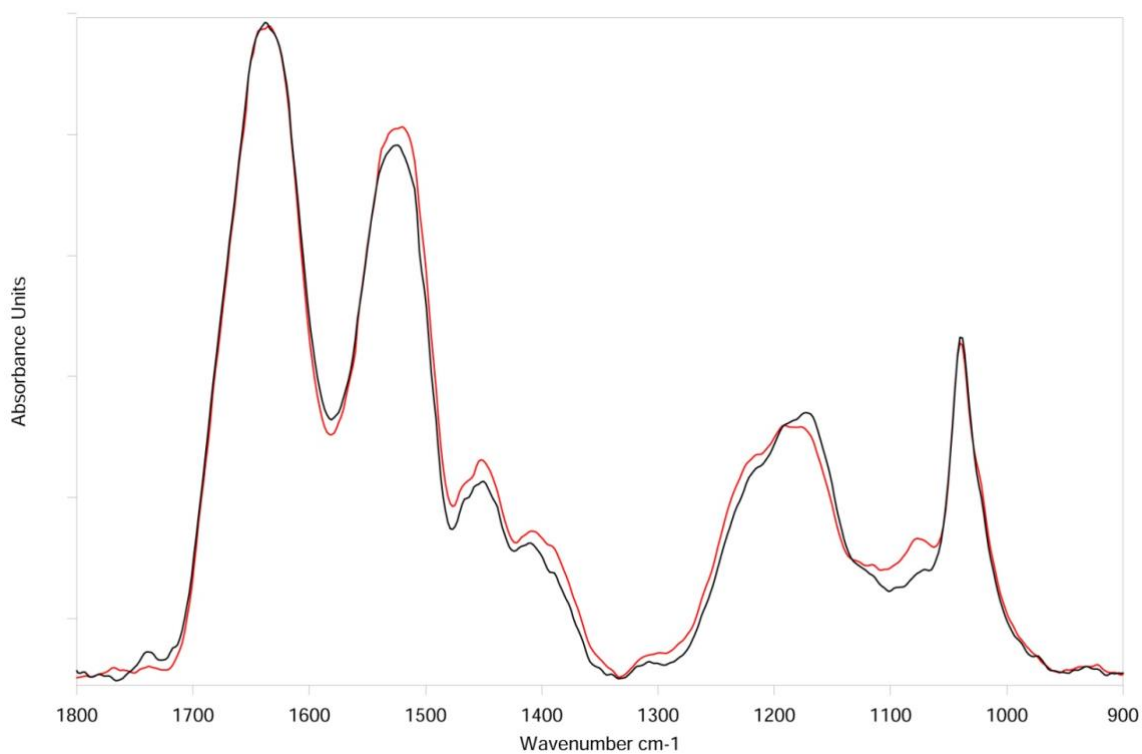


Figura 3.16: Spettri ATR-IR del campione 2.1 prima (spettro nero) e dopo trattamento con Lunex Restore (campione 2.5, spettro rosso). Gli spettri sono normalizzati rispetto alla la banda Amide I.

3. Risultati e discussione

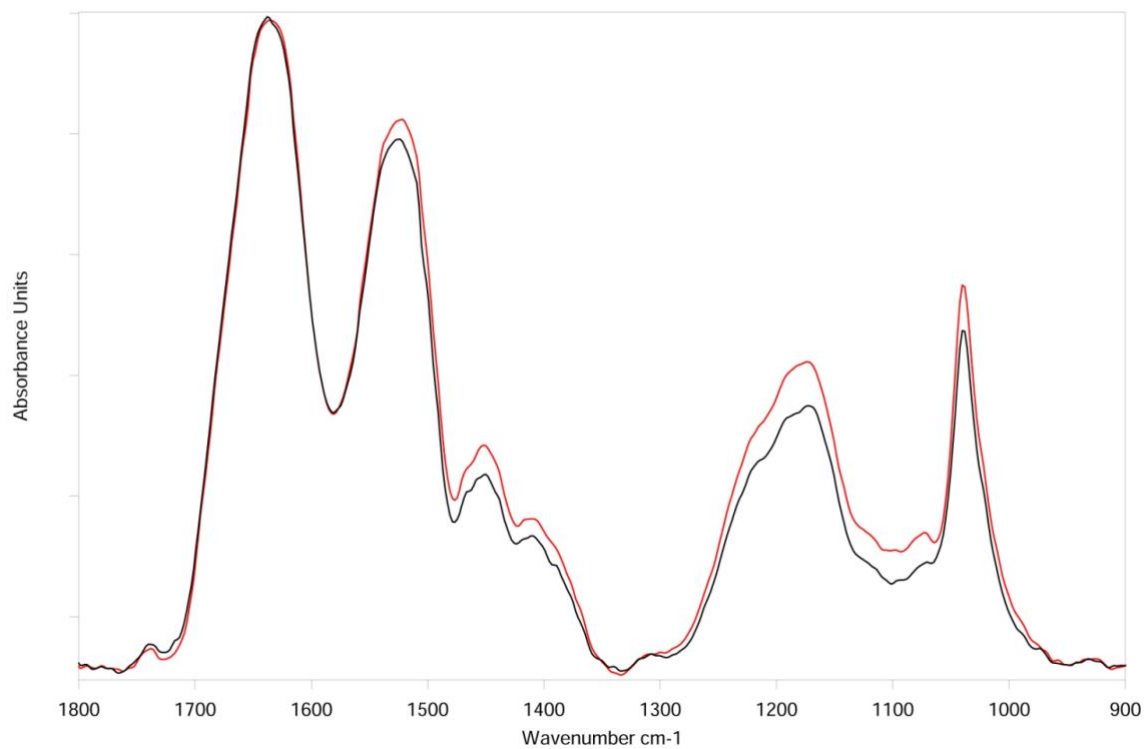


Figura 3.17: Spettri ATR-IR del campione decolorato quattro volte con Lunex+Oxi prima (spettro nero) e dopo trattamento con Olaplex (campione 2.4, spettro rosso). Gli spettri sono normalizzati rispetto alla banda Amide I.

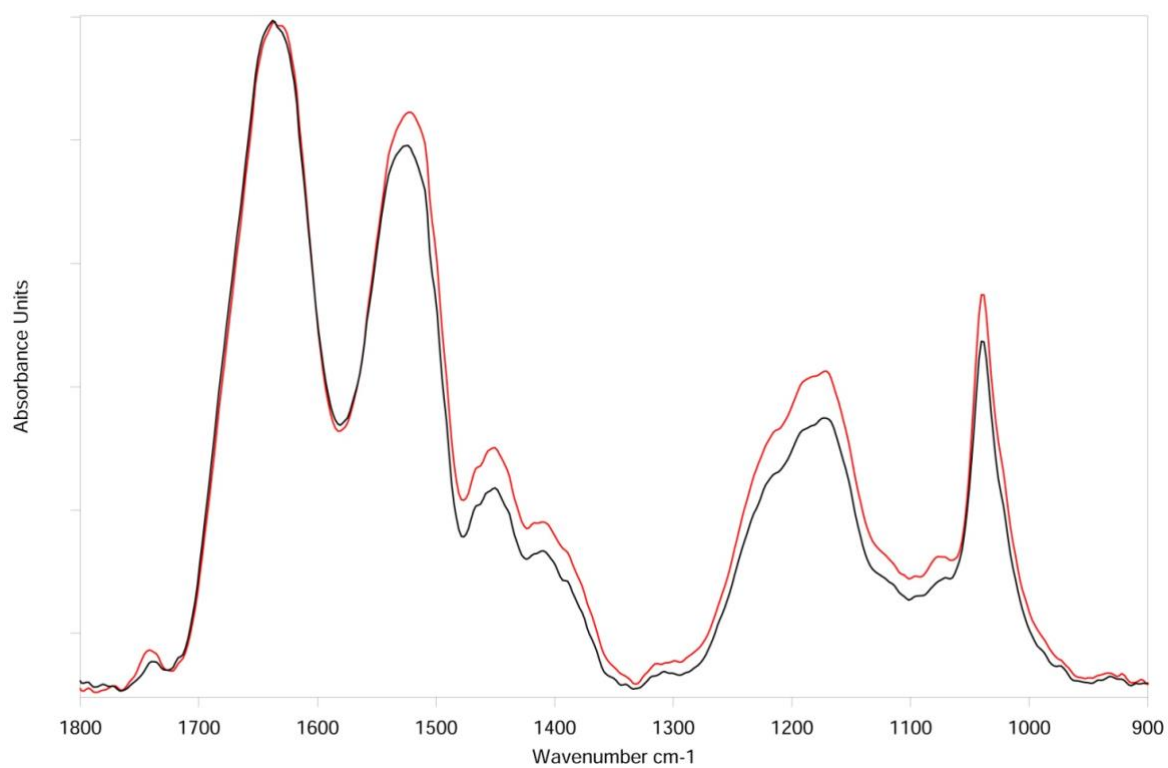


Figura 3.18: Spettri ATR-IR del 2.1 (spettro nero) e dopo trattamento con acido shikimico (campione 2.3, spettro rosso). Gli spettri sono normalizzati rispetto alla banda Amide I.

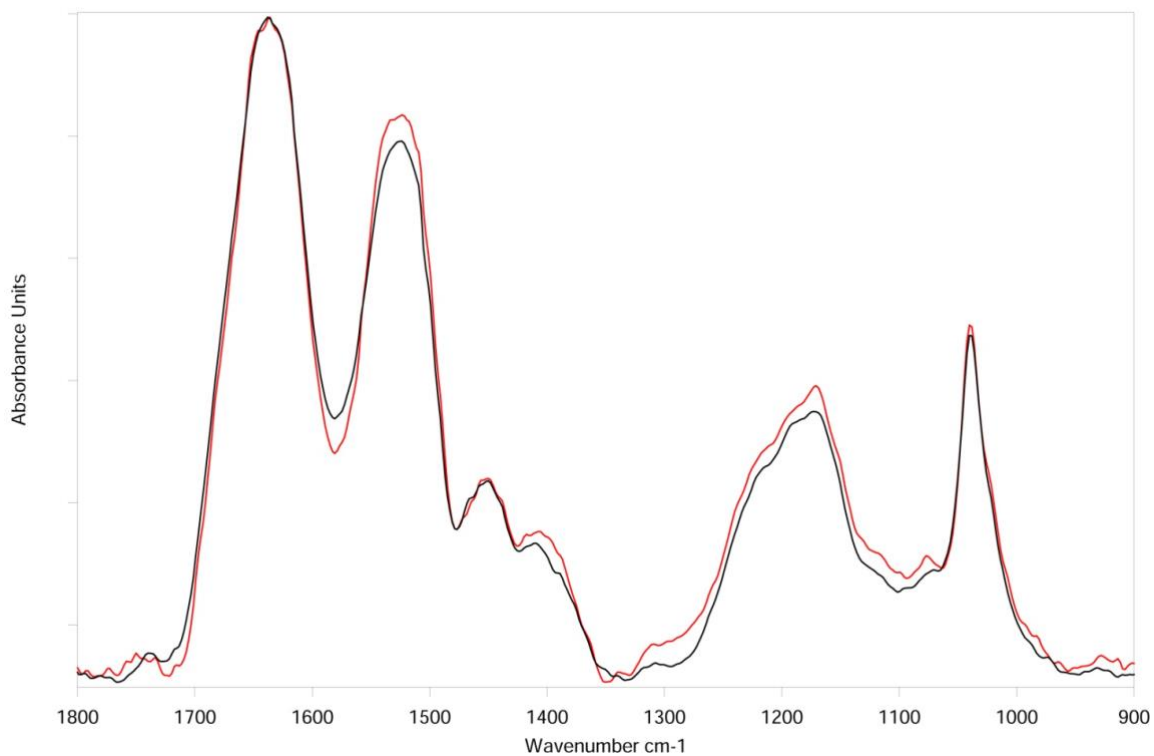


Figura 3.19: Spettri ATR-IR del campione 2.1 (spettro nero) e dopo trattamento con dimetilmaleato (campione 2.6, spettro rosso). Gli spettri sono normalizzati rispetto alla banda Amide I.

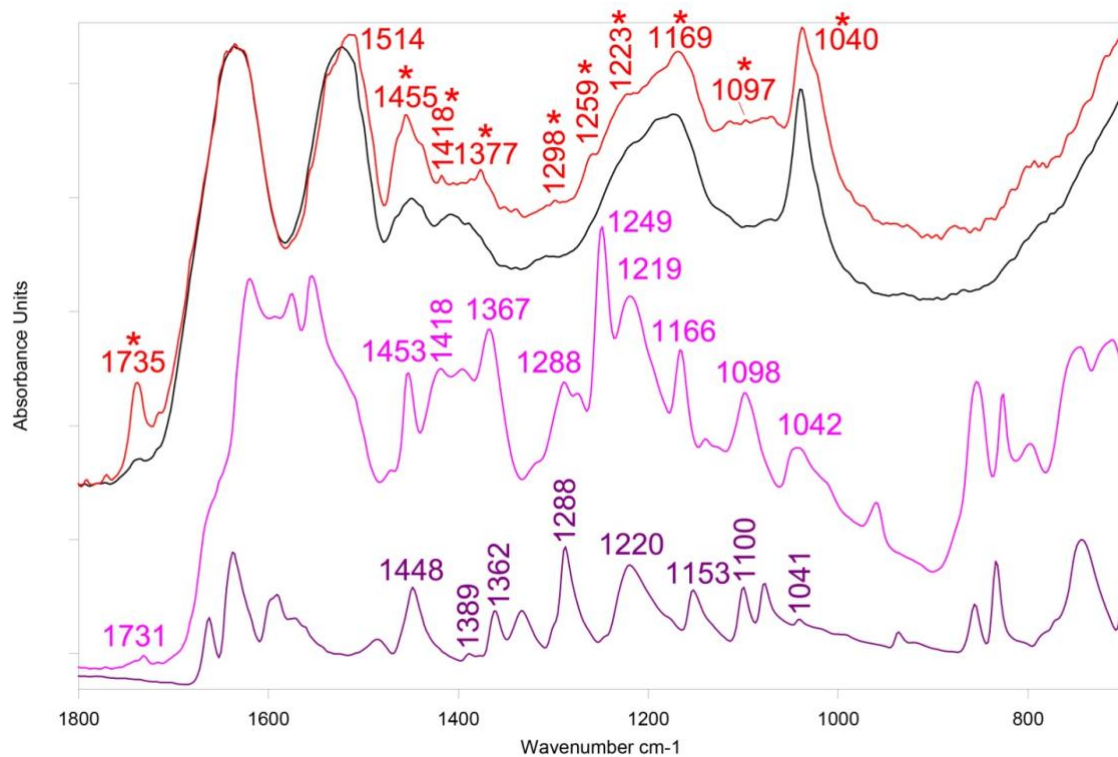


Figura 3.20: Spettri ATR-IR del campione 2.1 prima (spettro nero) e dopo trattamento con juglone (campione 2.2, spettro rosso). Gli spettri dello juglone (viola) e dell'addotto tra juglone e N-acetil-L-cisteina (rosa) sono riportati per confronto.

La Figura 3.21 mostra l'andamento dei rapporti I1175/IAmide I e I1040/IAmide I calcolati dagli spettri ATR-IR del campione decolorato quattro volte prima e dopo trattamento con Lunex Restore[®], Olaplex[®], acido shikimico, dimetilmaleato e juglone; i due rapporti non subiscono variazioni significative in seguito ai diversi trattamenti.

La spettroscopia ATR-IR permette di avere informazioni anche sul campione trattato con juglone; a causa del suo colore scuro, questo campione ha dato uno spettro Raman di scarsa qualità e quindi poco utilizzabile. Gli spettri ATR-IR riportati in Figura 3.20 mostrano che nel campione di capelli trattati con juglone (campione 2.2) si osservano delle bande assegnabili allo juglone (indicate con un asterisco); è interessante osservare che la posizione di queste bande non coincide con quella dello juglone puro, suggerendo che lo juglone presente è incorporato nella fibra; d'altro canto, la posizione di queste bande non è perfettamente coincidente neanche con quella dell'addotto tra juglone e *N*-acetil-*L*-cisteina.

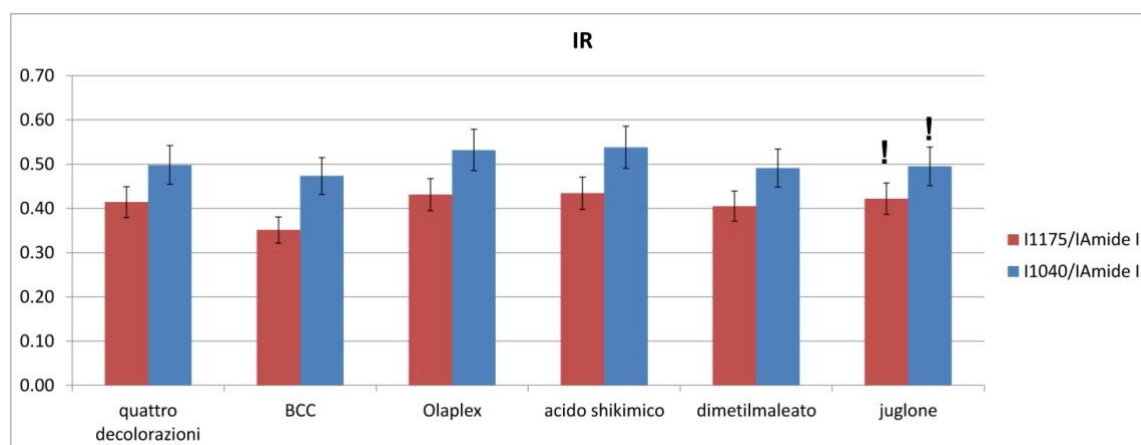


Figura 3.21: Andamento dei rapporti $I_{1175}/I_{Amide\ I}$ e $I_{1040}/I_{Amide\ I}$ calcolati dagli spettri Raman del campione 2.1 (quattro decolorazioni), del campione 2.5 (BCC in figura), del campione 2.4 (Olaplex in figura), del campione 2.3 (acido shikimico in figura) e del campione 2.6 (dimetilmaleato in figura). ! = questi rapporti non sono attendibili in quanto le bande a 1175 e 1040 cm^{-1} hanno un contributo dello juglone (v. Figura 3.16).

La Figura 3.21 mostra gli spettri ATR-IR dei capelli appartenenti alla ciocca “controllo” che hanno subito un'ulteriore decolorazione con la sola componente Lunex Ultra Cream[®] prima (campione 5.1) e dopo (campione 5.2) trattamento con juglone.

La Figura 3.22 mostra lo spettro di quest'ultimo campione a confronto con quello del campione 2.1. Come si può vedere, il campione 5.1 non mostra le bande dello juglone a differenza di quello che era stato trattato anche con la componente ossidante (campione 2.2).

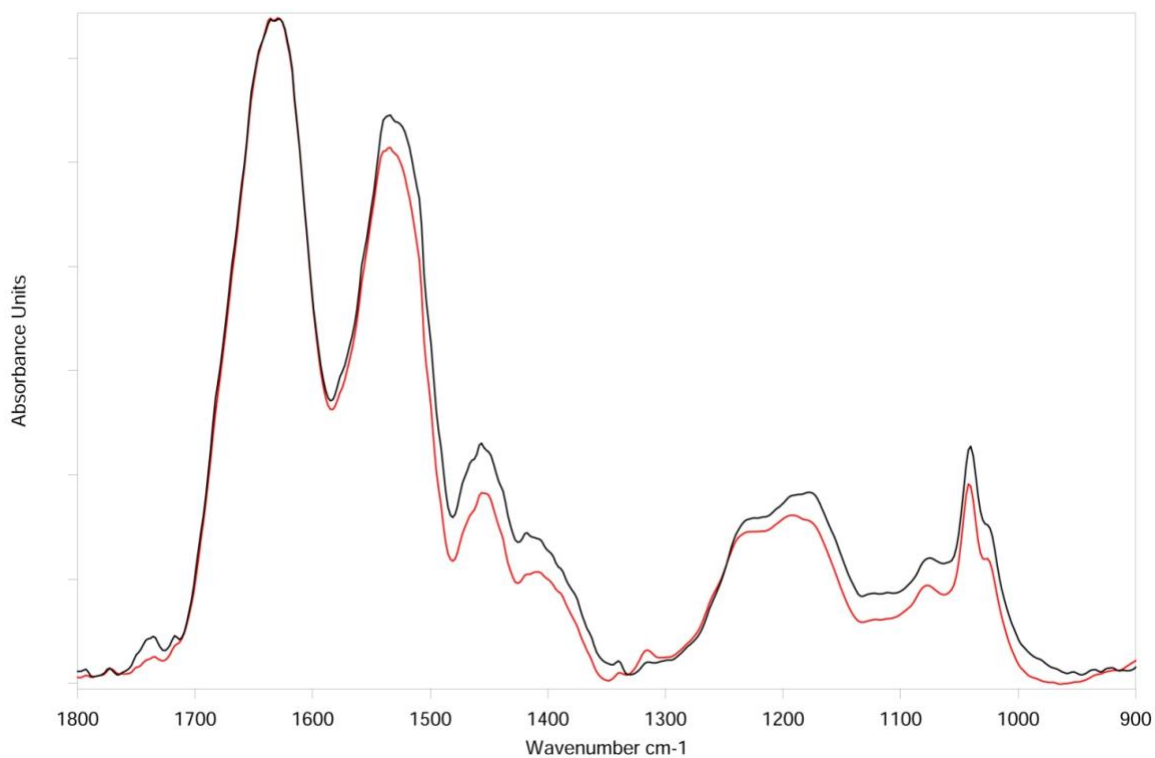


Figura 3.22: Spettri ATR-IR del campione 5.1 (spettro nero) e dopo trattamento con juglone (campione 5.2, spettro rosso).

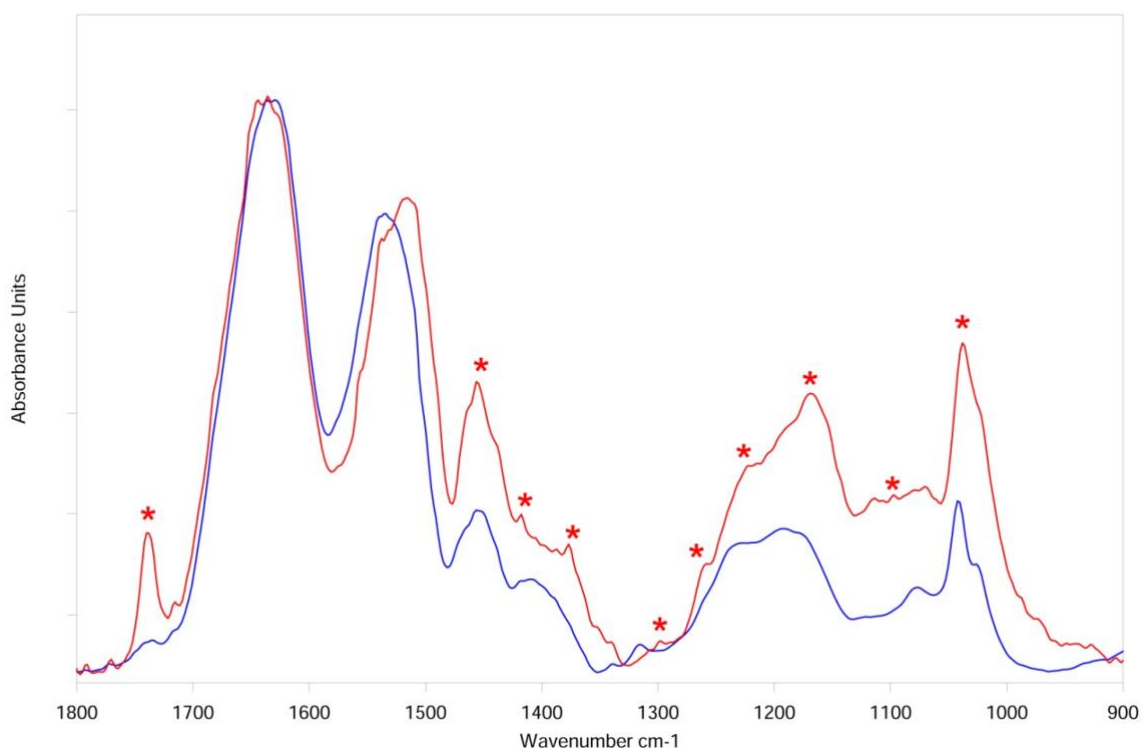


Figura 3.23: . Spettri ATR-IR: del campione 5.2 (spettro blu); del campione 2.1 (spettro rosso, già riportato in Figura 20); le bande che hanno un contributo dello juglone sono indicate con un asterisco

In effetti, come si può vedere anche in Figure 3.23, il trattamento con juglone nel campione 2.1 determina una diminuzione del contenuto di acido cisteico rispetto al campione 5.2.

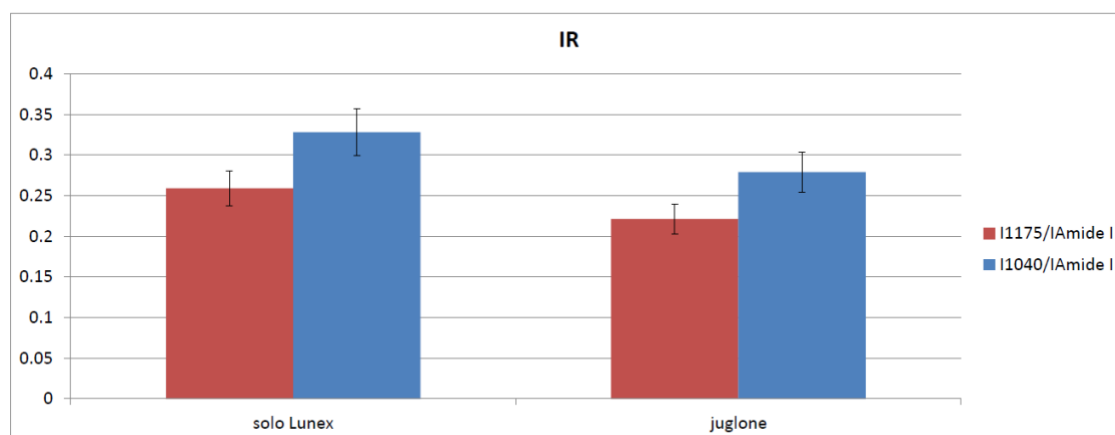


Figura 3.24: Andamento dei rapporti I1175/Amide I e I1040/Amide I calcolati dagli spettri ATR-IR dei campioni 5.1 e 5.2.

In conclusione, lo studio vibrazionale Raman ha mostrato che il trattamento con gli agenti ristrutturanti Lunex Restore e Olaplex[®] ha determinato una diminuzione del contenuto di acido cisteico nella regione corticale. Gli spettri IR hanno mostrato che trattando con juglone il capello decolorato quattro volte (campione 2.1), esso viene incorporato nella cuticola della fibra; lo stesso comportamento non si è osservato nel caso in cui l'ultimo trattamento sia stato effettuato con la sola componente Lunex Ultra Cream[®] (campione 5.2).

3.2.2 Analisi SEM su fibra

Per effettuare le analisi del capello al microscopio a scansione elettronica è stato necessario metallizzare con grafite via “sputtering” la fibra per renderla conduttiva e permettere lo studio delle modificazioni morfologiche che hanno luogo sulla superficie del capello modificato.

Lotto 1

In questo lotto, cinque ciocche “controllo” sono state trattate con prodotti decoloranti citati nella tabella 2 con un tempo di posa di 45 minuti a 35 °C; quattro di queste hanno poi subito il trattamento ricostruttore.

Il campione 1.1 in Figura 3.25 mostra il capello trattato solo con miscela decolorante: osservando le cuticole sulla superficie, si può constatare che il trattamento a cui è stato sottoposto ha generato un allargamento delle squame e quindi una perdita di aderenza di queste ultime al fusto della fibra.

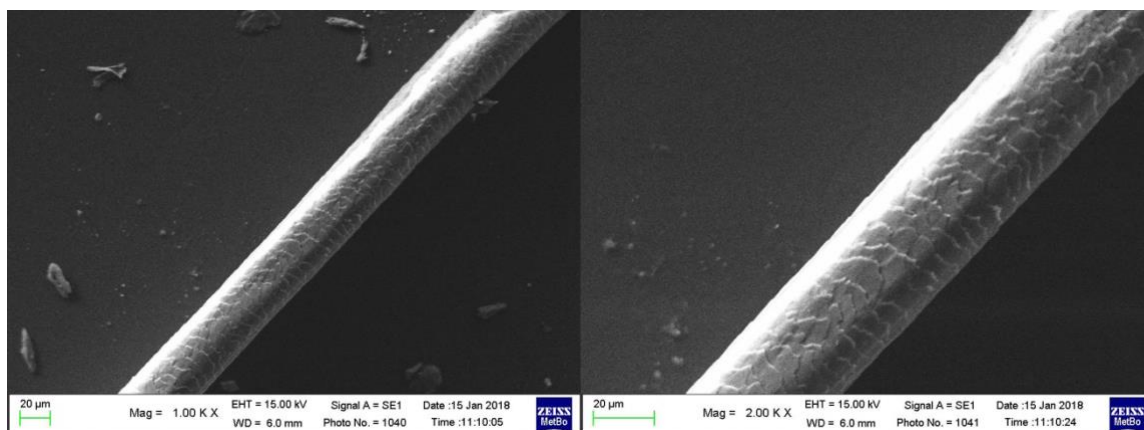


Figura 3.25: Campione 1.1

Quando il campione, dopo decolorazione, viene trattato immergendolo in una soluzione di Juglone 5% mol/mol in CH_3OH , ne risulta una “chiusura” delle cuticole, che quindi aderiscono maggiormente al fusto del capello, dando alla fibra un aspetto più uniforme.

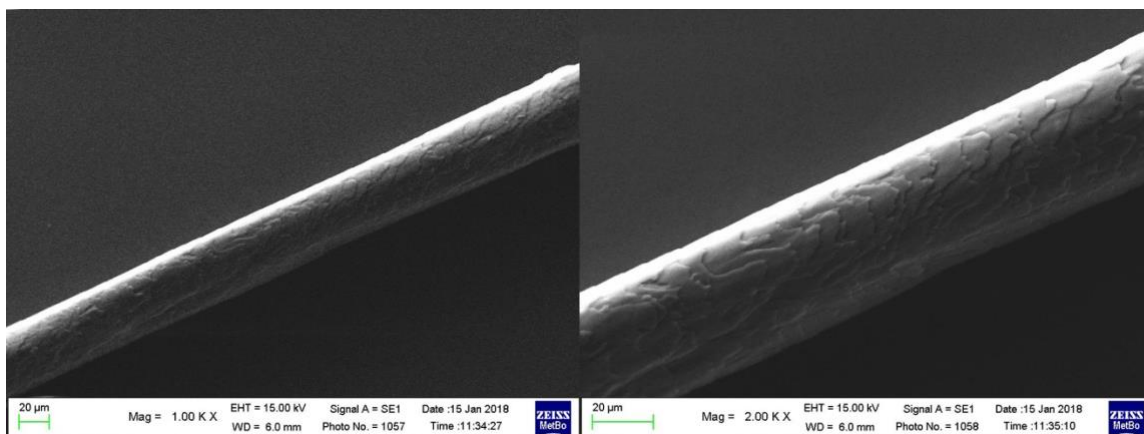
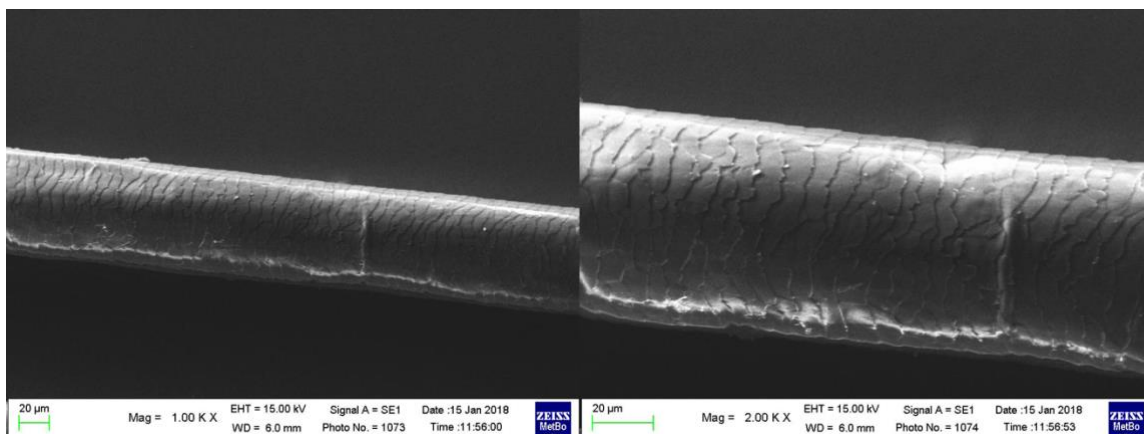


Figura 3.26: Campione 1.2

Se il capello, dopo aver subito decolorazione, viene trattato con acido shikimico 5% mol/mol in CH_3OH come per il campione 1.3 in Figura 3.27, si nota anche in questo caso una maggior adesione delle cuticole al fusto rispetto al capello non trattato con agenti ricostruttori, nonostante la chiusura delle squame sia minore rispetto al campione 1.2.



3. Risultati e discussione

Figura 3.27: Campione 1.3

Il campione trattato con Olaplex® (Figura 3.28) mostra un capello particolarmente danneggiato dal precedente step di decolorazione; la chiusura delle cuticole, in questo caso, risulta difficile da determinare, poiché la superficie del capello analizzato non è omogenea ma presenta delle zone in cui non si osserva la presenza di squame.

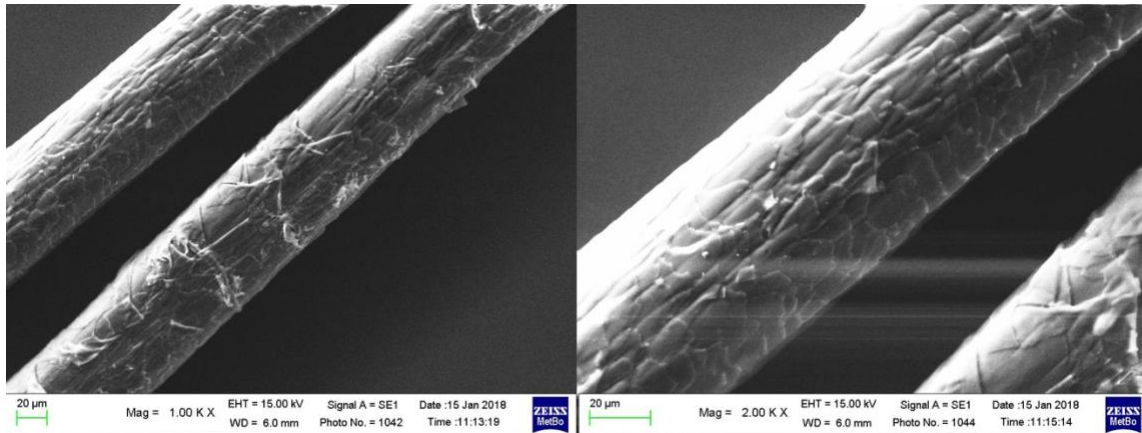


Figura 3.28: Campione 1.4

Il campione 1.5 è stato trattato con Lunex Restore® dopo decolorazione ed appare visibilmente più omogeneo: nella figura 3.29 si nota una notevole chiusura delle squame che difficilmente si distinguono dal fusto del capello, rispetto al campione 1.1 non trattato con ricostruttori.

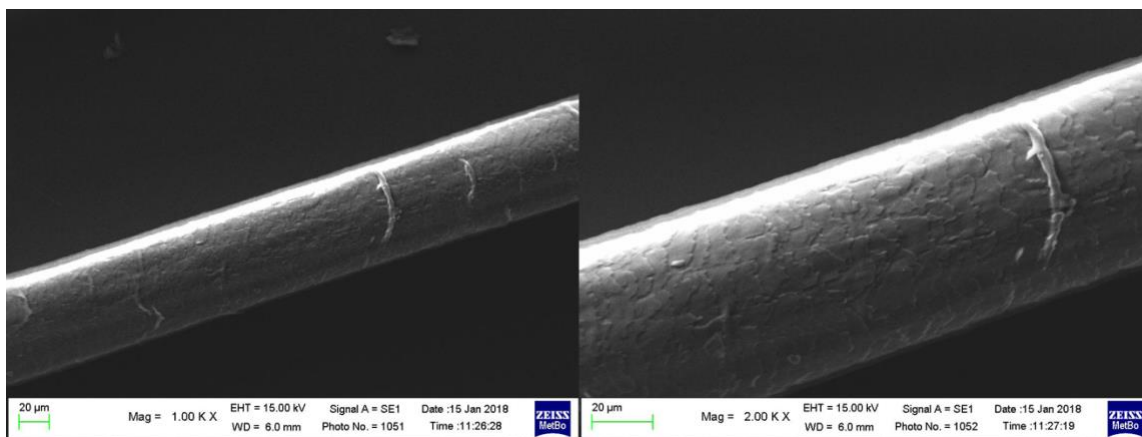


Figura 3.29: Campione 1.5

Lotto 2

Le singole fibre di ogni campione del lotto 1 sono risultate poco omogenee tra loro, con presenza di un'elevata quantità di capelli privati di cuticole e corteccia, oltre a quelli in migliori condizioni selezionati per le immagini SEM nel capitolo precedente. Si è pensato che l'effetto del deterioramento potesse derivare da un tempo troppo elevato di

applicazione della miscela decolorante su un capello che ha già subito precedentemente 3 decolorazioni (ciocca “controllo”).

Si è deciso quindi di diminuire i tempi di decolorazione a 15 minuti e di analizzare le fibre così trattate al microscopio a scansione elettronica.

Questo lotto, composto da 5 ciocche “controllo”, è stato trattato con una miscela decolorante con un tempo di posa di 15 minuti a 35 °C.

La figura 3.30 mostra il campione 2.1, sottoposto a decolorazione per 15 minuti a 35 °C: le squame del capello appaiono ben aperte, segno di deterioramento della fibra.

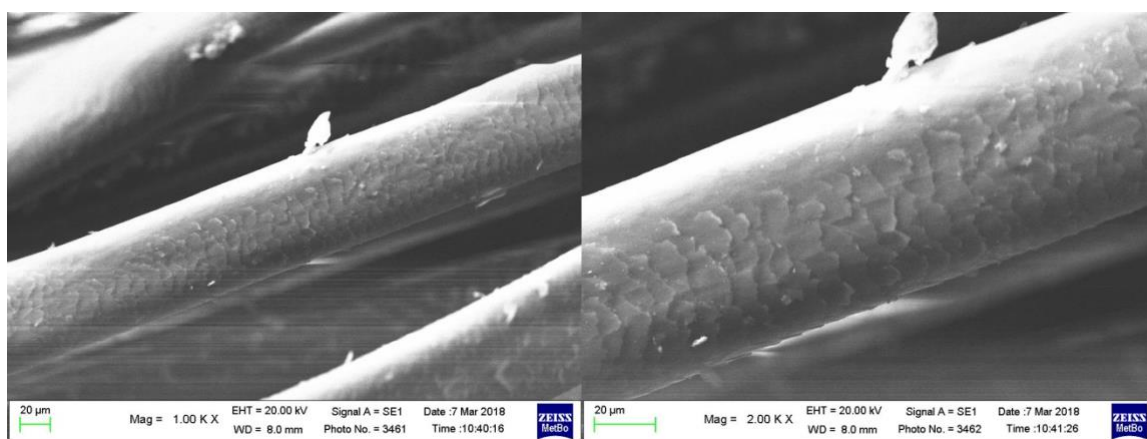


Figura 3.30: Campione 2.1

La figura 3.31 mostra il capello che, dopo aver subito il trattamento citato sopra, viene immerso in una soluzione di Juglone 5% mol/mol in CH₃OH per 45 minuti; le squame del capello risultano poco visibili, quindi si può dedurre che abbiano aderito al corpo del capello tanto da renderne difficile la distinzione.

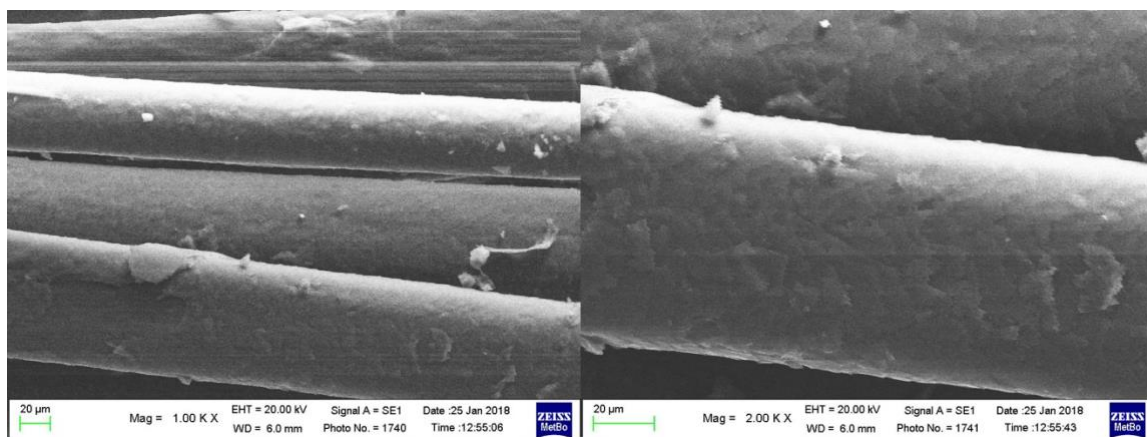


Figura 3.31: Campione 2.2

3. Risultati e discussione

Il campione 2.3 ha subito invece il trattamento con acido shikimico 5% mol/mol in CH₃OH dopo decolorazione e alla ciocca è stato effettuato un nodo per rendere più visibile l'apertura delle squame.

La figura 3.32 mostra diverse fibre sottoposte a uno sforzo di tensione dovuto alla curvatura del nodo; come si osserva dall'immagine SEM, in queste condizioni le cuticole tendono a sollevarsi anche se in misura moderata, il che fa supporre che il capello possa essersi "riparato" dopo il trattamento con il prodotto ricostruttore.

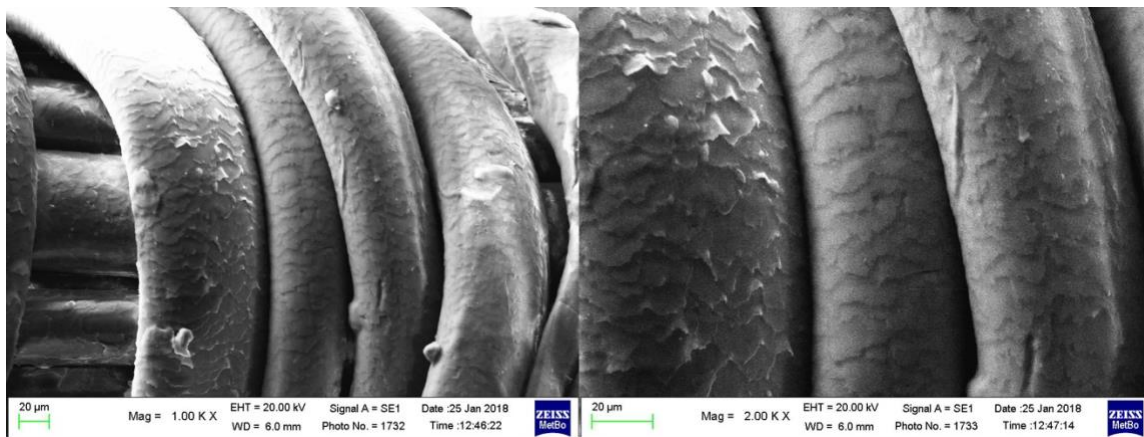


Figura 3.32: Campione 2.3

Il campione 2.4 è stato trattato, dopo aver subito decolorazione per 15 minuti, con il prodotto commerciale Olaplex®. Osservando la figura 3.33 si può dedurre che l'applicazione del prodotto ha avuto un effetto positivo, mostrando una struttura uniforme e simile lungo la lunghezza della fibra, nonostante risultino comunque abbastanza evidenti le cuticole del capello.

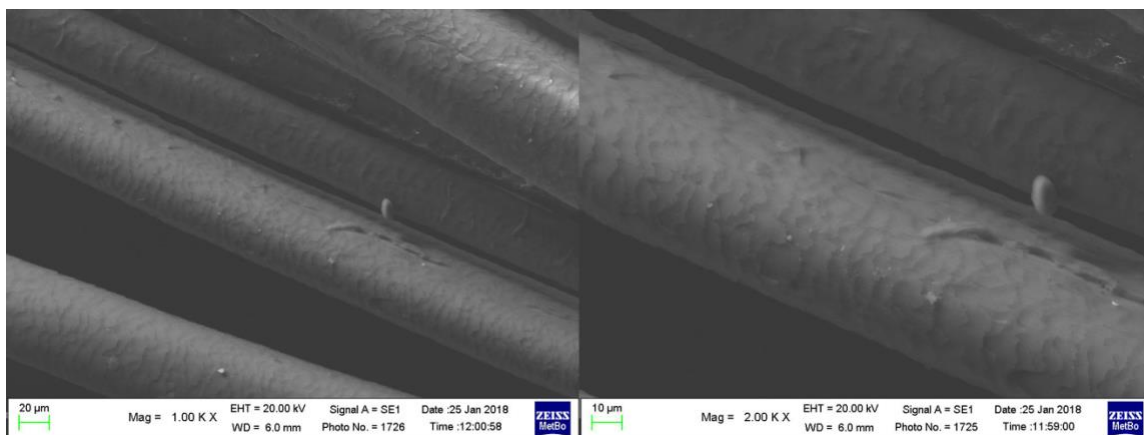


Figura 3.33: Campione 2.4

Dopo essere stato decolorato, il campione 2.5 è stato trattato con il prodotto commerciale ricostruttore Lunex Restore® per 45 minuti a temperatura ambiente; le cuticole del capello

dopo tale trattamento risultano leggermente più aperte in alcune fibre singole, effetto probabilmente dovuto alla deformazione del campione raccolto in un nodo.

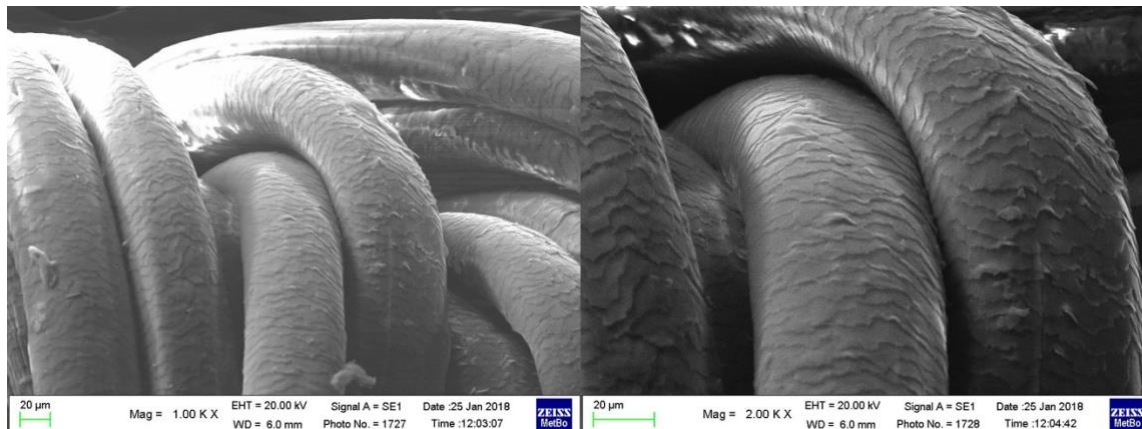


Figura 3.34: Campione 2.5

Lotto 3

Per evidenziare maggiormente le differenze tra i differenti trattamenti ricostruttori e avere dei campioni di base più riproducibili, si è deciso di applicare i prodotti ricostruttori direttamente alla ciocca “controllo”, decolorata 3 volte consecutive.

L’immagine 19 mostra la morfologia della ciocca “controllo”, che in questo lotto coincide con il campione 3.1 non trattato con agenti ristrutturanti. Sulla superficie del capello in queste condizioni si possono distinguere nitidamente le cuticole che risultano aperte probabilmente a causa dell’intensivo trattamento subito in precedenza.

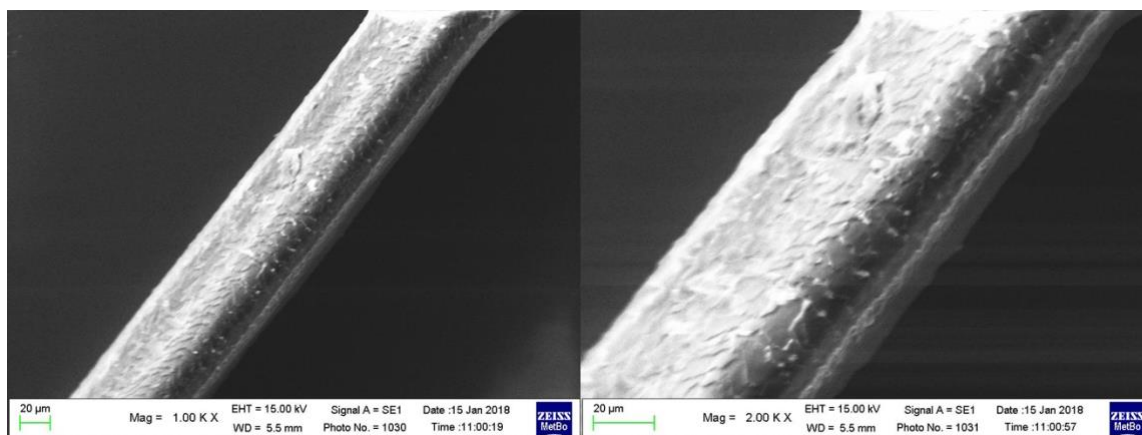


Figura 3.35: Campione 3.1

Il campione 3.2 è stato trattato con una soluzione metanolica di acido shikimico 5% mol/mol e si può osservare dalla figura 3.35 che, nonostante la fibra presenti cuticole leggermente allargate a causa della torsione provocata dal nodo, i capelli tra loro appaiono più simili e anche meno deteriorati rispetto al campione 3.1.

3. Risultati e discussione

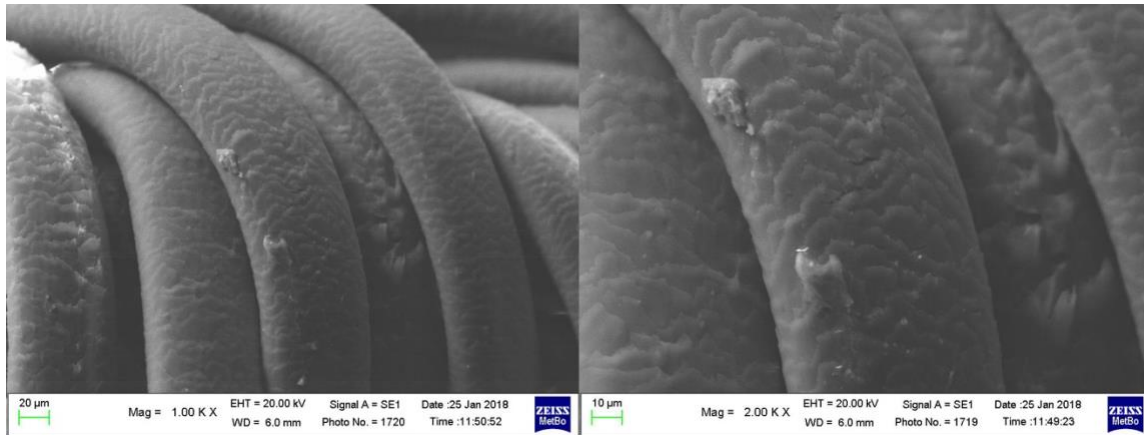


Figura 3.36: Campione 3.2

Anche il campione 3.3 ha dato buoni risultati, dopo essere stato trattato con una soluzione di acido shikimico 5% mol/mol in soluzione metanolica. Il capello mostra una superficie omogenea e relativamente liscia, con le cuticole abbastanza aderenti al fusto del capello.

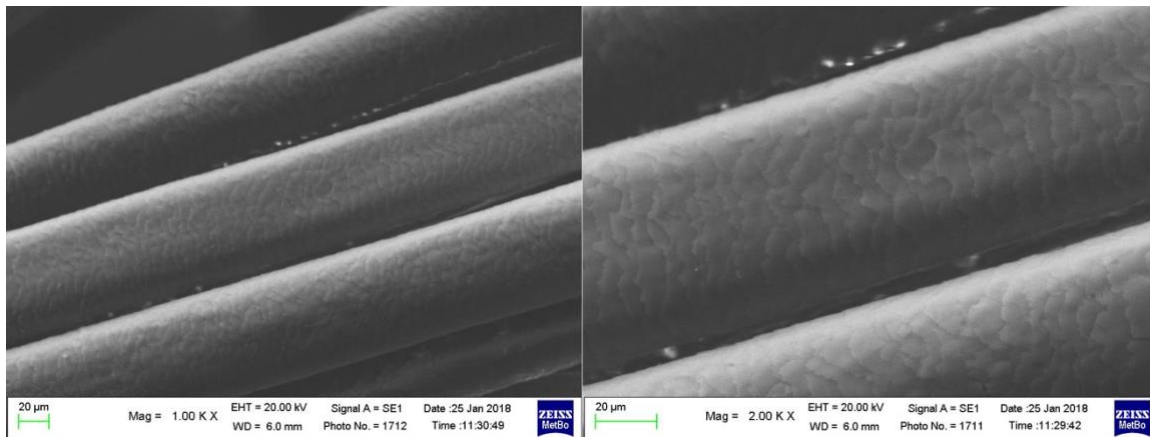


Figura 3.37: Campione 3.3

Anche il capello trattato con il prodotto commerciale Olaplex[®], in questo lotto denominato campione 3.4 in figura 3.38, mostra una buona chiusura delle cuticole nonostante la tensione a cui è sottoposto, che in alcune zone isolate ha provocato un allargamento anomalo delle squame.

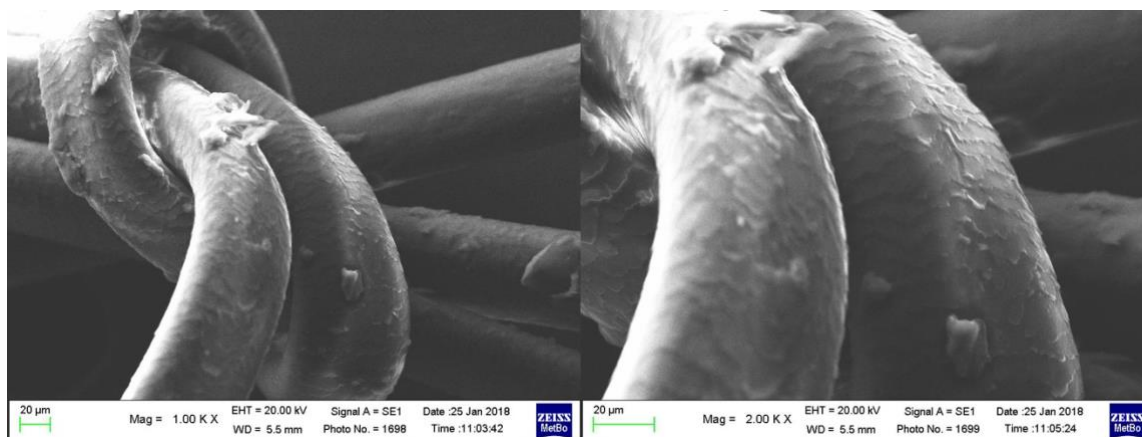


Figura 3.38: Campione 3.4

Il campione 3.5 è stato trattato con il prodotto commerciale Lunex Restore[®] e dalle immagini SEM la superficie del capello risulta leggermente più rugosa rispetto ai casi precedenti trattati con lo stesso prodotto, effetto probabilmente associato alla presenza, sulla superficie, di piccoli residui solidi non ben identificati, probabilmente dovuti a contaminazione da polvere.

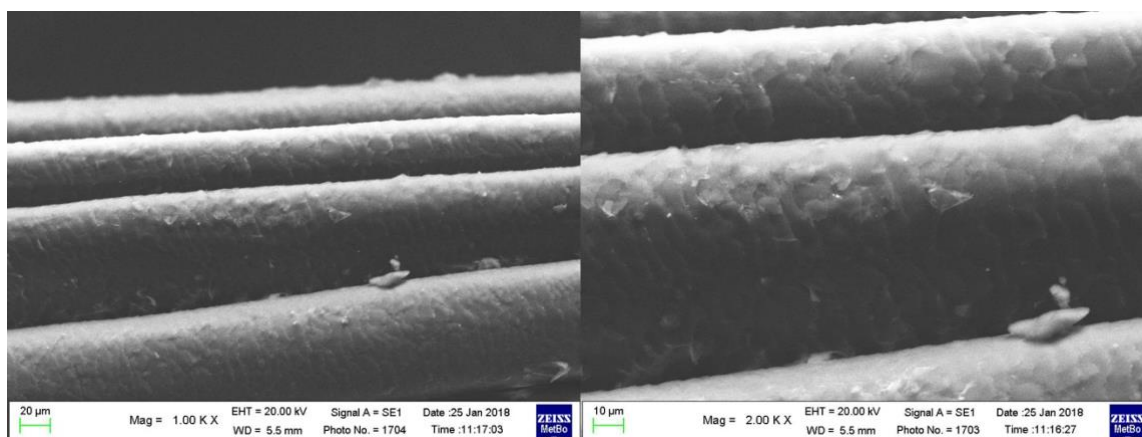


Figura 3.39: Campione 3.5

Lotto 4

Infine sono state effettuate delle analisi su un capello trattato, in un primo momento, con agenti rigonfianti e riducenti, per mimare le condizioni utilizzate nei trattamenti di permanente o stiraggio dei capelli; poi, ogni ciocca è stata trattata, come di consuetudine, con un diverso prodotto ricostruttore.

Per rigonfiare le cuticole del capello si è preparata una soluzione di KOH a $\text{pH} \approx 9$ su cui sono stati immerse, singolarmente, le 5 ciocche “controllo” per 5 minuti. Dopodiché ogni ciocca è stata immersa in una soluzione di NaHSO_3 , per 5 minuti, per favorire la riduzione

3. Risultati e discussione

dei ponti disolfuro. Infine quattro delle cinque ciocche sono state trattate con i diversi agenti ricostruttori.

La figura 3.40 illustra il capello dopo che ha subito il trattamento di riduzione: nonostante ci aspettassimo delle squame notevolmente rialzate, in questo caso la fibra non mostra significativi deterioramenti.

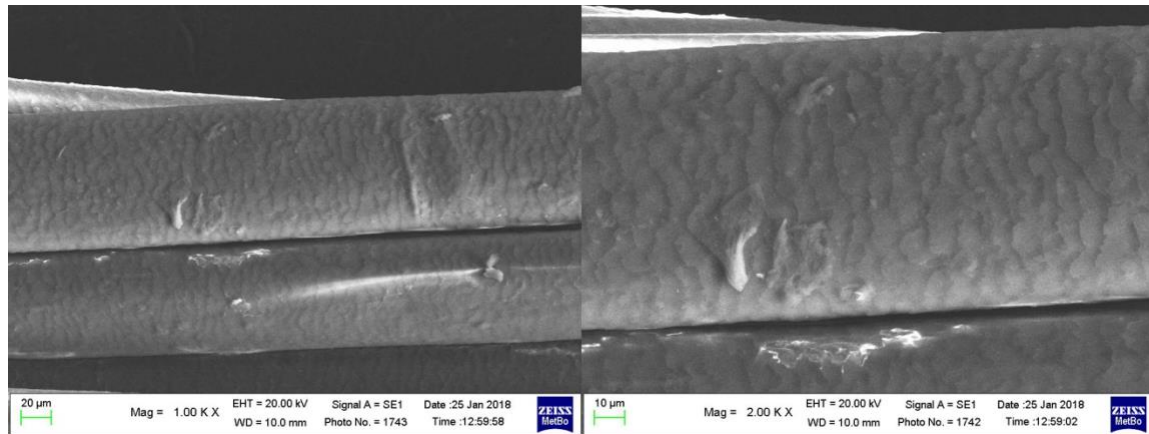


Figura 3.40: Campione 4.1

Il campione 4.2, dopo aver subito il processo di riduzione, è stato trattato con una soluzione di juglone 5% mol/mol in CH_3OH per 45 minuti: in questo caso la superficie del capello non presenta particolari modificazioni rispetto al campione 4.1, nonostante le squame appaiano leggermente più uniformi con il resto del capello e meno identificabili rispetto al capello non trattato con agenti ricostruttori.

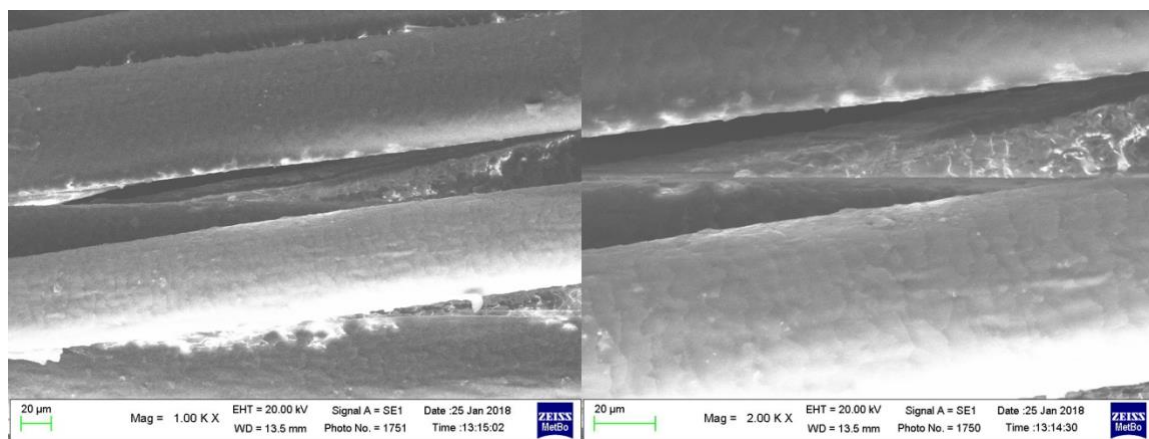


Figura 3.41: Campione 4.2

La figura 3.42 mostra il campione 4.3 trattato con una soluzione di acido shikimico 5% mol/mol in CH_3OH per 45 minuti; anche in questo caso non si notano particolari differenze

rispetto al campione 4.1 non trattato, sebbene in questo caso la singola fibra analizzata presenti una spaccatura probabilmente dovuta a degradazione meccanica.

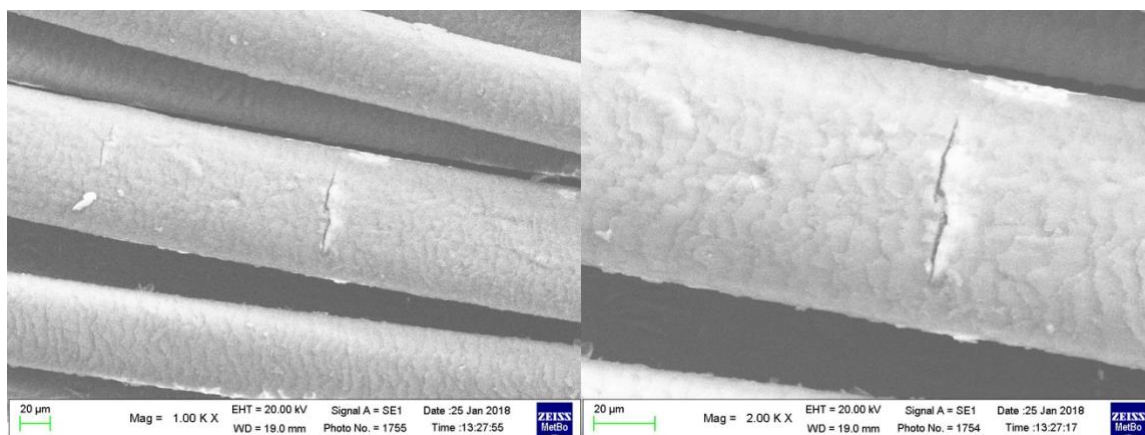


Figura 3.42: Campione 4.3

Nella figura 3.43 si può osservare il campione sottoposto, dopo immersione prima in KOH, poi in NaHSO₃, a un trattamento con il prodotto commerciale Olaplex®; le cuticole sulla parte esterna della fibra in questo caso sono abbastanza evidenti, che lasciano intendere che il capello non sia stato correttamente ristrutturato.

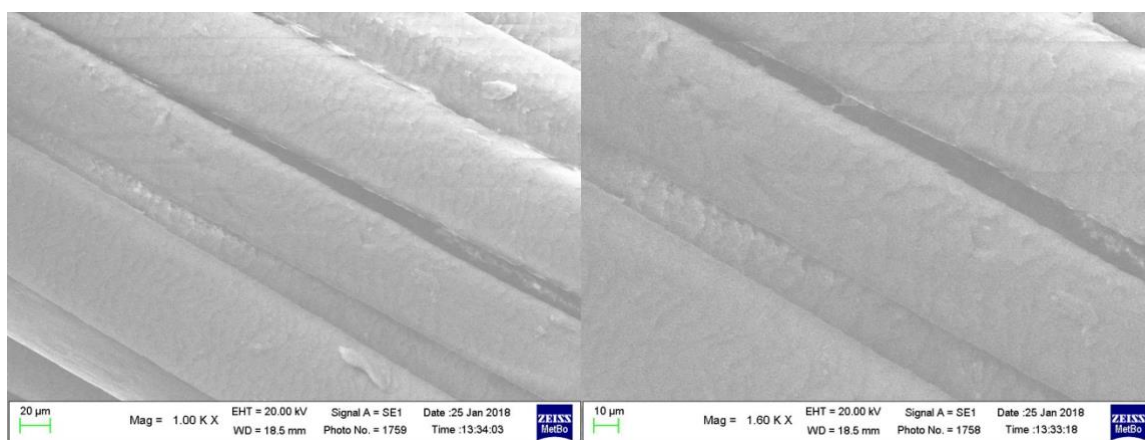


Figura 3.43: Campione 4.4

Anche il campione 4.5, trattato invece con il prodotto commerciale Lunex Restore®, non presenta particolari modificazioni nella struttura morfologica; come nel campione 4.4, analizzando le immagini SEM si può osservare come le cuticole risultino ben evidenti e quindi poco aderenti al corpo della fibra.

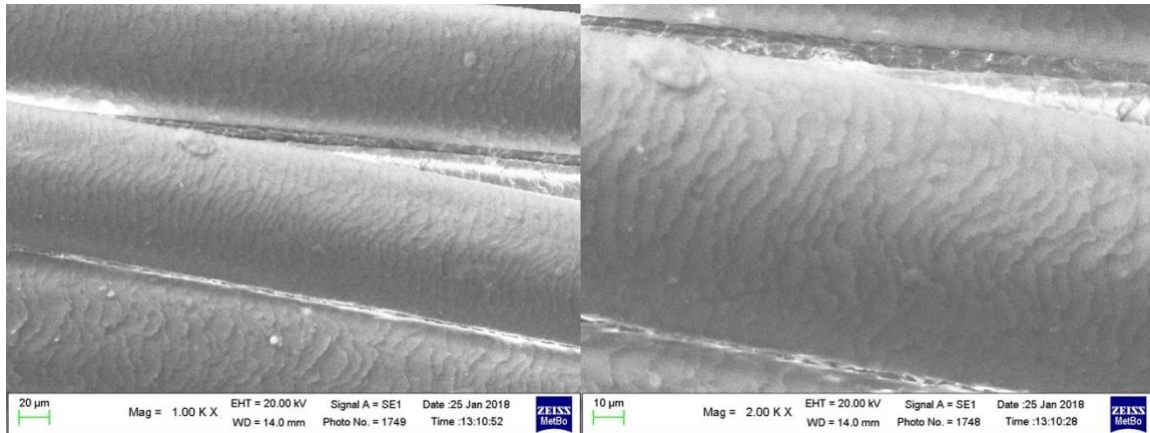


Figura 3.44: Campione 4.5

Lotto 5

In questo lotto le ciocche controllo sono state trattate soltanto con la crema decolorante a base di sali solfonati (Lunex Ultra Cream[®]), per 15 minuti, come mostra la Tabella 2, allo scopo di rendere più evidente l'effetto dei differenti trattamenti ricostruttori sul capello.

La figura 3.45 mostra il capello non sottoposto ad alcun trattamento ricostruttore: si può notare che la fibra così trattata risulta effettivamente danneggiata e, in alcuni casi, anche privata di un significativo strato di squame, tanto da rendere visibile la corteccia del capello.

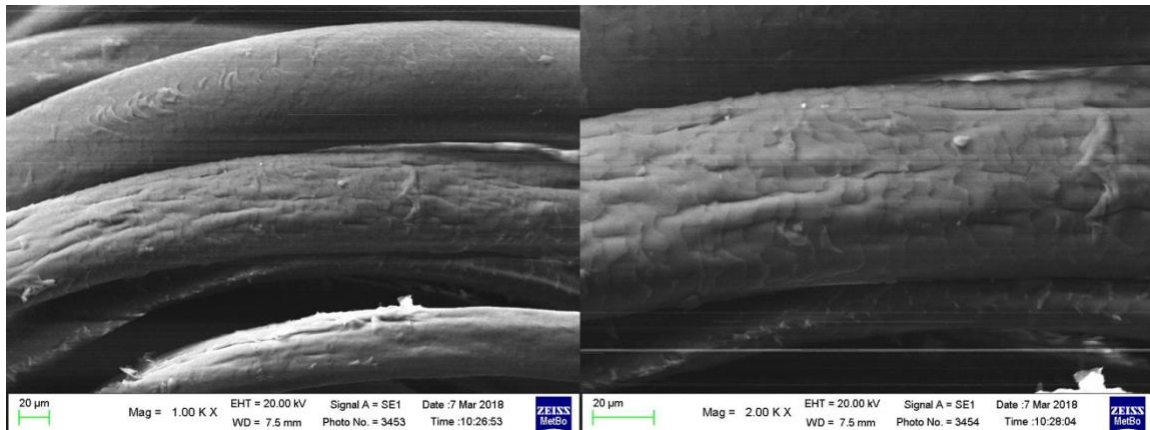


Figura 3.45: Campione 5.1

Il campione 5.2, dopo trattamento con crema a base di sali solfonati, è stato immerso in una soluzione metanolica di juglone 5% mol/mol per 45 minuti.

In Figura 3.46 si può notare come la struttura morfologica del campione 5.2 così trattato risulti leggermente migliorata rispetto a quella del campione 5.1, infatti in questo caso sono ben evidenti le squame del capello. Inoltre, nonostante il capello appaia omogeneo lungo

la sua superficie, dalle immagini SEM si notano anche alcune contaminazioni probabilmente dovute a polvere.

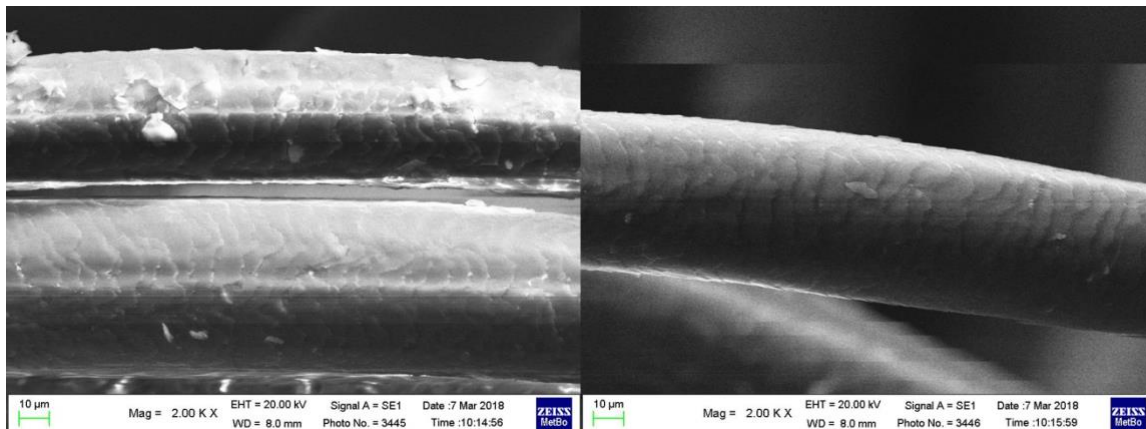


Figura 3.46: Campione 5.2

In figura 3.47 è illustrato il campione 5.3 trattato, dopo applicazione di Lunex Ultra Cream[®], con una soluzione di dimetilmaleato 5% mol/mol in CH₃OH.

In questo caso il capello ha subito dei notevoli miglioramenti rispetto alla struttura mostrata in Figura 3.43: le cuticole sembrano avere un aspetto più embricato rispetto al campione 5.1 non trattato e la fibra, lungo il fusto, appare abbastanza uniforme.

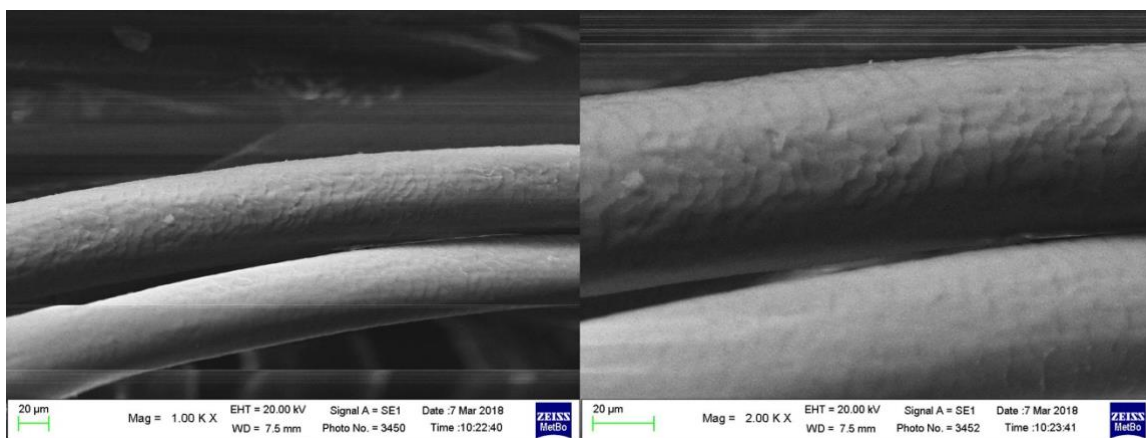


Figura 3.47: Campione 5.3

4 Considerazioni Finali

Questo lavoro di tesi è stato svolto seguendo inizialmente una linea improntata allo studio della reazione di sulfa-Michael condotta in condizioni blande tra derivati della cisteina e diversi accettori di Michael, che ha permesso di ottenere, a seconda della classe di elettrofili impiegati nelle reazioni, numerosi addotti di interesse.

In particolare, l'indagine sulla reazione di addizione tra *N*-acetil-*L*-cisteina e *p*-chinone e altri derivati naftochinonici presenti in composti naturali come juglone, plumbagina e naftazarina, quando condotta attraverso reazioni effettuate in tubo NMR e monitorate attraverso questa tecnica, ha permesso di osservare che i prodotti di addizione subiscono molteplici trasformazioni e, se esposti all'aria, ossidazione. In base a questi risultati, è stato possibile giustificare non solo le difficoltà riscontrate nella purificazione e nell'isolamento dei prodotti con buone rese, ma anche l'assenza, in letteratura, di dati su queste reazioni e sulla caratterizzazione dei relativi prodotti.

Sono stati anche utilizzati altri accettori di Michael quali fenil vinilsolfone e dimetil maleato che hanno dato i prodotti di addizione con buone rese in condizioni blande e a temperatura ambiente.

Inoltre, sono stati esaminate reazioni tra derivati cisteinici e substrati con più bassa reattività come chetoni ed esteri α - β insaturi e, in via preliminare, anche con l'ossido di ciclopentene, i cui risultati sono promettenti e validi per essere sottoposti ad eventuali approfondimenti futuri.

Gli studi spettroscopici Raman/IR effettuati sul capello che ha subito decolorazione mostrano che i numerosi trattamenti di sbiancamento hanno deteriorato la fibra, tanto da rendere indeterminabile la presenza di terminazioni tioliche sulla superficie del capello trattato con agenti decoloranti; d'altra parte, è stato riscontrato che la quantità di acido cisteico cuticolare e corticale aumenta progressivamente all'aumentare dei trattamenti di decolorazione subiti dalla ciocca, poiché il trattamento ossidante previsto dal processo di sbiancamento tende a trasformare le terminazioni tioliche presenti in prodotti ossidati come l'acido cisteico. Si è supposto quindi che a causa del severo deterioramento subito, la ciocca trattata successivamente con i diversi agenti ristrutturanti non ha mostrato significative differenze nel contenuto di residui cisteinici da quella che non ha subito questa seconda lavorazione.

In particolare, lo studio ha mostrato che il contenuto di acido cisteico nella regione corticale del capello diminuisce quando trattato con i prodotti commerciali Lunex Restore[®] e Olaplex[®]. Inoltre, quando il capello decolorato viene trattato con l'agente ricostruttore da noi ipotizzato come fra i più promettenti, lo Juglone, esso viene incorporato nella cuticola della fibra, come determinato dagli spettri IR.

Anche le analisi effettuate attraverso microscopia elettronica a scansione sul capello trattato hanno permesso di osservare l'azione del prodotto ricostruttore a livello cuticolare: infatti, se dal trattamento della ciocca con la sola miscela decolorante si possono osservare, quando presenti, squame rialzate e frastagliate, nel caso dei capelli trattati successivamente con agente ristrutturante le analisi hanno riportato dei risultati promettenti.

Il trattamento del capello deteriorato con diversi metodi con i prodotti commerciali Lunex Restore[®] ed Olaplex[®] ha apportato una maggiore embricatura alle squame della fibra, favorendo una struttura cuticolare più ordinata e liscia.

Si può quindi concludere che nonostante il meccanismo di interazione tra i componenti della fibra e il prodotto ricostruttore possa essere molto complesso e sebbene sia stato constatato che il trattamento di decolorazione ossidativa genera sulla superficie del capello principalmente acido cisteico, a seguito dello studio da noi effettuato sulla reattività di residui cisteinici con gli agenti attivi dei prodotti commerciali e con altri ipotetici ingredienti attivi, non si può escludere che il funzionamento dell'agente ristrutturante preveda il coinvolgimento della reazione di sulfa-Michael. Ulteriori approfondimenti su questo aspetto saranno effettuati in futuri studi.

5 Parte sperimentale

5.1 Note sperimentali

Gli spettri ^1H NMR e ^{13}C NMR sono stati registrati mediante spettrometri Varian Inova 300, Mercury 400 o Inova 600 (rispettivamente 300.0, 399.9 e 599.7 MHz per ^1H NMR e 75.4, 100.6 e 150.8 MHz per ^{13}C NMR) in CDCl_3 , CD_3OD , DMSO-d_6 , o $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$. I chemical shifts sono misurati in δ (ppm) e i valori delle costanti di accoppiamento sono dati in Hz.

La linea di riferimento è quella dei solventi $\delta = 7.26, 3.31, 2.49, 2.10$ ppm relativamente a ^1H NMR in CDCl_3 , CD_3OD , DMSO-d_6 , $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ e $\delta = 77.2, 49.2, 39.5$ e 30.2 ppm relativamente a ^{13}C NMR in CDCl_3 , CD_3OD , DMSO-d_6 , CD_3COCD_3 .

Gli spettri ESI-MS (elettronebulizzazione, electrospray) sono stati registrati con un apparecchio WATERS 2Q 4000.

La cromatografia su strato sottile (TLC) è stata eseguita usando gel di silice contenente indicatore fluorescente a 254 nm, supportato su fogli di alluminio, forniti dalla Fluka (DC-Alufolien-Kieselgel). I solventi e i reagenti utilizzati, dove non altrimenti specificato, sono prodotti commerciali provenienti da Aldrich o Fluka.

La caratterizzazione di alcuni prodotti è limitata al solo spettro ^1H NMR causa la limitata quantità di prodotto ottenuto. Inoltre la purificazione di alcuni prodotti è stata particolarmente difficoltosa e talvolta sono stati ottenuti in miscela con uno o entrambi i reagenti.

I valori di pH sono stati determinati mediante uno strumento AMEL Mod.2335 con elettrodo combinato Hamilton 3M HCl.

I prodotti utilizzati per i processi di decolorazione e lavaggio con shampoo sono commercializzati da Kemon S.p.A.

Gli spettri FT-Raman sono stati registrati con uno spettrometro Raman a trasformata di Fourier Bruker MultiRam munito di rivelatore al germanio e di eccitatrice a 1064 nm (laser Nd^{3+} -YAG). Gli spettri sono stati registrati usando una configurazione di backscattering (180°). Il diametro del raggio laser focalizzato è di circa 100 μm . Per registrare gli spettri, è stata utilizzata una potenza laser sul campione di circa 80 mW e una risoluzione spettrale di 4 cm^{-1} . Su ciascun campione sono stati registrati tre spettri in tre punti diversi della ciocca; gli spettri riportati sono spettri medi.

Come riportato da Kuzuhara in vari suoi studi [41], non è stato possibile registrare gli spettri FT-Raman dei capelli scuri poiché le melanine presenti in questo campione sono responsabili di un'elevata fluorescenza e quindi di un peggioramento dello spettro Raman. Per motivi analoghi non saranno discussi gli spettri dei capelli decolorati e trattati con juglone.

Il contenuto relativo in ponti disolfuro e acido cisteico dei vari campioni è stato valutato rispettivamente attraverso le bande Raman a circa 510-520 cm^{-1} [42] e a circa 1040 cm^{-1} [43].

Come standard interno, la prevalenza degli studi riportati in letteratura utilizza la banda a 1450 cm^{-1} (bending CH_2) [44], poiché è la più intensa; un'altra banda che viene comunemente usata come standard interno è quella della fenilalanina a 1004 cm^{-1} [45][46]. In questo studio sono state utilizzate entrambe le bande e quindi sono stati calcolati i rapporti Raman $\text{As-s}/\text{A1450}$, $\text{A1040}/\text{A1450}$, $\text{As-s}/\text{A1004}$ e $\text{A1040}/\text{A1004}$ dove As-s , A1040 , A1450 , A1004 sono rispettivamente le aree della banda assegnata ai ponti disolfuro (calcolata tracciando la linea di base tra 482 e 585 cm^{-1}), della banda dell'acido cisteico a circa 1040 cm^{-1} (calcolata tracciando la linea di base tra 1020 e 1070 cm^{-1}), della banda a 1450 cm^{-1} (calcolata tracciando la linea di base tra 1375 e 1500 cm^{-1}) e della banda a 1004 cm^{-1} (calcolata tracciando la linea di base tra 993 e 1013 cm^{-1}).

In base ai risultati ottenuti sui ponti disolfuro e sull'acido cisteico, il contenuto relativo in \checkmark -elica è stato valutato utilizzando come standard interno solo la banda a 1450 cm^{-1} ; quindi, è stato calcolato il rapporto Raman $\text{A935}/\text{A1450}$, dove A935 è l'area della banda a 935 cm^{-1} (calcolata tracciando la linea di base tra 912 e 951 cm^{-1}) assegnabile allo stretching C-C dello scheletro dell' α -elica, [47].

Gli spettri IR sono stati registrati con uno spettrometro a trasformata di Fourier Bruker Alpha munito di un accessorio ATR Smart Orbit con cristallo in diamante e un rivelatore DLATGS; la risoluzione spettrale è di 4 cm^{-1} .

Il contenuto relativo in acido cisteico dei vari campioni è stato valutato utilizzando le bande dell'acido cisteico a circa 1040 e 1175 cm^{-1} [48].

Come standard interno, gli studi riportati in letteratura utilizzano la banda a 1450 cm^{-1} (bending CH_2) [44][40] oppure la banda Amide III [49], [40]. La banda a 1450 cm^{-1} non è utilizzabile perché si sono osservate variazioni significative nelle intensità degli stretching CH (range non riportato) e inoltre in questo range cade una banda intensa dello juglone. L'utilizzo della banda Amide III è stato escluso in quanto si è visto che essa si

spostava in seguito alla decolorazione, a causa del probabile contributo di prodotti di ossidazione; lo stesso comportamento si è osservato anche per la banda Amide II. Pertanto, si è scelto di utilizzare la banda Amide I.

Quindi, in questo studio sono stati calcolati i rapporti I1040/IAmide I e I1175/IAmide I dove I1040, I1175 e IAmide I sono rispettivamente le assorbanze (misurate come altezze di picco) delle bande a circa 1040, 1175 cm^{-1} e dell'Amide I.

Sia gli spettri Raman che quelli IR sono stati registrati mantenendo costante l'orientazione dei capelli (gli spettri vibrazionali sono infatti sensibili all'orientazione delle fibre).

I campioni analizzati sono stati i seguenti:

- capelli scuri (solo IR);
- capelli decolorati tre volte ossia capelli scuri sottoposti tre volte al trattamento con miscela di Lunex Ultra Cream[®] e UniColor Oxi[®] (ciocca “controllo”);
- capelli decolorati tre volte sottoposti ad un'ulteriore decolorazione di 15 minuti con miscela di Lunex Ultra Cream[®] e UniColor Oxi[®] (campione 2.1);
- capelli decolorati tre volte sottoposti ad un'ulteriore decolorazione di 15 minuti con miscela di Lunex Ultra Cream[®] e UniColor Oxi[®] e sottoposti ad un ulteriore trattamento con la sola componente Lunex Ultra Cream[®] (campione 5.1);
- capelli decolorati tre volte sottoposti ad un'ulteriore decolorazione di 15 minuti con miscela di Lunex Ultra Cream[®] e UniColor Oxi[®] e sottoposti a trattamento ricostruttore Lunex Restore[®] (indicato anche come BCC, campione 2.5) ;
- capelli decolorati tre volte sottoposti ad un'ulteriore decolorazione di 15 minuti con miscela Lunex Ultra Cream[®] e UniColor Oxi[®] e sottoposti a trattamento ricostruttore Olaplex[®] (campione 2.4);
- capelli decolorati tre volte sottoposti ad un'ulteriore decolorazione di 15 minuti con miscela di Lunex Ultra Cream[®] e UniColor Oxi[®] e sottoposti a trattamento ricostruttore con acido shikimico (campione 2.3);
- capelli decolorati tre volte sottoposti ad un'ulteriore decolorazione di 15 minuti con miscela di Lunex Ultra Cream[®] e UniColor Oxi[®] e sottoposti a trattamento ricostruttore con dimetilmaleato (indicato anche come BCC, campione 2.6);
- capelli decolorati tre volte sottoposti ad un'ulteriore decolorazione di 15 minuti con miscela di Lunex Ultra Cream[®] e UniColor Oxi[®] e sottoposti a trattamento ricostruttore con juglone (campione 2.2, solo IR);

- capelli decolorati tre volte sottoposti ad un'ulteriore decolorazione di 15 minuti con miscela di Lunex Ultra Cream® e UniColor Oxi®, sottoposti ad un ulteriore trattamento con la sola componente Lunex Ultra Cream® ed infine sottoposti a trattamento ricostruttore con juglone (campione 5.2 solo IR).

Come riferimento, saranno riportati gli spettri IR dello juglone e dell'addotto tra *N*-acetil-*L*-cisteina e juglone.

Per quanto riguarda gli esperimenti condotti al SEM, sono stati analizzati campioni di capelli umani longitudinalmente. I campioni sono stati osservati tal quali tramite microscopio elettronico in scansione (SEM) modello Zeiss EVO 50 VP, utilizzando la modalità VP (pressione variabile) la quale consente di poter osservare campioni non conduttivi senza dover ricorrere alla loro metallizzazione tramite sputter di oro, preservandoli così da eventuali artefatti introdotti dal processo stesso. Le condizioni operative per tutti i campioni sono state le seguenti:

Tensione di accelerazione: 20 kV

Segnale rivelato: SE (elettroni secondari, specifico per la morfologia)

Valore della pressione in camera: 100 Pa.

5.2 Sintesi e caratterizzazione dei prodotti usati in sistemi modello

5.2.1 Sintesi di derivati di acidi mercapturici

In base alla solubilità dei reagenti in acqua e in metanolo, le reazioni di addizione di Michael sono state condotte secondo tre metodi, due di questi indicati in letteratura, dei quali di seguito viene descritta la procedura generale.

Metodo A [50]

In un pallone da 25 mL sono state introdotte quantità equimolari di accettore di Michael (1 mmol) e *N*-acetil-*L*-cisteina o il suo derivato estere metilico (1 mmol) in 10 mL di H₂O e la soluzione è stata agitata a temperatura ambiente fino a completamento della reazione, monitorata con TLC su silice.

Il grezzo di reazione è stato estratto con EtOAc (3x20 mL) per separare l'accettore di Michael non reagito dalla fase acquosa e quest'ultima, contenente cisteina non reagita e prodotto, portata a secco al rotavapor dopo aggiunta di silice.

La miscela così ottenuta è stata purificata su colonna di gel di silice, dove le miscele eluenti utilizzate sono state ottimizzate per ogni tipo di accettore di Michael.

Metodo B [20]

In un pallone da 25 mL è stato sciolto un accettore di Michael (2.5 mmol) sciolto in 10 mL di CH₃OH a cui è stata aggiunta *N*-acetil-*L*-cisteina o il suo derivato estere metilico (1 mmol) sciolta in 2 mL di H₂O. Dopo completamento della reazione, monitorata con TLC, al grezzo di reazione sono stati aggiunti 5 mL di H₂O e la miscela ha poi subito estrazione con EtOAc (3x20 mL).

Si è evaporato il solvente e si è proceduto a purificazione su colonna di gel di silice; le miscele eluenti utilizzate sono state ottimizzate per ogni tipo di accettore di Michael.

Metodo C

In un pallone da 25 mL sono stati sciolti un accettore di Michael (2.5 mmol) e *N*-acetil-*L*-cisteina o il suo derivato estere metilico (1 mmol) in 10 mL di CH₃OH.

Dopo completamento della reazione, il cui andamento è stato monitorato mediante TLC, il solvente è stato fatto evaporare sotto vuoto e si è proceduto alla purificazione del grezzo attraverso cromatografia in colonna su gel di silice; le miscele eluenti utilizzate sono state ottimizzate per ogni tipo di accettore di Michael.

Metilazione *N*-acetil-*L*-cisteina [51]

A una soluzione di *N*-acetil-*L*-cisteina (6.1 mmol) sciolta in 10 mL di CH₃OH è stato lentamente aggiunto tionilcloruro (6,8 mmol). La miscela di reazione è stata lasciata in agitazione per 1 h a 0 °C, poi a temperatura ambiente per le seguenti 2 h. Il solvente è stato quindi rimosso in vuoto e 5 mL di H₂O sono stati aggiunti al residuo risultante. La soluzione è stata lavata con una soluzione satura di NaHCO₃ e poi estratta con EtOAc (3x 5 mL) e la fase organica asciugata in MgSO₄ anidro, filtrata e concentrata in vuoto per ottenere *N*-acetil-*L*-cisteina metil estere come solido giallo, in accordo con la letteratura.

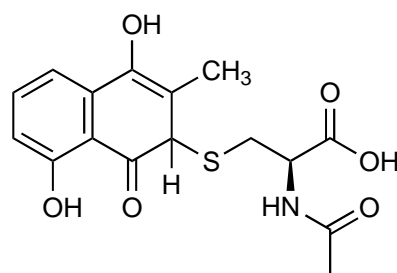
¹H-NMR: (CD₃OD, 400 MHz, 25 °C): miscela 63:37 di isomeri, ove possibile è stato indicato come maj. il più abbondante e come min. l'opposto):

δ, ppm: 7.67 (t, *J* = 8.4 Hz, 1 H, min), 7.61 (t, *J* = 7.75 Hz, 1 H, maj.), 7.58 (t, *J* = 7.52 Hz, 1 H, maj), 7.54 (dd, *J* = 7.6 Hz, *J* = 1.2 Hz, 1 H, min), 7.25 (dd, *J* = 8.0 Hz, *J* = 1.4 Hz, 1 H, maj.), 7.22 (dd, *J* = 8.4 Hz, *J* = 1.2 Hz, 1 H, min), 6.85 (s, 1 H, maj + min), 4.66-4.59 (m, 1H, CHN, maj + min), 3.49 (dd, *J* = 13.2 Hz, *J* = 4.5 Hz, 1 H, maj + min), 3.24 (d, *J* = 12.9 Hz, *J* = 7.4 Hz, 1 H, maj), 3.23 (d, *J* = 13.1 Hz, *J* = 7.6 Hz, 1 H, min), 2.001 (s, 3 H, maj), 1.998 (s, 3 H, min).

¹³C-NMR: (CD₃OD, 100 MHz, 25 °C, rif: 49.2 ppm): δ, ppm: 188.5 (q), 182.8 (q, maj), 182.5 (q, min), 176.1 (q), , 173.4 (q), 162.7 (q), 157,8 (q, maj), 156.3 (q, min), 133.8 (q, min), 133.5 (q, maj), 116.3 (q, min), 116.0 (q, maj), 138.3 (CH, min), 139.9 (CH, maj), 129.2 (CH, min), 128.2 (CH, maj), 125.8 (CH, maj), 124.7 (CH, min), 120.5 (CH, maj), 120.1 (CH, min), 56.3 (CH, maj + min), 34.78 (CH₂, maj), 34.72 (CH₂, min), 22.9 (CH, maj + min).

ESI-MS (ESI⁻) , m/z: 334 (M-H)⁻

Reazione fra N-acetil-L-cisteina e plumbagina

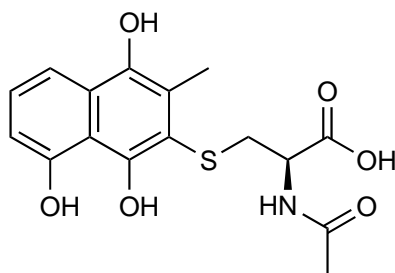


A

Schema 5.3: N-acetyl-S-(4,8-dihydroxy-3-methyl-1-oxo-1,2-dihydronaphthalen-2-yl)-L-cysteine (A)

prodotto maggioritario formatosi inizialmente fra **I** e plumbagina

¹H-NMR: (CD₃OD, 600 MHz, 25 °C): δ, ppm: 7.55 (d, *J* = 7.7 Hz, 1 H, min), 7.19 (dd, *J* = 8.35 Hz, *J* = 7.50 Hz, 1 H), 6.63 (dd, *J* = 7.6 Hz, *J* = 0.9 Hz, 1 H), 6.49 (s, 1 H), 4.63 (dd, *J* = 7.7 Hz, *J* = 4.4 Hz, 1 H), 3.77 (dd, *J* = 14.3 Hz, *J* = 4.5 Hz, 1 H), 3.47 (dd, *J* = 14.3 Hz, *J* = 7.8 Hz, 1 H), 2.34 (s, 3 H), 1.86 (s, 3 H).

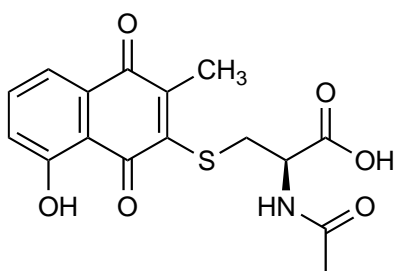


3c

Schema 5.4: *N*-acetyl-*S*-(1,4,8-trihydroxy-3-methylnaphthalen-2-yl)-*L*-cysteine (3c)

prodotto minoritario formatosi fra **1** e plumbagina, poi col tempo diventato maggioritario

¹H-NMR: (CD₃OD, 600 MHz, 25 °C): δ, ppm: 7.61 (dd, *J* = 8.4 Hz, *J* = 0.9 Hz, 1 H), 7.26 (dd, *J* = 8.4 Hz, *J* = 7.6 Hz, 1 H), 6.73 (dd, *J* = 7.6 Hz, *J* = 0.9 Hz, 1 H), 4.44 (dd, *J* = 8.3 Hz, *J* = 4.5 Hz, 1 H), 3.32 (dd, *J* = 14.0 Hz, *J* = 4.4 Hz, 1 H), 3.11 (dd, *J* = 13.8 Hz, *J* = 8.0 Hz, 1 H), 2.53 (s, 3 H), 1.89 (s, 3 H).



3c'

Schema 5.5: *N*-acetyl-*S*-(8-hydroxy-3-methyl-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-yl)-*L*-cysteine (3c')

¹H-NMR: (CD₃OD, 600 MHz, 25 °C): δ, ppm: 7.67-7.57 (m, 2 H, segnali sovrapposti con quelli di **3c**), 7.28-7.23 (m, 1 H, segnali sovrapposti con quelli di **3c**), 4.64 (dd, *J* = 7.9 Hz, *J* = 4.5 Hz, 1 H), 3.77 (dd, *J* = 14.5 Hz, *J* = 7.6 Hz, 1 H), 3.47 (dd, *J* = 14.2 Hz, *J* = 8.0 Hz, 1 H), 2.34 (s, 3 H), 1.86 (s, 3 H).

¹³C NMR: (CD₃OD, 150 MHz, 25 °C): δ, ppm (segnali di **3c** e **3c'**): 187.8 (CO), 183.1 (CO), 173.96 (CO), 173.45 (CO), 173.36 (CO), 173.19 (CO), 162.9 (q), 155.1 (q), 151.7 (q), 151.1 (q), 145.8 (q), 143.9 (q), 137.6 (CH), 133.8 (q), 130.9 (q), 128.2 (CH), 127.2 (q), 124.9 (CH), 124.7 (q), 120.4 (CH), 116.9 (q), 115.0 (CH), 114.7 (q), 114.0 (q), 110.1 (CH), 55.0 (CH), 54.3 (CH), 37.3 (CH₂), 36.5 (CH₂), 22.52 (CH₃), 22.47 (CH₃), 16.1 (CH₃), 15.1 (CH₃).

ESI-MS: (ESI⁻), *m/z*: 350 (3c, M-H)⁻, 348 (3c', M-H)⁻

¹H-NMR: (CD₃OD, 400 MHz, 25 °C): δ, ppm: diastereoisomero A: 4.48 (dd, *J* = 8.1 Hz, *J* = 4.2 Hz, 1 H), 3.77 (dd, *J* = 10.0 Hz, *J* = 6.4 Hz, 1 H), 3.734 (s, 3 H, OCH₃), 3.670 (s, 3 H, OCH₃), 3.27 (dd, *J* = 13.9 Hz, *J* = 4.23 Hz, 1 H), 3.06 (dd, *J* = 13.4 Hz, *J* = 7.3 Hz, 1 H), 2.91 (dd, *J* = 16.7 Hz, *J* = 10.2 Hz, 1 H), 2.76 (dd, *J* = 14.4 Hz, *J* = 5.2 Hz, 1 H), 2.010 (s, 3 H).

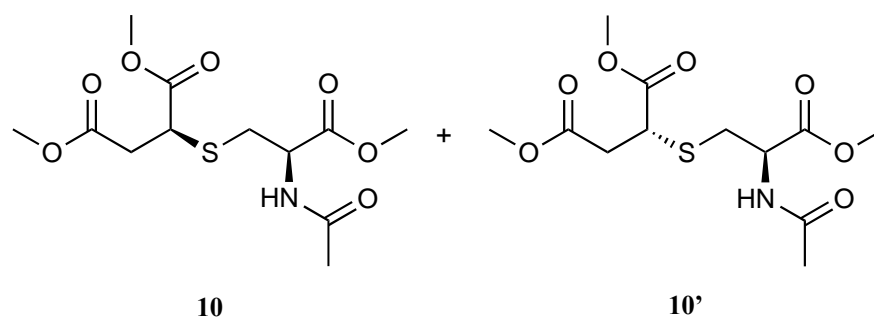
¹³C-NMR: (CD₃OD, 100 MHz, 25 °C, rif: 49.2 ppm): δ, ppm: diastereoisomero A: 177.1, 174.3, 173.2, 173.02, 55.87 (CH), 53.15 (OCH₃), 52.65 (OCH₃), 43.6 (CH), 37.3 (CH₂), 35.7 (CH₂), 22.98 (CH₃CO).

¹H-NMR: (CD₃OD, 400 MHz, 25 °C): δ, ppm: diastereoisomero B: 4.44 (dd, *J* = 7.1 Hz, *J* = 4.6 Hz, 1 H), 3.76 (dd, *J* = 9.9 Hz, *J* = 5.4 Hz, 1 H), 3.729 (s, 3 H, OCH₃), 3.666 (s, 3 H, OCH₃), 3.21 (dd, *J* = 13.4 Hz, *J* = 4.4 Hz, 1 H), 2.94 (dd, *J* = 13.6 Hz, *J* = 5.4 Hz, 1 H), 2.90 (dd, *J* = 9.7 Hz, *J* = 9.7 Hz, 1 H), 2.72 (dd, *J* = 14.6 Hz, *J* = 5.6 Hz, 1 H), 2.005 (s, 3 H).

¹³C-NMR: (CD₃OD, 100 MHz, 25 °C, rif: 49.2 ppm): δ, ppm: diastereoisomero B: 177.0, 174.2, 173.04, 173.0, 55.89 (CH), 53.19 (OCH₃), 52.64 (OCH₃), 42.8 (CH), 37.6 (CH₂), 35.8 (CH₂), 23.00 (CH₃CO).

ESI-MS (ESI⁺), m/z: 330 (M + Na)⁺

ESI-MS (ESI⁻), m/z: 306 (M - H)⁻.



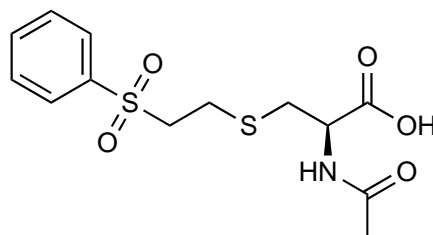
Schema 5.9: Dimethyl (*R*)-2-(((*R*)-2-acetamido-3-methoxy-3-oxopropyl)thio)succinate (**10**) e dimethyl (*S*)-2-(((*R*)-2-acetamido-3-methoxy-3-oxopropyl)thio)succinate (**10'**)

¹H-NMR: (CD₃OD, 300 MHz, 25 °C): δ, ppm: 2 diastereoisomeri A e B: 4.75-4.61 (m, 1+1 H, A+B), 3.84-3.71 (m, 1+1 H, A+B, sovrapposto ai segnali metossilici), 3.75 (s, 3+3 H, OCH₃, A+B), 3.74 (s, 3+3 H, OCH₃, A+B), 3.68 (s, 3+3 H, OCH₃, A+B), 3.26-3.09 (m, 1+1 H, A+B), 3.09-2.86 (m, 2+2 H, A+B), 2.77-2.63 (m, 1+1 H, A+B), 2.00 (s, 3 H, A o B), 1.99 (s, 3 H, A o B).

¹³C-NMR: (CD₃OD, 150,8 MHz, 25 °C, rif: 49.2 ppm): 2 diastereoisomeri A e B: 173.85, 173.84, 173.5, 172.79, 172.23, 172.48, 172.46 (q), 54.12 (CH), 53.42, 53.27, 53.21, 53.20, 53.17, 52.67 (CH₃), 43.62, 42.81 (CH), 37.40, 37.08, 34.42, 34.23 (CH₂), 22.51, 22.49 (CH₃).

ESI-MS (ESI⁺), m/z: 322 (M + H)⁺, 344 (M + Na)⁺, 360 (M + K)⁺.

5.2.4 Fenilvinilsolfone



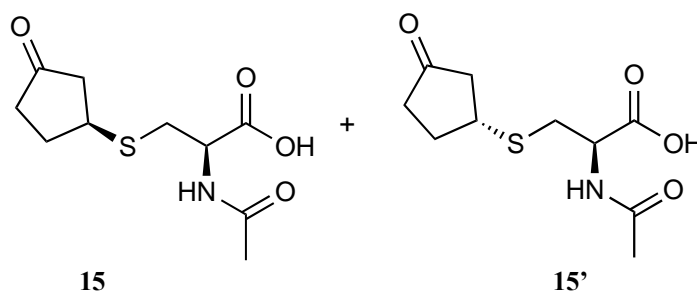
13

Schema 5.10: *N*-acetyl-*S*-(2-(phenylsulfonyl)ethyl)-*L*-cysteine (13)

¹H-NMR: (CD₃OD, 400 MHz, 25 °C): δ, ppm: 7.96-7.92 (m, 2 H), 7.74 (tt, *J* = 7.5 Hz, *J* = 1.2 Hz, 1 H), 7.65 (tt, *J* = 8.2 Hz, *J* = 1.2 Hz, 1 H), 4.36 (dd, *J* = 7.6 Hz, *J* = 4.5 Hz, 1 H), 3.61-3.42 (m, 2 H), 3.05 (dd, *J* = 13.9 Hz, *J* = 4.3 Hz, 1 H), 2.85-2.76 (m, 3 H), 1.97 (s, 3 H).

¹³C-NMR: (CD₃OD, 100 MHz, 25 °C, rif: 49.2 ppm): δ, ppm: 177.9, 173.2, 140.5, 135.4 (CH), 130.8 (CH), 129.4 (CH), 57.3 (CH₂), 55.9 (CH), 35.8 (CH₂), 25.9 (CH₂), 23.0 (CH₃).

5.2.5 Chetoni ed esteri α-β insaturi



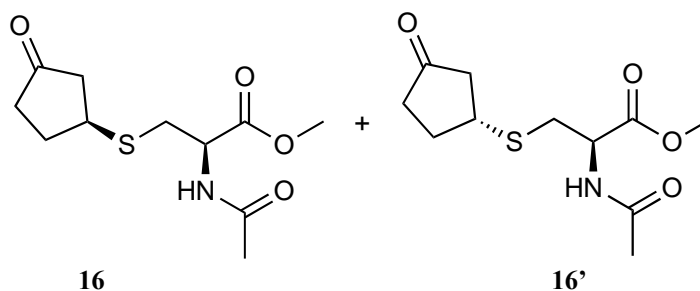
15

15'

Schema 5.11: *N*-acetyl-*S*-((*S*)-3-oxocyclopentyl)-*L*-cysteine (15) e *N*-acetyl-*S*-((*R*)-3-oxocyclopentyl)-*L*-cysteine (15')

¹H-NMR: (CD₃OD, 300 MHz, 25 °C): δ, ppm, 2 diastereoisomeri: 4.43 (dd, *J* = 7.5 Hz, *J* = 4.6 Hz, 1 H), 3.69-3.55 (m, 1 H), 3.16-3.04 (m, 1 H), 2.98-2.84 (m, 1 H), 2.66 (dd, *J* = 18.5 Hz, *J* = 7.4 Hz, 0.5 H), 2.46-2.06 (m, 3.5 H), 2.01 (s, 3 H), 2.08-1.84 (m, 2H).

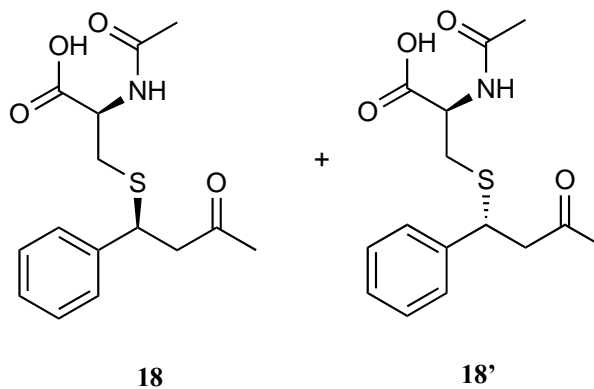
^{13}C -NMR: (CD_3OD , 100 MHz, 25 °C, rif: 49.2 ppm): δ , ppm: 219.00, 219.02, 173.4, 173.2, 54.0 (CH), 53.9 (CH), 46.8 (CH_2 , 2 segnali sovrapp.), 42.1 (CH), 42.0 (CH), 37.9 (CH_2), 37.8 (CH_2), 33.8 (CH_2), 33.7 (CH_2), 30.9 (CH_2), 30.8 (CH_2), 22.9 (CH_3), 22.8 (CH_3).



Schema 5.12: Methyl *N*-acetyl-*S*-((*S*)-3-oxocyclopentyl)-*L*-cysteinate (**16**) e methyl *N*-acetyl-*S*-((*R*)-3-oxocyclopentyl)-*L*-cysteinate (**16'**)

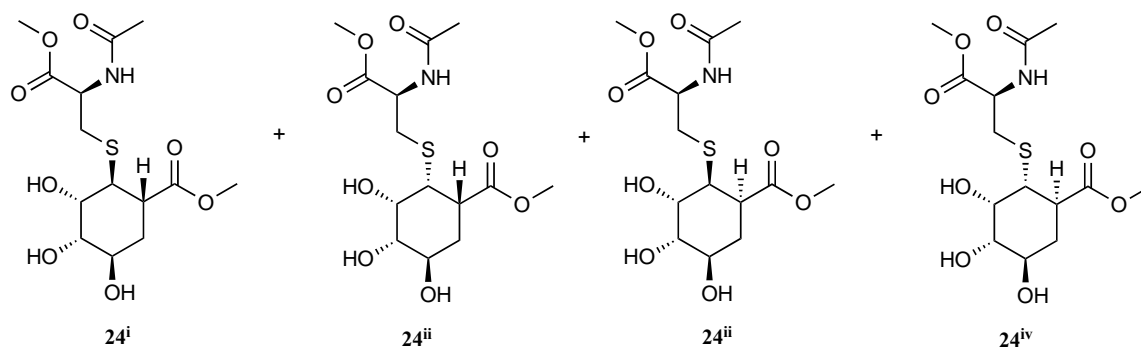
^1H -NMR: (CD_3OD , 300 MHz, 25 °C): δ , ppm, 2 diastereoisomeri: 4.39 (dd, $J = 8.2$ Hz, $J = 5.4$ Hz, 1 H), 3.48 (s, 3 H), 3.00-2.88 (m, 1 H), 2.88-2.74 (m, 1 H), 2.74-2.50 (m, 1 H), 2.50-2.30 (m, 1 H), 2.21-1.79 (m, 3 H), 1.74 (s, 3 H), 1.80-1.36 (m, 2 H).

Prodotti noti in letteratura [52].



Schema 5.13: *N*-Acetyl-*S*-((*S*)-3-oxo-1-phenylbutyl)-*L*-cysteine (**18**) e *N*-acetyl-*S*-((*R*)-3-oxo-1-phenylbutyl)-*L*-cysteine (**18'**)

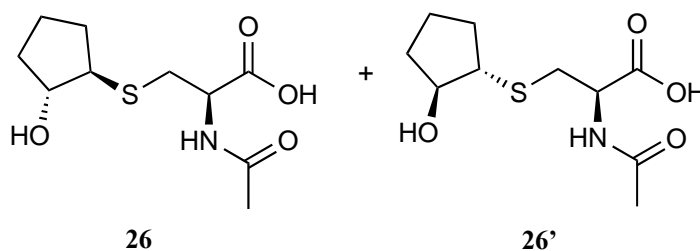
^1H -NMR: (CD_3OD , 600 MHz, 25 °C): δ , ppm, 2 diastereoisomeri, tentativamente attribuiti: 7.37-7.34 (m, 1 H), 7.32-7.27 (m, 2 H), 7.26-7.17 (m, 2 H), .42-4.33 (m, 1H), 3.07-2.99 (m, 2H), 2.83-2.66 (m. 2 H), 2.21 (d, $J = 9.9$ Hz, 2 H), 1.96 (s, 3 H).



Schema 5.16: *N*-(methoxycarbonyl)-*S*-((1*S*,2*S*,3*S*,4*R*,6*S*)-2,3,4-trihydroxy-6-(methoxycarbonyl)cyclohexyl)-*L*-cysteine (**24ⁱ**), e *N*-(methoxycarbonyl)-*S*-((1*S*,2*S*,3*S*,4*R*,6*R*)-2,3,4-trihydroxy-6-(methoxycarbonyl)cyclohexyl)-*L*-cysteine (**24ⁱⁱ**), *N*-(methoxycarbonyl)-*S*-((1*R*,2*S*,3*S*,4*R*,6*R*)-2,3,4-trihydroxy-6-(methoxycarbonyl)cyclohexyl)-*L*-cysteine (**24ⁱⁱⁱ**) e *N*-(methoxycarbonyl)-*S*-((1*R*,2*S*,3*S*,4*R*,6*S*)-2,3,4-trihydroxy-6-(methoxycarbonyl)cyclohexyl)-*L*-cysteine (**24^{iv}**)

¹H-NMR: (CD₃OD, 300 MHz, 25 °C): δ, ppm, 2 diastereoisomeri, tentativamente attribuiti: 4.35-4.22 (m, 1 H), 4.16-3.82 (m, 2 H), 3.71 (s, 3 H, OCH₃), 3.68 e 3.67 (s, 3 H, OCH₃), 3.59-3.45 (m, 1 H), 3.11-2.63 (m, 4 H), 2.23-1.89 (2 H), 1.97 (s, 3 H).

5.2.6 Ossido di ciclopentene



Schema 5.17: *N*-acetyl-*S*-((1*S*,2*S*)-2-hydroxycyclopentyl)-*L*-cysteine (**26**) e *N*-acetyl-*S*-((1*R*,2*R*)-2-hydroxycyclopentyl)-*L*-cysteine (**26'**)

¹H-NMR: (CD₃OD, 300 MHz, 25 °C): δ, ppm, 2 diastereoisomeri: 4.70-4.59 (m, 1 H), 4.06-3.93 (m, 1 H), 3.75 (s, 3 H, OCH₃), 3.25-2.77 (m, 4 H), 2.25-2.08 (m, 1 H), 2.00 (s, 3 H), 1.87-1.38 (m, 4 H).

5.3 Preparazione dei campioni per analisi RAMAN, IR e SEM

Partendo da una ciocca di 10 g precedentemente sbiancata attraverso tre trattamenti consecutivi con una miscela di prodotti commerciali Lunex Ultra Cream[®] e UniColor Oxi[®] (1,3:1), sono state ricavate numerose ciocche, ognuna con un peso di circa 0,35 g, e su di queste sono stati eseguiti ulteriori trattamenti che sono stati suddivisi per lotti, a seconda del tipo di trattamento eseguito.

La ciocca decolorata per tre volte consecutive è nominata “ciocca controllo”.

A seguito del trattamento di decolorazione o riduzione, ogni ciocca di ciascun lotto è stata trattata con un differente tipo di prodotto ricostruttore.

5.3.1 Lotto 1

Cinque ciocche “controllo” asciutte di 0,35 g ciascuna sono state decolorate attraverso un trattamento alcalino ossidativo, applicando su ogni ciocca una miscela di due prodotti:

14 g di Lunex Ultra Cream® e UniColor Oxi®.

10,5 g di UniColor Oxi® 40 vol.

le ciocche sono state avvolte in foglio di alluminio e tenute in forno a 35°C per 45 minuti.

Dopo aver lavato le ciocche con shampoo, ognuna è stata immersa in una diversa soluzione di prodotto ricostruttore.

Poiché in genere l'applicazione dei prodotti ricostruttori commerciali viene effettuata unendo alla miscela decolorante il prodotto ricostruttore (Olaplex® o Lunex Restore®), in questo lotto si è deciso di seguire questo procedimento e quindi, in questo caso, per due delle quattro ciocche trattate non è stato necessario effettuare lo step di immersione in soluzione di prodotto ricostruttore.

campione 1.1: non immerso in soluzione ristrutturante (bianco)

campione 1.2: immerso in una soluzione di juglone 5% mol/mol in CH₃OH

campione 1.3: immerso in una soluzione di acido shikimico 5% mol/mol in CH₃OH

campione 1.4: trattato con Olaplex® in miscela decolorante

campione 1.5: trattato con Lunex Restore® in miscela decolorante

Dopo un tempo di immersione di 45 minuti le ciocche sono state lavate con shampoo ed asciugate.

Le soluzioni di juglone ed acido shikimico al 5% mol/mol preparate in laboratorio sono state prodotte sciogliendo rispettivamente 0,0865 g e 0,0875 g di reagenti ognuno in 10 mL di metanolo.

5.3.2 Lotto 2

Cinque ciocche “controllo” asciutte di 0,35 g ciascuna sono state decolorate attraverso un trattamento alcalino ossidativo, applicando su ogni ciocca una miscela di due prodotti:

14 g di Lunex Ultra Cream®

10,5 g di UniColor Oxi®40 vol.

le ciocche sono state avvolte in foglio di alluminio e tenute in forno a 35°C per 15 minuti.

Dopo aver lavato le ciocche con shampoo, ognuna è stata immersa in una diversa soluzione di prodotto ricostruttore. In questo caso, poiché si è deciso di ridurre il tempo di posa della miscela decolorante a 15 minuti, non è stato possibile seguire la procedura usuale, quindi in questo lotto tutte le ciocche hanno subito immersione nelle rispettive soluzioni di prodotti ristrutturanti.

Le soluzioni di juglone ed acido shikimico al 5% preparate in laboratorio sono state prodotte sciogliendo rispettivamente xg ed xg di reagenti ognuno in in 10 mL di metanolo.

campione 2.1: non immerso in soluzione ristrutturante (bianco)

campione 2.2: immerso in una soluzione di juglone 5% mol/mol in CH₃OH

campione 2.3: immerso in una soluzione di acido shikimico 5% mol/mol in CH₃OH

campione 2.4: immerso in Olaplex[®]

campione 2.5: immerso in Lunex Restore[®]

Dopo un tempo di immersione di 45 minuti le ciocche sono state lavate con shampoo ed asciugate.

Le soluzioni di juglone ed acido shikimico al 5% mol/mol preparate in laboratorio sono state prodotte sciogliendo rispettivamente 0,0865 g e 0,0875 g di reagenti ognuno in in 10 mL di metanolo.

5.3.3 Lotto 3

Cinque ciocche “controllo” asciutte di 0,35 g ciascuna sono state trattate ognuna con un differente prodotto ristrutturante:

campione 3.1: non immerso in soluzione ristrutturante (bianco, cioè ciocca “controllo”)

campione 3.2: immerso in una soluzione di juglone 5% mol/mol in CH₃OH

campione 3.3: immerso in una soluzione di acido shikimico 5% mol/mol in CH₃OH

campione 3.4: immerso in Olaplex[®]

campione 3.5: immerso in Lunex Restore[®]

Dopo un tempo di immersione di 45 minuti le ciocche sono state lavate con shampoo ed asciugate.

Le soluzioni di juglone ed acido shikimico al 5% mol/mol preparate in laboratorio sono state prodotte sciogliendo rispettivamente 0,0865 g e 0,0875 g di reagenti ognuno in in 10 mL di metanolo.

5.3.4 Lotto 4

Volendo tentare di imitare le condizioni di stiratura del capello, cinque ciocche “controllo” asciutte di 0,35 g ciascuna sono state trattate prima con una soluzione basica, immergendole in x (quale base, concentrazione) a $\text{pH} \approx 9$ per 5 minuti, e successivamente in una soluzione di NaHSO_3 a $\text{pH} \approx$ per ulteriori 5 minuti.

Le ciocche così trattate sono state lavate in acqua ed immerse ognuna in una differente soluzione di prodotto ristrutturante:

campione 4.1: non immerso in soluzione ricostruttore (bianco, in questo caso ciocca “controllo”)

campione 4.2: immerso in una soluzione di juglone 5% mol/mol in CH_3OH

campione 4.3: immerso in una soluzione di acido shikimico 5% mol/mol in CH_3OH

campione 4.4: immerso in Olaplex[®]

campione 4.5: immerso in Lunex Restore[®]

Dopo un tempo di immersione di 45 minuti le ciocche sono state lavate con shampoo ed asciugate.

Le soluzioni di juglone ed acido shikimico al 5% mol/mol preparate in laboratorio sono state prodotte sciogliendo rispettivamente 0,0865 g e 0,0875 g di reagenti ognuno in in 10 mL di metanolo.

5.3.5 Lotto 5

Tre ciocche “controllo” asciutte di 0,35 g ciascuna sono state trattate applicando su ogni ciocca 14 g di Lunex Ultra Cream[®]; le ciocche sono state avvolte in foglio di alluminio e tenute in forno a 35°C per 15 minuti.

Dopo aver lavato le ciocche con shampoo, ognuna è stata immersa in una diversa soluzione di prodotto ricostruttore.

Campione 5.1: non immerso in soluzione di ricostruttore

campione 5.2: immerso in una soluzione di juglone 5% mol/mol in CH_3OH

campione 5.3: immerso in una soluzione di dimetilmaleato 5% mol/mol in CH_3OH

Dopo un tempo di immersione di 45 minuti le ciocche sono state lavate con shampoo ed asciugate.

Le soluzioni di juglone e dimetilmaleato al 5% mol/mol preparate in laboratorio sono state prodotte sciogliendo rispettivamente 0,0865 g e 0,036 g di reagenti ognuno in in 10 mL di metanolo.

6 Bibliografia

- [1] Nocentini P., ed. Graphos, Città di Castello, 1982, p. 1.
- [2] Sito web www.bionike.it.
- [3] Robbins C. R., ed. Springer, Berlin, 2012, p. 388 e referenze ivi citate.
- [4] Wilkerson V., (1935-1936) *J Biol Chem*, 112:329 – 335.
- [5] Zviak C. ed. Masson, New York, 1987, p. 7-10 e referenze ivi citate.
- [6] Mearelli F., Giogli A., Aboca, Sansepolcro, 1999, p. 20.
- [7] Robbins C. R., ed. Springer, Berlin, 2012, p. 147-149 e referenze ivi citate.
- [8] Robbins C. R., “ed. Springer, Berlin, 2012, p. 221 e referenze ivi citate.
- [9] Boga C., Taddei P., Micheletti G., Ascari F., Ballarin B., Morigi M., Galli S., *Int. J. Cosm. Sci.*, 2014, 36, 459-470.
- [10] Taddei P., Boga C., Micheletti G., Ballarin B., Article first published online: 18 NOV 2014 | DOI: 10.1002/jrs.4613; *J. Raman Spectrosc.*, vol. 46, Issue 1, p. 100-108.
- [11] Boga C., Zani P., Micheletti G., Ballarin B., Cino S., Monographic supplement series: *Hair care – H&PC Today – Household and personal care today*, Vol. 10(2) –March/April 2015, p. X – XIV.
- [12] Zviak C., ed. Masson, New York, 1987, p. 214 e referenze ivi citate.
- [13] Robbins, C. R. ed. Springer, Berlin, 2012, p.117 e referenze ivi citate.
- [14] Robbins, C. R. ed. Springer, Berlin, 2012, p. 233 e referenze ivi citate.
- [15] Inbaraj J.J., Chignell C. F., *Chem. Res. Toxicol.* 2004, 17, 55-62.
- [16] Pressly E. D.; Hawker C. J, Feb. 5, 2015, WO2015017768 (A1)
- [17] Pressly E. D.; Hawker C. J.; Nov. 19, 2015, US2015328102 (A1)
- [18] Pressly E. D.; Hawker C. Feb. 5, JUS2015/0034119 (A1)
- [19] Nair P. D., Podgórski M., Chatani S., Gong T., Xi W., Fenoli R. C., Bowman N. C. *Chem. Mater.* 2014, 26, p. 724-744.
- [20] Hanzlik R. P., Weller P. E., Desai J., Zheng J., Hall L. R., Slaughter Do. E., *J. Org. Chem.*, 1990, 55 (9), pp 2736–2742
- [21] Hirakawa, K; Ogiue, E; Motoyoshiya, J; Yajima, M., *Phytochemistry* (Elsevier), 1986, vol. 25, # 6, p. 1494 – 1495
- [22] Sabutskii Yu.E.; Polonik N.S.; Denisenko V.A.; Dmitrenok P.S.; Polonik S.G., *Russ. J. Organ. Chem.*, 2013, Vol 49, 8.
-

-
- [23]Dinda; Das; Hajra; Bhattacharya; De; Chel; Achari, *Indian Journal of Chemistry - Section B Organic and Medicinal Chemistry*, 1999, vol. 38, 5, p. 577 – 582
- [24]Saul Patai, "The Chemistry of the quinonoid compounds" pt. 1 and 2, John Wiley, London, 1974.
- [25]Hussain, Sahid; Bharadwaj, Saitanya K.; Chaudhuri, Mihir K.; Kalita, Harjyoti, *Eur. J. Org. Chem.*, 2007, # 2 p. 374 - 378
- [26]Thomas J. Schmidt, Muharrem Aka, Ulrich Mrowietz, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 15, 2007, 333–342
- [27]Shourong Liu, Yanmei Zhao, Ruoyu He, Limin Kong, Jianjun Xi, Jingjing Sun, Yidan Shao, Xuwang Pan, Jiankang Zhang, Rangxiao Zhuang, *Med. Chem. Commun.*, 2017, 8, 2238-2247
- [28]Boga C., Fiume L., Baglioni M., Bertucci C., Farina C., Kratz F., Manerba M., Naldi M., Di Stefano G., *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2009, 38, 262–269
- [29] Jamie F. Bickley, Alessandra Ciucci, Paul Evans, Stanley M. Roberts, Nicolette Ross, Gabriella Santoro, *Bioorg. Med. Chem.* 12, 2004, 3221-3227
- [30]Kuzuhara A., Hori T., *Polymer*, 44, 2003, 7963–7970
- [31]Fraser RDB, Macrae TP, Rogers GE. *Nature* 1962;193:1052–5
- [32]Church J. S.; Corino G. L.; Woodhead A. L., *Biopolymers*, 1997, 42, 7–17
- [33]Kuzuhara A., Hori T., *Biopolymers*, 79, 2005, 324-334
- [34]Akhtar W., Edwards H.G.M., Farwell D.W., Nutbrown M., *Spectrochim Acta Part A* 53, 1997, 1021-1031.
- [35]Robbins C. R., Springer-Verlag: New York/Berlin/Heidelberg, 1988; 2nd ed.. Fraser, R. D. B.
- [36]MacRae T. P., Sparrow L. G, Parry D. A., *D.Int J Biol Macromol* 1988, 10, 106–112.
- [37]Taddei P., Tsukada M., Freddi G., *Journal of Raman Spectroscopy* DOI 10.1002/jrs.4168.
- [38]Koenig J. L., Sutton J. L., *Biopolymers* 1971, 10, 89
- [39]Gupta A., Tandon A., Gupta V. D., Rastogi S., *Polymer* 1997, 38, 2389.
- [40]Signori V., Lewis D.M. *International Journal of Cosmetic Science* 1997, 19, 1-13.
- [41]Kuzuhara A., *Biopolymers*, 2005, Vol. 77, 335–344.
- [42]Tu A.T., *Raman Spectroscopy in Biology: Principles and Applications*, John Wiley, New York, 1982 .
- [43]Kuzuhara A., *Biopolymers* 2006, 81, 506-514.
-

6. Bibliografia

- [44] Strassburger, J. J. *Soc. Cosmet. Chem* 1985, 36, 61-74 .
- [45] Kuzuhara A., *Biopolymers* 2005, 79, 173–184
- [46] Rintoul, L.; Carter, E. A.; Stewart, S. D.; Fredericks, P. M. *Biopolymers* 2000, 57, 19–28.
- [47] Frushour B. G., Koenig J. L., *Biopolymers* 1975, 14, 2115.
- [48] Carter E. A., Fredericks P.M., Church J.S., Denning R.J., *Spectrochim Acta A* 11 , 1994, 1927-1936
- [49] Joy M., and Lewis D.M., *Int. J. Cosmet. Sci.*, 1991, 13, 24941.
- [50] Yadav J.S., Swamy T., Subba B.V., Reddy D., Krishna R., *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 274, 2007, 116–119
- [51] Wesley G. D. P. Silva, Carolyne B. Braga, Roberto Rittner, *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 2017, vol. 13, p. 925 - 937
- [52] Daniel Nicponski, Jennifer M., *MarchiSynthesis* 2014, 46, 1725–1730.
-