

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA

IN DERMATOLOGIA SPERIMENTALE

(XX CICLO 2004-2007)

Coordinatore: PROF. FABIO AYALA

ANALISI E PROPRIETA' STRUTTURALI

DI PIGMENTI MELANICI:

ACIDI BENZOTIAZOLICI/TIAZOLICI

COME *MARKERS* DI FOTOSENSIBILITA'

Candidato

DOTT. LUCIA PANZELLA

Tutore

PROF. GIUSEPPE MONFRECOLA

1. INTRODUZIONE

Negli ultimi anni l'interesse verso l'analisi e l'esame delle proprietà strutturali dei pigmenti melanici è notevolmente cresciuto in relazione allo studio della pigmentazione umana e degli stati patologici ad essa associati. Ciò è particolarmente vero nel caso delle feomelanine, che sono state oggetto di crescente attenzione in relazione all'ipotesi che esse svolgano un ruolo importante nella suscettibilità degli individui di carnagione chiara al danno attinico e ai tumori cutanei.¹ Notevole impulso allo studio delle feomelanine è stato dato anche dalla scoperta che alcune mutazioni del gene che codifica per il recettore 1 della melanocortina (MC1R) sono associate al fenotipo feomelanico.^{2,3}

Le feomelanine sono i pigmenti caratteristici degli individui dai capelli rossi. Esse si originano nei melanociti cutanei da una deviazione della via biosintetica delle eumelanine, il gruppo maggiormente diffuso di pigmenti che determina le colorazioni brune. In tale via metabolica l'ossidazione dell'amminoacido L-tirosina ad opera della tirosinasi genera il dopachinone, una specie instabile che per ciclizzazione intramolecolare e ossidazione dà luogo alle eumelanine attraverso intermedi 5,6-diidrossiindolici.⁴ Alternativamente, il dopachinone può subire addizione nucleofila da parte del gruppo tiolico della L-cisteina per dare addotti cisteinildopa.⁵ La polimerizzazione ossidativa di questi ultimi attraverso intermedi benzotiazinici porta ai pigmenti feomelanici (Figura 1).⁶⁻⁸

Sulla base dell'ipotesi che le caratteristiche degli individui con i capelli rossi siano riconducibili alle particolarità del pigmento feomelanico o di intermedi della via metabolica, la determinazione della struttura e della biosintesi delle feomelanine assume notevole importanza.

Allo stato attuale il processo di feomelanogenesi non è stato ancora del tutto definito, a causa delle difficoltà connesse alla eterogeneità e all'insolubilità dei pigmenti e alla labilità degli intermedi. La maggior parte delle informazioni sulla struttura delle feomelanine deriva da studi biomimetici, che hanno dimostrato che conducendo *in vitro* la reazione di ossidazione della L-dopa con tirosinasi in presenza di L-cisteina a pH 6.8 si ottiene la 5-S-cisteinildopa (5-S-CD) come prodotto principale, accanto a quantità

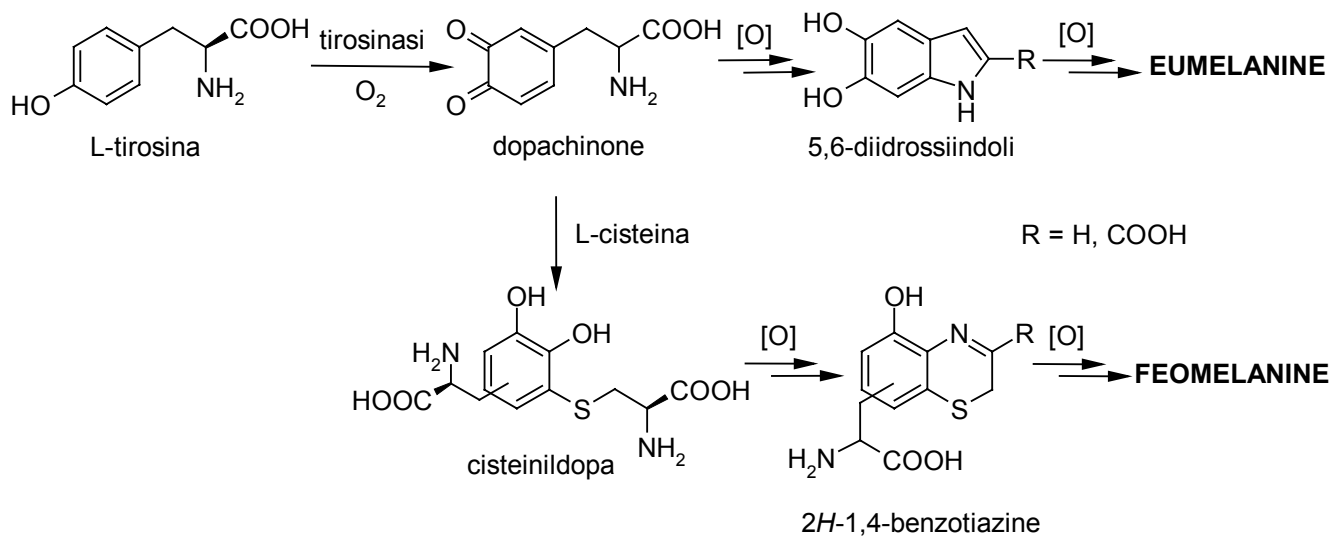


Figura 1. Schema della biosintesi delle eumelanine e delle feomelanine.

minori di altri regioisomeri, la 2-*S*-cisteinildopa (2-*S*-CD) e la 6-*S*-cisteinildopa (6-*S*-CD) (Figura 2).⁹

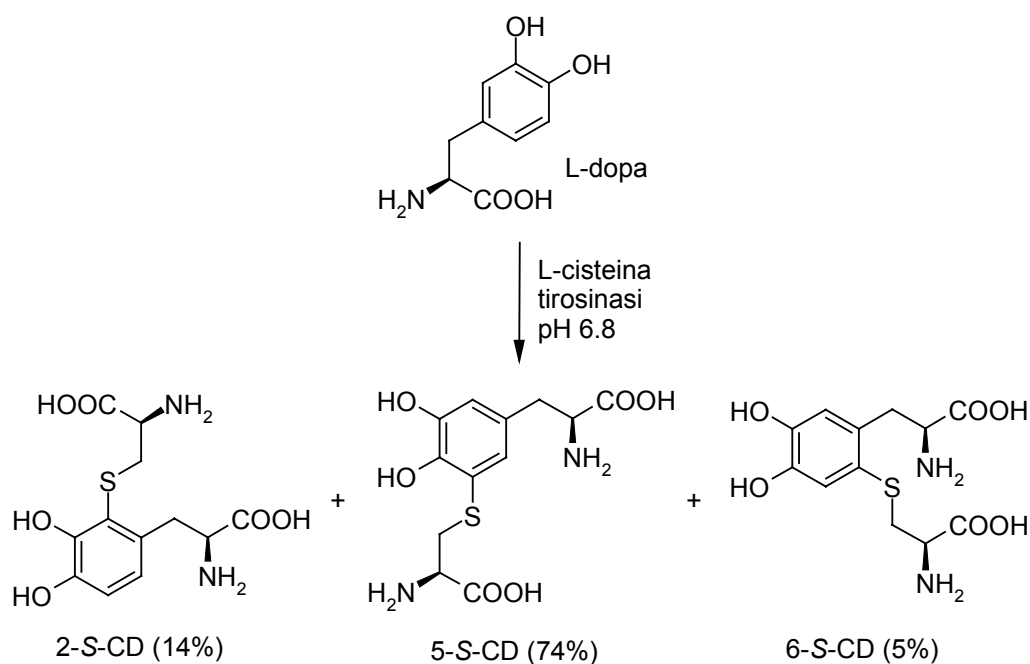


Figura 2. Formazione delle cisteinildopa regioisomeriche per ossidazione della L-dopa con tirosinasi in presenza di L-cisteina. Tra parentesi sono riportate le rese di isolamento.⁹

Sulla base di queste osservazioni la maggior parte degli studi sugli stadi della biosintesi delle feomelanine successivi alla formazione delle cisteinildopa sono stati condotti sulla 5-S-CD, ritenuta il precursore principale e pertanto più rappresentativo della feomelanogenesi. Studi *in vitro* hanno dimostrato come tale composto subisca ossidazione in una varietà di condizioni per dare intermedi 1,4-benzotiazinici, derivanti dalla ciclizzazione intramolecolare della catena della cisteina (Figura 1),¹⁰ e come questi ultimi diano luogo, per ulteriore ossidazione, a pigmenti simili alle feomelanine naturali.

Attualmente è generalmente riconosciuto che l'identificazione e la quantificazione del tipo di pigmentazione nei tessuti cutanei, ed in particolare la discriminazione tra eumelanine e feomelanine, rappresentano un parametro importante per l'individuazione di soggetti ad alta predisposizione verso il melanoma o altri tumori della pelle, molto più affidabile della classificazione in fenotipi e fototipi.¹¹

Date le sfavorevoli caratteristiche delle melanine, tra cui l'elevata insolubilità, la forte aggregazione con la matrice proteica e la presenza in livelli molto bassi (<1%) che rendono difficile e non perseguibile su scala routinaria l'isolamento del pigmento da fonti naturali quali pelle e capelli, le procedure di analisi si basano sulla degradazione chimica del tessuto pigmentato, seguita dall'identificazione e dal dosaggio mediante analisi cromatografica di prodotti specifici delle eumelanine e delle feomelanine, utilizzati come *markers* strutturali.

Una delle metodologie attualmente in uso prevede la degradazione del tessuto pigmentato con perossido di idrogeno in ambiente alcalino, seguita da analisi mediante HPLC con rivelazione UV per l'identificazione e il dosaggio dell'acido pirrol-2,3,5-tricarbossilico (PTCA), *marker* caratteristico delle eumelanine, e del 6-(2-ammino-2-carbossietil)-2-carbossi-4-idrossibenzotiazolo (BTCA) e dell'acido 1,3-tiazol-2,4,5-tricarbossilico (TTCA) per quanto riguarda, invece, le feomelanine (Figura 3).¹²⁻¹⁴

Il PTCA si formerebbe dalla scissione ossidativa dell'anello catecolico delle unità 5,6-diidrossiindoliche presenti nel polimero eumelanico (Figura 4).¹²

I *markers* strutturali delle feomelanine BTCA e TTCA deriverebbero invece da unità benzotiaziniche, probabilmente attraverso la formazione di intermedi diidrobenzotiazolici derivanti dalla contrazione d'anello del sistema eterociclico (Figura 5).¹³

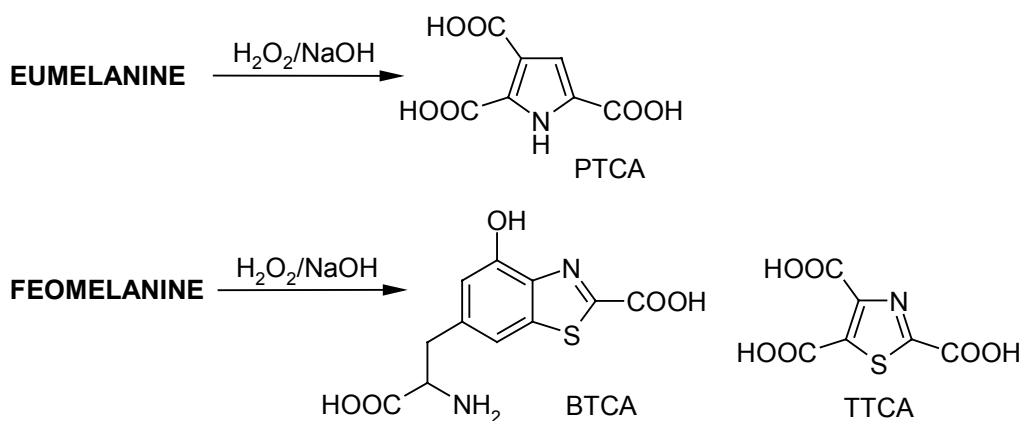


Figura 3. *Markers* strutturali delle eumelanine e delle feomelanine prodotti dalla degradazione di tessuti pigmentati con perossido d'idrogeno in ambiente alcalino.

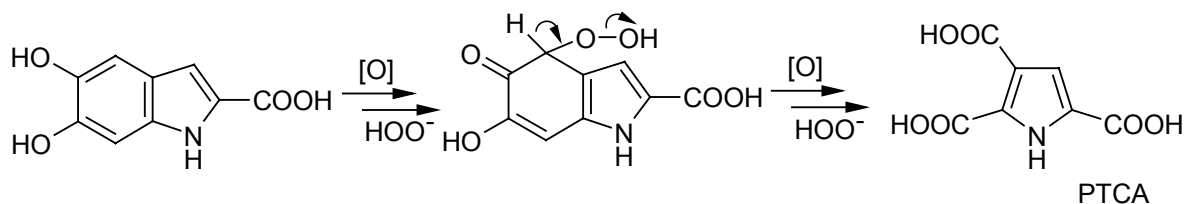


Figura 4. Formazione del PTCA da unità 5,6-diidrossiindoliche presenti nelle eumelanine.

Per il dosaggio dei *markers* delle melanine le miscele di degradazione sono sottoposte ad analisi HPLC su fase inversa, con una colonna ottadecilsilanica come fase stazionaria e una fase mobile costituita da una miscela di acido citrico e acido formico, a pH 2.5, contenente reagenti di coppia ionica (solfato di tetrabuttilammonio e ottansolfonato di sodio) e metanolo al 3% come modificante organico.¹⁴

La procedura analitica presenta, tuttavia, alcune problematiche che ne impediscono di fatto l'applicazione su un vasto numero di campioni, tra cui l'elevata complessità del sistema eluente, tempi di equilibratura della colonna molto lunghi e scarsa riproducibilità dei tempi di ritenzione, dovuta al sovraccaricamento della colonna

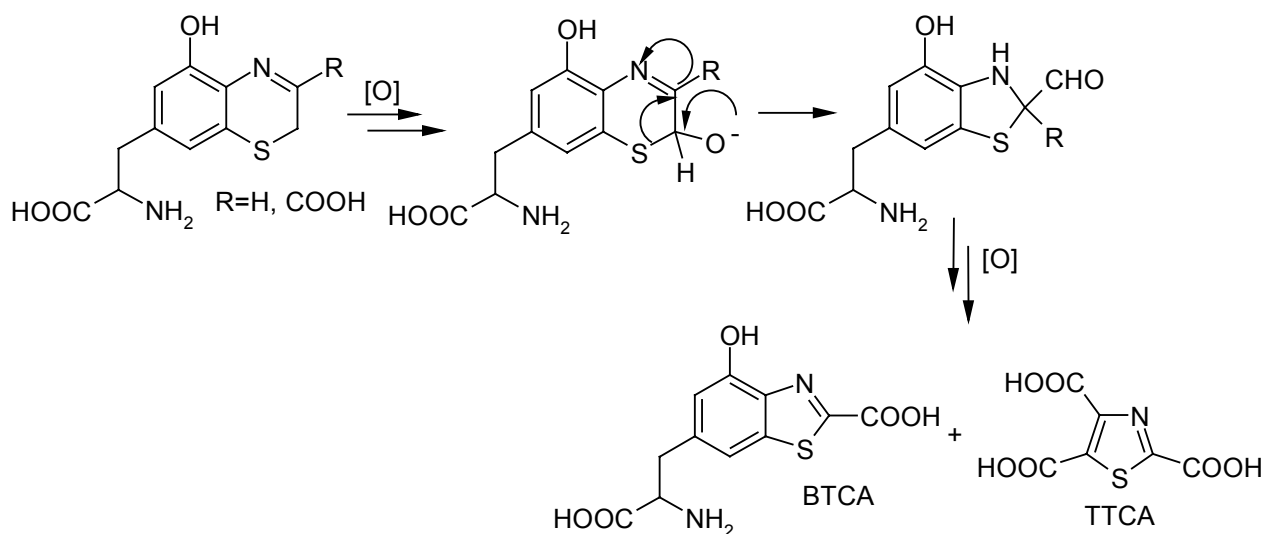


Figura 5. Formazione di BTCA e TTCA da unità benzotiaziniche presenti nelle feomelanine.

con le frazioni di peptidi che vengono generati dalla matrice proteica durante la degradazione alcalina.

Su questa base il presente lavoro di tesi è stato diretto in primo luogo ad un miglioramento della metodologia analitica per il dosaggio dei *markers* dei pigmenti melanici, allo scopo di poter disporre di un metodo valido, riproducibile e applicabile su scala routinaria, per lo *screening* di vasti gruppi di popolazione. Il nuovo metodo sviluppato ha anche permesso l'analisi delle miscele di degradazione dei tessuti pigmentati mediante cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa (LC/MS), che ha consentito di identificare un nuovo *marker* strutturale delle feomelanine, caratterizzato come un isomero del BTCA prodotto dalla degradazione di unità strutturali presenti nei pigmenti feomelanici derivanti dalla 2-S-CD. Una seconda parte del lavoro di dottorato è stata pertanto volta ad investigare il ruolo della 2-S-CD nel processo di feomelanogenesi, finora mai considerato. Un'altra serie di studi è stata rivolta all'esame delle proprietà cromoforiche di feomelanine naturali e sintetiche e di loro precursori, con l'obiettivo di identificare le specie potenzialmente responsabili delle ampiamente documentate proprietà fotosensibilizzanti delle feomelanine. In questo contesto è stata anche valutata la fotoreattività di feomelanine naturali e sintetiche mediante spettroscopia di risonanza elettronica paramagnetica (EPR).

Un'altra parte del lavoro di dottorato è stata diretta alla ricerca di un approccio alternativo alla classificazione di Fitzpatrick, basato sulla determinazione della pigmentazione acquisita persistente, per la valutazione della capacità di fotoprotezione individuale in soggetti con caratteristiche fenotipiche/fototipiche intermedie, non facilmente classificabili come soggetti a rischio sulla base dei soli dati anamnestici. Infine, nel corso del dottorato di ricerca sono stati condotti studi collaterali aventi come obiettivo la definizione della struttura e dei meccanismi di formazione delle eumelanine.

2. SVILUPPO DI UNA NUOVA METODOLOGIA PER L'ANALISI DI EUMELANINE E FEOMELANINE IN TESSUTI PIGMENTATI. IDENTIFICAZIONE DI UN NUOVO *MARKER* STRUTTURALE DELLE FEOMELANINE

Un primo obiettivo del presente lavoro di tesi è stata l'ottimizzazione della metodologia analitica per il dosaggio dei *markers* strutturali delle eumelanine e feomelanine in tessuti pigmentati. A tale scopo sono stati selezionati campioni di feomelanine ed eumelanine naturali e sintetiche, che sono stati sottoposti a degradazione ossidativa con perossido di idrogeno all'1.5% in idrossido di sodio 1 M per 24 h.¹⁴

In Figura 6 sono mostrati i profili cromatografici delle miscele di degradazione delle melanine sintetiche e naturali nelle condizioni analitiche riportate in letteratura.¹⁴ L'analisi è stata eseguita su HPLC in fase inversa, utilizzando una colonna ottadecilsilanica (C-18) e come fase mobile una miscela di acido citrico (0.05 M) e acido formico (0.4 M) a pH 2.5, contenente reagenti di coppia ionica (solfato di tetrabuttilammonio e ottansolfonato di sodio in concentrazione 0.1 mM) e metanolo al 3% come modificante organico. La rivelazione è stata effettuata con rivelatore UV a 280 nm.

Come si può osservare, i cromatogrammi risultano poco confrontabili a causa della scarsa riproducibilità dei tempi di ritenzione. Questo fenomeno è da attribuire in parte alla presenza di numerosi additivi e all'elevata concentrazione salina dell'eluente, che rendono molto lunghi i tempi di ambientamento della colonna, e in parte a un sovraccarico della colonna con i prodotti derivanti dalla degradazione della matrice cheratinica. In Figura 7 è mostrato, a titolo di esempio, il profilo elutografico della miscela di degradazione di un campione di capelli rossi registrato dopo aver effettuato 50 corse cromatografiche sulla stessa colonna, in cui è evidente la perdita di risoluzione e di riproducibilità. Tali limitazioni impediscono, di fatto, l'applicazione di tale metodologia su scala routinaria, per l'analisi di un elevato numero di campioni. Nel caso delle miscele di degradazione di melanine naturali (Figura 6A e 6B) i cromatogrammi risultano, inoltre, particolarmente complessi per la presenza di prodotti

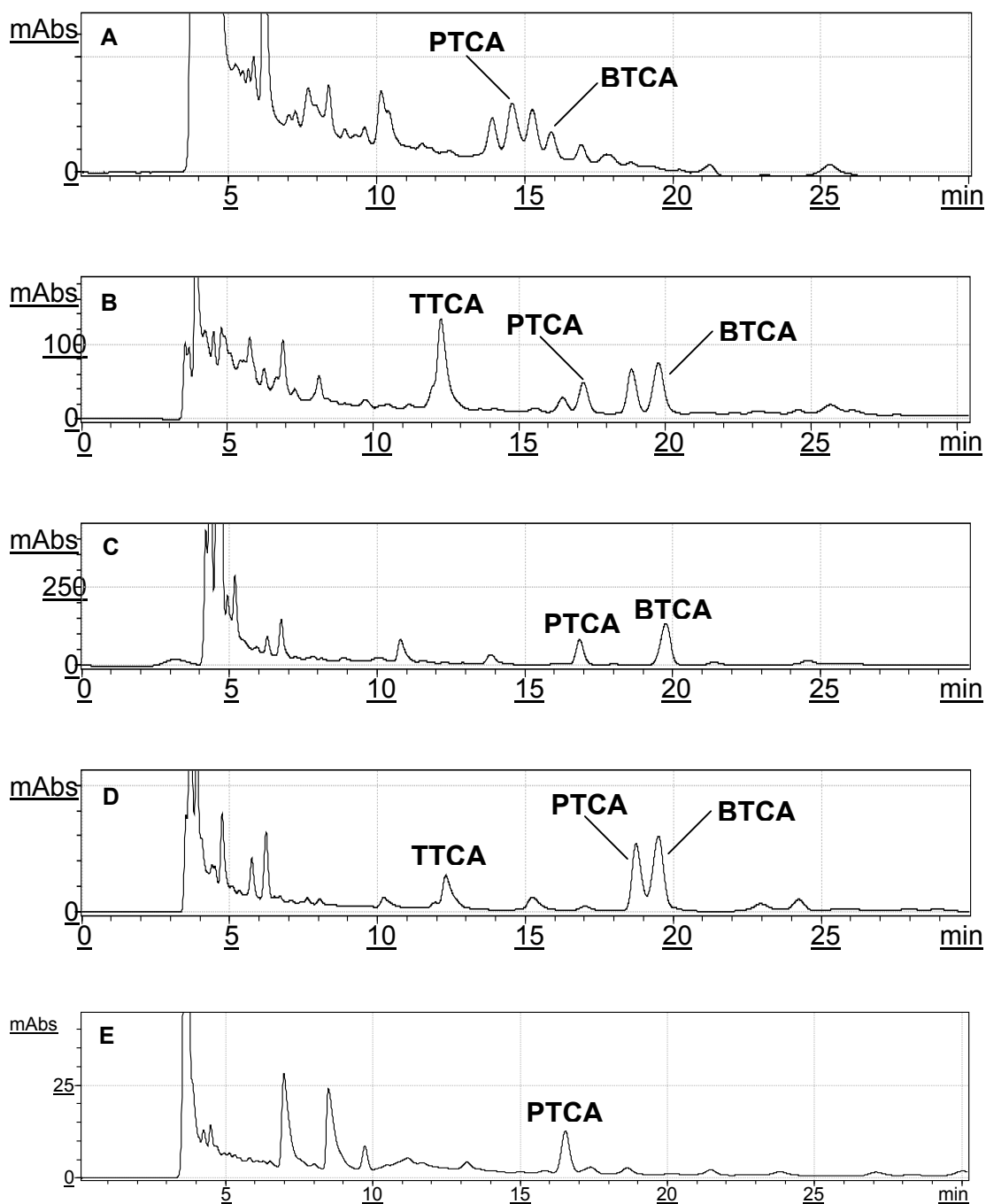


Figura 6. Profili elutografici delle miscele di degradazione di melanine naturali e sintetiche ottenuti secondo le condizioni analitiche precedentemente riportate in letteratura.¹⁴ **A:** capelli rossi; **B:** feomelanina isolata da pelo di coniglio Fulvo di Borgogna; **C:** feomelanina da 5-S-CD/tirosinasi; **D:** feomelanina da 5-S-CD/perossidasi-H₂O₂; **E:** capelli neri.

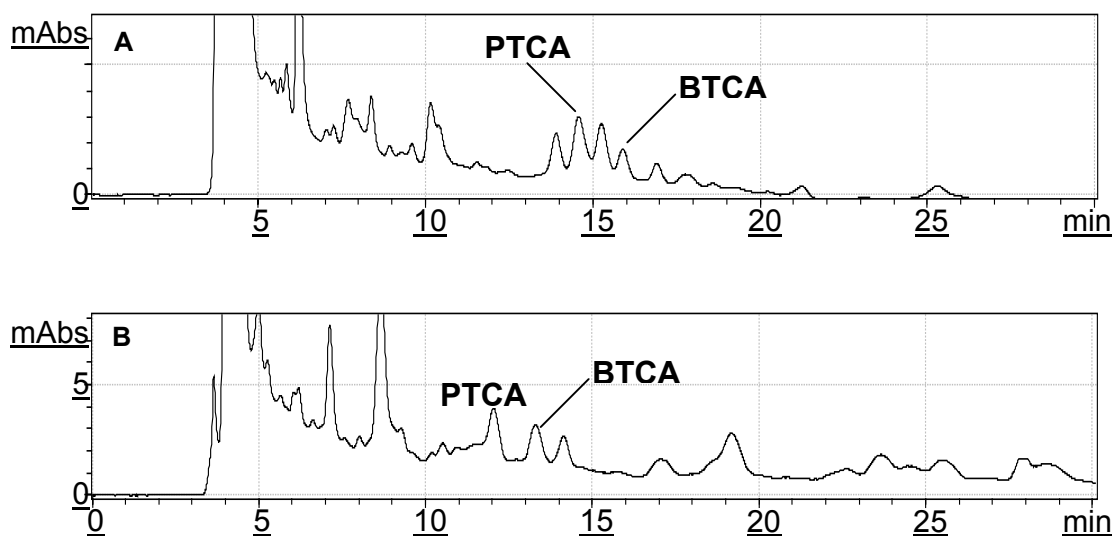


Figura 7. Confronto dei profili elutografici della miscela di degradazione di un campione di capelli rossi registrati subito dopo l'ambientamento della colonna (A) e dopo 50 corse cromatografiche (B) nelle condizioni analitiche precedentemente riportate in letteratura.¹⁴

polari che eluendo a tempi di ritenzione prossimi a quelli dei *markers* ne impediscono una identificazione e una integrazione affidabili.

Su questa base sono state effettuate delle prove preliminari di variazione della fase mobile. In particolare sono stati eliminati il citrato e i reagenti di coppia ionica, così da utilizzare un eluente costituito soltanto da acido formico e metanolo. Ciò ha portato, tuttavia, ad una diminuzione dei tempi di ritenzione dei *markers* TTCA, PTCA e BTCA, con conseguente perdita di risoluzione.

Si è quindi passati ad esplorare le potenzialità di altre fasi stazionarie per la cromatografia in fase inversa, che consentissero una maggiore ritenzione di analiti altamente polari. Dopo diversi tentativi, buoni risultati sono stati ottenuti utilizzando una colonna ottadecilsilanica (C-18) ad alta "bagnabilità" (Synergi Hydro-RP Chemtek), ovvero caratterizzata da un *end-capping* polare dei gruppi Si-OH non derivatizzati, che impedisce alle catene ottadeciliche di collassare in presenza di fasi mobili con alte percentuali di acqua, assicurandone, pertanto, la massima interazione con gli analiti, con conseguente elevata ritenzione di questi ultimi anche in assenza di reagenti di coppia ionica. In queste condizioni, utilizzando un eluente semplice

costituito da acido formico 1%/metanolo 97:3 v/v, TTCA, PTCA e BTCA sono stati eluiti a 11, 34 e 90 min, nell'ordine. La forma dei picchi non è risultata, tuttavia, del tutto soddisfacente, soprattutto nel caso del BTCA, che veniva, tra l'altro, eluito a tempi di ritenzione troppo lunghi ai fini pratici, anche aumentando la percentuale di modificante organico (fino al 10%). Queste limitazioni sono state superate attraverso un'attenta selezione del pH della fase mobile, considerando che anche piccole variazioni di pH nell'intervallo 2.0-3.5 comportavano differenze significative nel profilo elutografico, dovute evidentemente ad equilibri di dissociazione/protonazione delle funzionalità carbossiliche/amminoacidiche dei *markers*.

In Figura 8 sono mostrati i profili HPLC delle miscele di degradazione della melanina sintetica da 5-S-CD/tirosinasi (A) e della feomelanina isolata dal pelo di coniglio Fulvo di Borgogna (B) ottenuti nelle nuove condizioni cromatografiche, utilizzando come eluente acido formico 1%/metanolo 97:3 v/v a pH 2.8. Come si può osservare, in queste condizioni la risoluzione dei *markers* (PTCA vs BTCA >2) e la forma dei picchi (fattore di asimmetria pari a 1.2 per il BTCA e 1.3 per il PTCA) risultano ampiamente soddisfacenti. Particolarmente utile per l'identificazione degli analiti di interesse in cromatogrammi complessi si è rivelato il seguire l'eluizione delle miscele di degradazione a due differenti lunghezze d'onda, 280 e 254 nm. Infatti il rapporto delle aree A_{280}/A_{254} risulta molto diverso per i tre *markers*, essendo pari a 0.6 nel caso del BTCA e a 1.1 per TTCA e PTCA. Ciò è evidente in Figura 8C, dove è mostrato il cromatogramma della stessa miscela di Figura 8B con rivelazione a 254 nm.

La riproducibilità dei tempi di ritenzione e la risoluzione sono risultate soddisfacenti anche dopo molte iniezioni consecutive senza lavaggio della colonna. Ad esempio, nel caso di un campione di capelli rossi, dopo 50 iniezioni consecutive i tempi di ritenzione sono variati da 31.5 a 29.3 min per il BTCA e da 22.5 a 21.5 min nel caso del PTCA, senza sostanziali modifiche nel profilo di eluizione. In ogni caso le proprietà di ritenzione della colonna possono essere recuperate dopo circa 1 h di lavaggio con acqua/metanolo 8:2 v/v e 1 h di riambientamento con il sistema eluente.

La nuova metodologia analitica è stata applicata all'analisi di diversi tessuti pigmentati. In Figura 9 sono mostrati i profili cromatografici ottenuti da capelli umani di differenti colori e per confronto quello relativo ad un campione di capelli albini, da

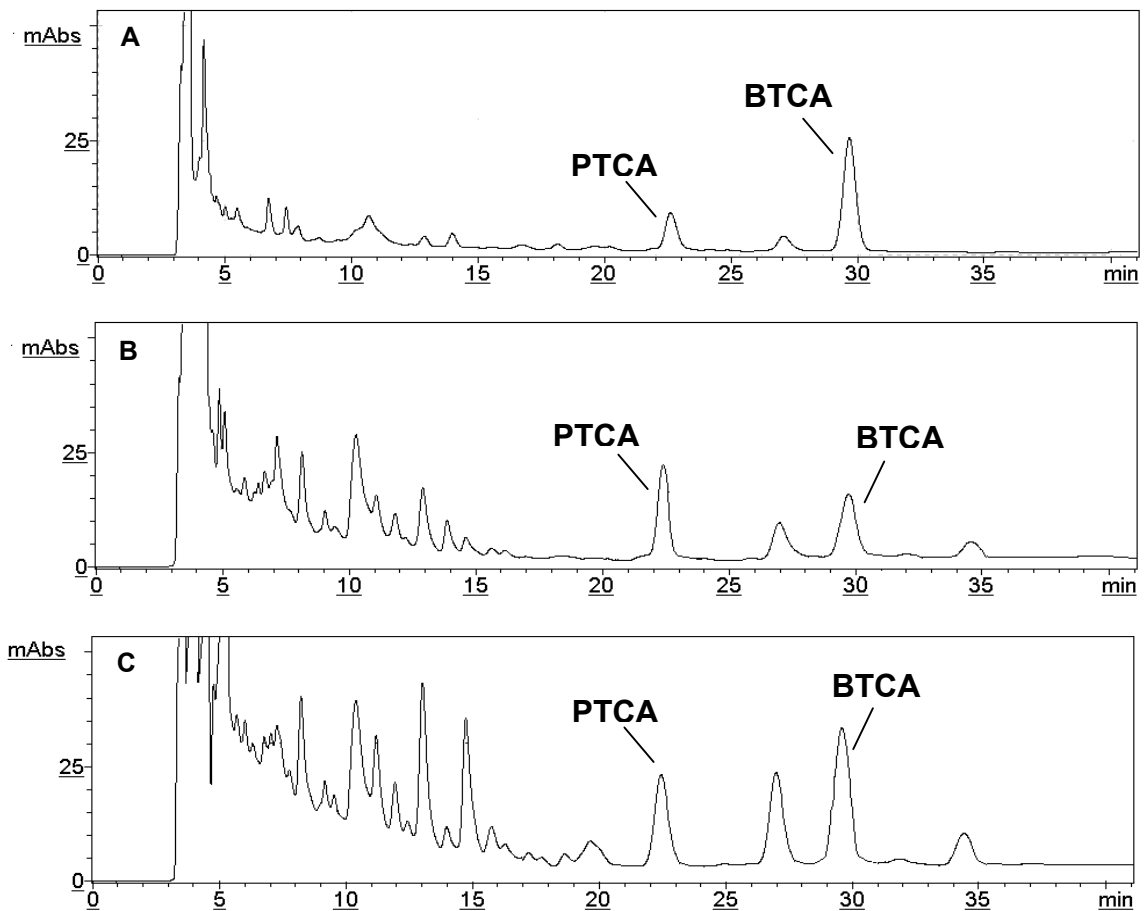


Figura 8. Profili elutografici delle miscele di degradazione di una feomelanina da 5-S-CD/tirosinasi (**A**, rivelazione a 280 nm) e di una feomelanina isolata da pelo di coniglio Fulvo di Borgogna (**B**, rivelazione a 280 nm; **C**, rivelazione a 254 nm).

cui appare chiaro che l'interferenza dei picchi derivanti dalla degradazione della matrice proteica è praticamente minima. L'identificazione del PTCA nel campione di capelli biondi è stata effettuata sulla base della determinazione del rapporto tra le aree a 280 e 254 nm.

Il nuovo metodo di analisi si è rivelato adatto anche per l'esame di altri tessuti pigmentati. In Figura 10 sono mostrati i profili elutografici ottenuti per un campione di cute iridi di colori differenti. Pur in presenza di picchi significativi derivanti dalla matrice l'identificazione dei *markers* può essere effettuata in maniera non ambigua, anche sulla base della determinazione del rapporto A_{280}/A_{254} . L'analisi del campione di cute è stata effettuata senza separazione dell'epidermide dal derma e dai grassi

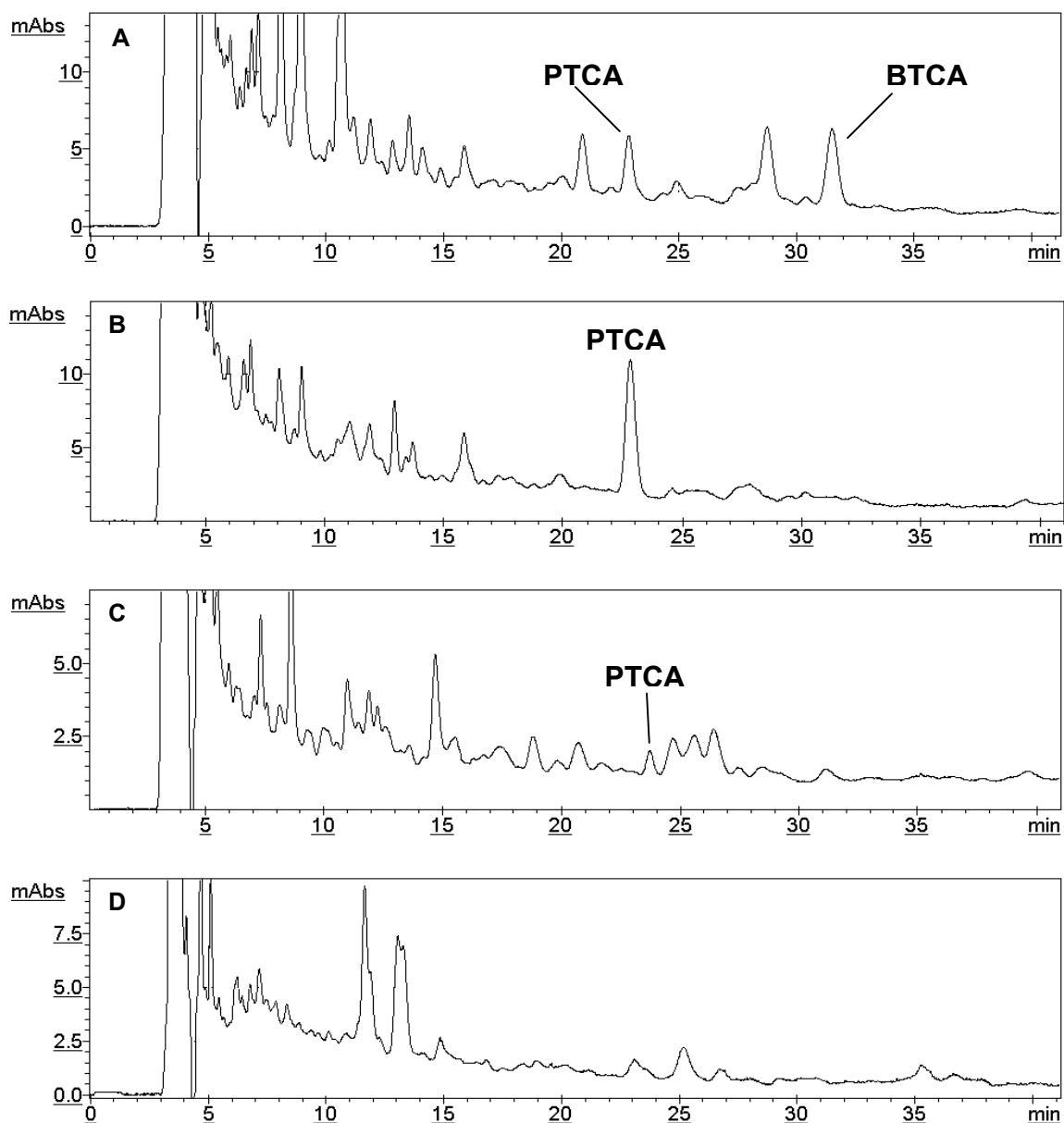


Figura 9. Profili elutografici delle miscele di degradazione di un campione di capelli rossi (**A**), neri (**B**), biondi (**C**) e albi (**D**). Rivelazione a 254 nm.

sottocutanei, e anche in questo caso è stato possibile identificare in maniera certa il PTCA, mentre il BTCA è risultato al di sotto dei limiti di rivelazione. D'altra parte il BTCA è stato ottenuto in rese apprezzabili (0.34 ng/mg di tessuto) dal pigmento del campione di iride giallo-marrone.

Il limite di rivelazione nelle nuove condizioni analitiche sviluppate è risultato pari a 10 pg per il PTCA e 20 pg per il BTCA ad un rapporto segnale/rumore >5.

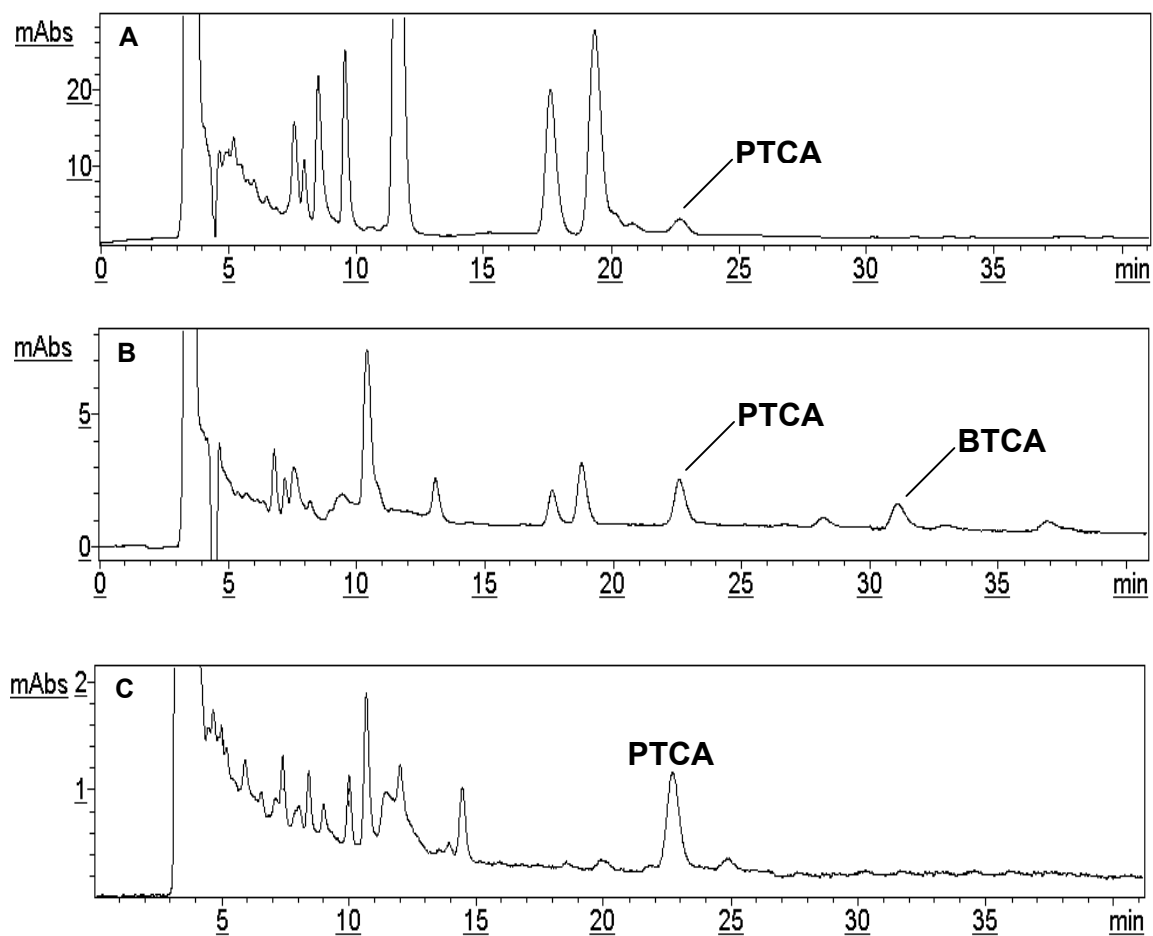


Figura 10. Profili elutografici delle miscele di degradazione di un campione di cute umana (A), iride di scimmia giallo-marrone (B) e iride umana verde (C). Rivelazione a 254 nm.

In conclusione, la nuova metodologia sviluppata nel corso di questo lavoro di tesi combina i vantaggi della degradazione con perossido di idrogeno in ambiente alcalino¹⁴ con una procedura analitica semplice da realizzare, che non richiede alcun pre-frazionamento del campione, senza interferenze da parte dei prodotti derivanti dall'idrolisi del tessuto proteico. L'identificazione dei *markers* strutturali è resa possibile anche in miscele di degradazione complesse dalla determinazione del rapporto tra le aree dei picchi a due lunghezze d'onda differenti. L'utilizzo di un eluente non salino garantisce una buona risoluzione e una buona riproducibilità dei tempi di ritenzione anche dopo un numero elevato di corse cromatografiche. Inoltre è richiesta un'apparecchiatura HPLC standard, dotata di un'unica pompa, dal momento che non

sono necessarie eluizioni in gradiente, e di un rivelatore UV. Nel complesso queste caratteristiche rendono tale metodologia potenzialmente applicabile per un'analisi di routine su vasti campioni di popolazione.

Identificazione di un nuovo marker strutturale delle feomelanine

La nuova metodologia sviluppata per l'analisi di eumelanine e feomelanine ha consentito di esaminare le miscele di degradazione di melanine naturali e sintetiche anche mediante cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa (LC/MS).

In particolare è stato messo a punto un metodo il più possibile simile a quello usato per l'analisi HPLC con rivelazione UV. Sono state pertanto utilizzate la stessa colonna ottadecilsilanica (C-18) ad alta "bagnabilità" come fase stazionaria, e come fase mobile una miscela di acido formico 0.5%/metanolo 9:1 v/v ad una velocità di flusso di 0.4 mL/min. L'analisi è stata effettuata in modalità elettrospray ioni positivi (ESI+).

In Figura 11 è mostrato il profilo TIC della miscela di degradazione della feomelanina isolata dal pelo di coniglio fulvo di Borgogna.

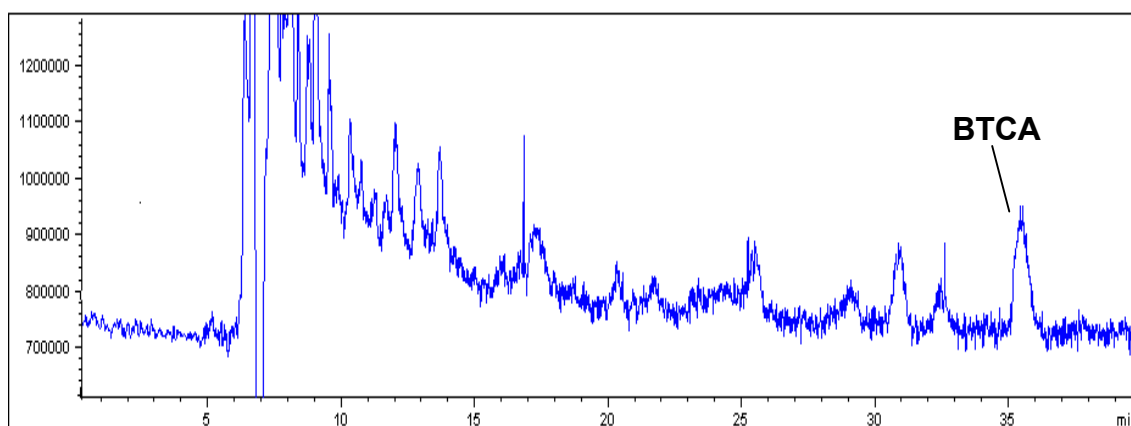


Figura 11. Profilo TIC in modalità ESI+ della miscela di degradazione di una feomelanina isolata da pelo di coniglio Fulvo di Borgogna.

Particolarmente interessante è apparsa la presenza di un prodotto eluito a 31 min, che nel profilo HPLC con rivelazione UV era eluito a 27 min, in prossimità del BTCA (Figura 8B e 8C). Tale composto è risultato caratterizzato da uno ione pseudomolecolare $[M+H]^+$ a m/z 283 (Figura 12), lo stesso valore che si ottiene per il BTCA, come confermato anche dall'analisi in modalità Selected Ion Monitoring (SIM)

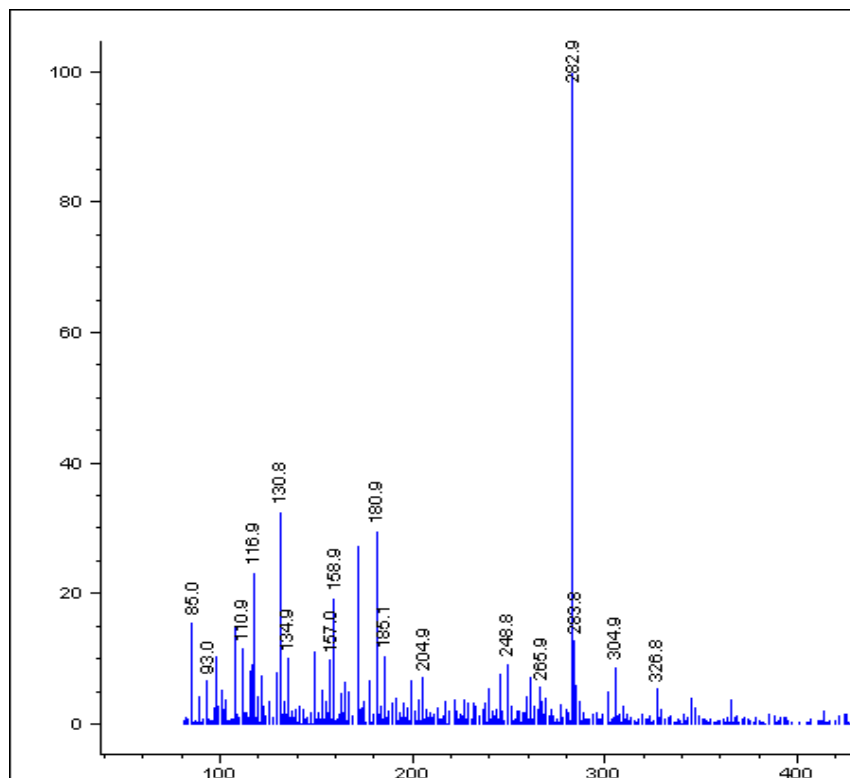


Figura 12. Spettro di massa in modalità ESI+ del composto eluito a 31 min.

a m/z 283 della miscela di degradazione di un campione di feomelanina naturale isolata da capelli rossi (Figura 13).

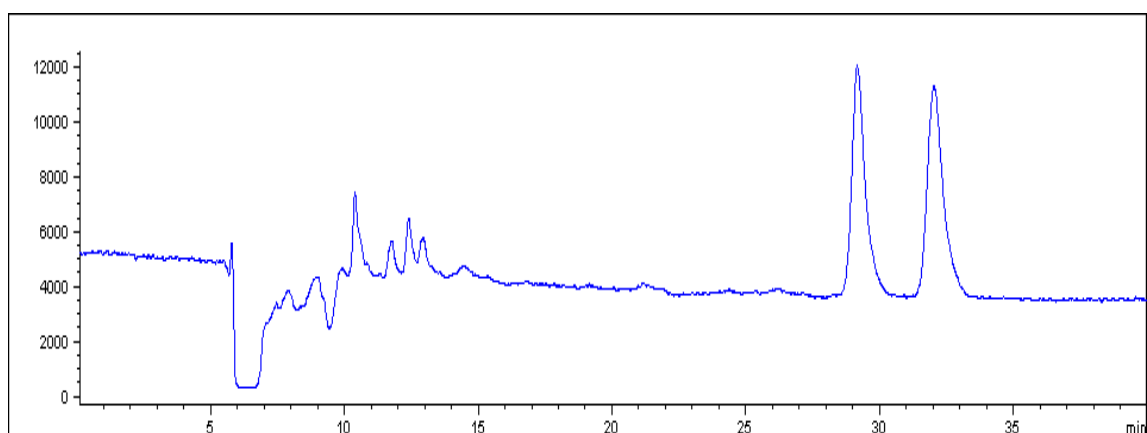
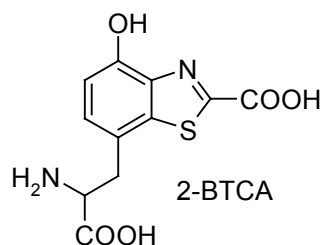


Figura 13. Profilo SIM a m/z 283 della miscela di degradazione di una feomelanina isolata da capelli rossi.

Questo dato, associato anche all'analogia riscontrata nel valore del rapporto delle aree A_{280}/A_{254} (0.6 in entrambi i casi), ha indotto a ipotizzare che tale composto fosse un

isomero del BTCA, probabilmente l'acido 2-carbossibenzotiazolico derivante dalla 2-*S*-CD (2-BTCA). Tale ipotesi è stata effettivamente confermata attraverso l'isolamento di tale prodotto da miscele di degradazione di feomelanine sintetiche preparate a partire dalla 2-*S*-CD.



Questo risultato suggerisce che la 2-*S*-CD svolge un ruolo più ampio di quello finora considerato nel processo di feomelanogenesi.

3. SINTESI E REATTIVITA' DELLA 2-S-CISTEINILDOPA

Sintesi della 2-S-CD

L'identificazione del 2-BTCA nelle miscele di degradazione di feomelanine naturali (capitolo 2) ha suggerito un contributo della 2-S-CD nel processo di feomelanogenesi maggiore di quello finora ipotizzato sulla base delle sue rese di formazione rispetto alla 5-S-CD per ossidazione della L-dopa in presenza di L-cisteina (Figura 2).⁹ Le ragioni della discrepanza esistente tra le rese relative di formazione degli amminoacidi e quelle delle unità ad esse riconducibili nel pigmento naturale finale possono essere diverse. La verifica delle varie ipotesi richiede in ogni caso la possibilità di esaminare la reattività ossidativa della 2-S-CD, anche in confronto a quella della 5-S-CD, e di valutare la tendenza relativa dei due amminoacidi e dei loro prodotti di ossidazione a prendere parte alla formazione del pigmento finale. A tale scopo è necessario disporre di quantità significative di 2-S-CD.

Le procedure di sintesi della 2-S-CD attualmente in uso si basano sull'ossidazione della L-dopa in presenza di L-cisteina con diversi sistemi ossidanti, sia chimici (AgO in metanolo,¹⁵ Ce(NH₄)₂(NO₃)₆ in acidi,¹⁶ reagente di Fenton¹⁷) che enzimatici (tirosinasi,⁹ perossidasi/H₂O₂¹⁸). In ogni caso si ottiene una miscela di cisteinildopa regioisomeriche, per cui sono necessari due stadi di frazionamento su colonna a scambio ionico per isolare la 2-S-CD in rese comunque molto basse, dal momento che la 5-S-CD rappresenta sempre il prodotto principale (Tabella 1).

Tabella 1. Rese di isolamento in percentuale delle cisteinildopa regioisomeriche dall'ossidazione della L-dopa in presenza di L-cisteina con diversi sistemi ossidanti.

Sistema ossidante	5-S-CD	2-S-CD	6-S-CD
AgO ¹⁵	70	7	-
Ce(NH ₄) ₂ (NO ₃) ₆ ¹⁶	26	2	<1
reagente di Fenton ¹⁷	15	3	-
tirosinasi ⁹	74	14	1
perossidasi/H ₂ O ₂ ¹⁸	15	4	-

Su questa base uno degli scopi del presente lavoro di tesi è stato lo sviluppo di un nuovo approccio sintetico alla 2-S-CD, basato su una strategia alternativa a quella di addizione della cisteina al dopachinone. In particolare è stata sfruttata l'osservazione che i chinoni formati a partire dagli acidi 3-(3,4-diidrossifenil)propenoici subiscono addizione di tioli preferenzialmente in posizione 2 dell'anello catecolico,^{19,20} a differenza dei chinoni generati da altri sistemi catecolici, tipicamente le catecolammine, che reagiscono principalmente in posizione 5.⁵ Così, ad esempio, l'ossidazione con tirosinasi dell'acido clorogenico in presenza di glutazione dà luogo al prodotto di addizione in posizione 2 in buone rese (70%).¹⁹ Analogamente l'addizione di glutazione all'acido caftarico o di cisteina all'acido caffeico porta esclusivamente ai relativi 2-S-coniugati (Figura 14).²¹

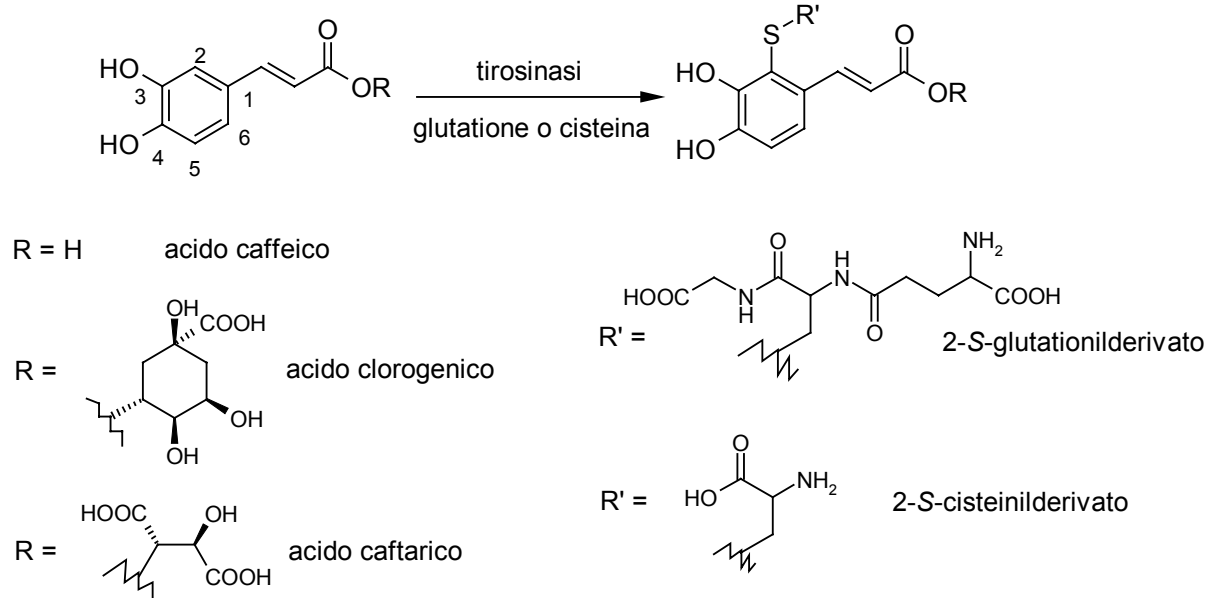


Figura 14. Prodotti di coniugazione di tioli con l'acido caffeico e composti correlati.

Su questa base sono state considerate diverse procedure sintetiche di accesso a derivati dell'acido 3-(3,4-diidrossifenil)propenoico opportunamente funzionalizzati, che dopo addizione di cisteina o derivati potessero essere sottoposti a riduzione dell'unità propenoica, fornendo in tal modo la catena alaninica della 2-S-CD.

A differenza delle sintesi attualmente in uso, la metodologia sintetica proposta presenta una difficoltà che è stata preliminarmente considerata nella progettazione degli

stadi di reazione. Infatti mentre le procedure classiche, se condotte utilizzando gli amminoacidi naturali L-cisteina e L-dopa, permettono di ottenere direttamente la 2-*S*-CD con la corretta configurazione dei centri chirali, la strategia ipotizzata consente di ottenere la configurazione corretta soltanto per il centro chirale dell'unità di cisteina. La catena alaninica del diamminoacido viene infatti ottenuta dalla riduzione dell'acido propenoico e pertanto è necessario prevedere una riduzione stereoselettiva per ottenere la stessa configurazione dell'amminoacido naturale.

Sintesi dell'acido 2-acetilammino-3-(3,4-diidrossifenil)propenoico (1)

La formazione di derivati dell'acido fenilpropenoico può essere ottenuta mediante reazioni di condensazione di tipo Knoevenagel tra benzaldeidi e sistemi contenenti metileni reattivi. Nel caso in esame, in particolare, è necessario introdurre sul doppio legame del propenoato un gruppo funzionale che possa essere successivamente convertito nel gruppo amminico della catena alaninica della 2-*S*-CD.

E' stata pertanto esaminata la reazione di benzaldeidi con la *N*-acetilglicina, una strategia classica di accesso a sistemi fenilalaninici basata sulla sintesi di Erlenmeyer, che prevede la formazione di intermedi ossazolonic successivamente convertiti in acidi α -acetilamminopropenoici per idrolisi in acidi (Figura 15).²²

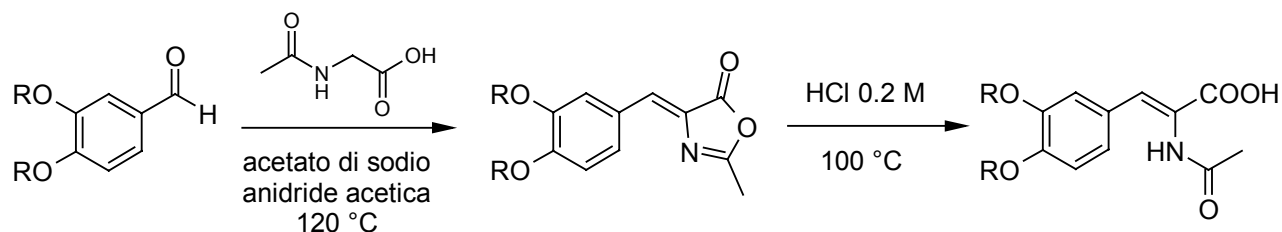
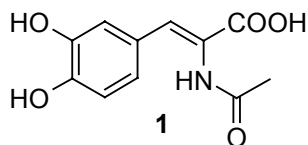


Figura 15. Formazione di acidi α -acetilamminopropenoici per reazione della *N*-acetilglicina con derivati della 3,4-diidrossibenzaldeide.

Utilizzando come reagenti la 3,4-(metilendiossi)benzaldeide e la *N*-acetilglicina in anidride acetica come solvente è stato ottenuto l'intermedio ciclico che per trattamento con HCl 0.2 M a ricadere per 1 h ha fornito l'acido propenoico con la funzione catecolica protetta come metilendiossi. Tutti i tentativi di deprotezione dell'unità catecolica (HBr, HBr/acido acetico, PCl₅/toluene, HCl 2 N) si sono mostrati, tuttavia, poco soddisfacenti, in quanto si è avuta una decomposizione significativa del prodotto,

mentre in condizioni più blande ($\text{AlCl}_3/\text{CH}_2\text{Cl}_2$) la deprotezione non ha avuto luogo in misura significativa.

La reazione è stata quindi condotta sulla 3,4-diidrossibenzaldeide. Un'ottimizzazione delle condizioni della reazione di condensazione (substrato a concentrazione 0.93 M, tempo di reazione 5 h, a 120 °C) ha consentito di ottenere un consumo elevato, anche se non quantitativo, dell'aldeide di partenza. La miscela di reazione, diluita in tampone fosfato a pH 7.4, è stata quindi estratta con acetato di etile ed il residuo ripreso in HCl 0.2 M e tenuto a ricadere per 1 h. L'analisi della miscela ha rivelato la presenza di un prodotto principale (R_f 0.41, eluente cloroformio/metanolo/acido acetico 8:2:1 v/v/v), accanto alla 3,4-diidrossibenzaldeide residua. La rimozione di quest'ultima è stata convenientemente ottenuta mediante estrazione della miscela di reazione con etere etilico. Il prodotto finale, l'acido (*Z*)-2-acetilammino-3-(3,4-diidrossifenil)propenoico (**1**), è stato ottenuto con purezza >90%, come valutato da analisi HPLC e NMR, in rese attorno al 60%.



Accoppiamento ossidativo di 1 con cisteina e derivati. Sintesi dell'acido (*Z*)-2-acetilammino-3-[2-(2-acetilammino-2-carbossietiltio)-3,4-diidrossifenil]propenoico (2**)**

Sono state esaminate diverse condizioni per realizzare la reazione di accoppiamento ossidativo dell'acido **1** con la cisteina. In tutte le prove effettuate si è preferito utilizzare come nucleofilo la *N*-acetil-L-cisteina per evitare successive reazioni di ciclizzazione cui avrebbe potuto dar luogo il gruppo amminico della cisteina sull'*o*-chinone generato durante la reazione, come osservato in sistemi direttamente correlati.¹⁰ In una prima serie di esperimenti sono stati utilizzati ossidanti chimici come nitrato di cerio ammonio in condizioni acide (a pH 3 o in acido solforico 2 M), periodato di sodio a pH 4 o 6 e ferricianuro di potassio a pH 7.4. In tutte queste condizioni si è osservato un rapido consumo di **1** con formazione di una varietà di specie apparentemente oligomeriche, derivanti verosimilmente dalla polimerizzazione del prodotto di partenza. Conducendo la reazione di ossidazione in mezzi non acquosi, ad esempio con cloranile

(3,4,5,6-tetracloro-*o*-benzoquinone) o con DDQ (5,6-diciano-2,3-dicloro-*p*-benzoquinone) in metanolo, il consumo del prodotto di partenza è risultato invece molto basso.

Risultati significativamente diversi sono stati ottenuti utilizzando ossidanti enzimatici. In presenza di ossigeno l'enzima tirosinasi è risultato efficiente nel produrre un rapido consumo del substrato dando luogo ad un prodotto principale, che è stato identificato mediante analisi LC/MS come un prodotto di coniugazione di **1** con la *N*-acetil-L-cisteina. Ancora più rapido è stato il decorso dell'ossidazione promossa dal sistema perossidasi/H₂O₂: in queste condizioni, tuttavia, non è stato possibile fermare la reazione allo stadio di monoaddizione, in quanto l'ossidazione è andata avanti molto velocemente a dare diaddotti (analisi LC/MS). Il risultato non è cambiato variando l'ordine di aggiunta dei reagenti o gli equivalenti molarli di *N*-acetil-L-cisteina rispetto al substrato, indicando che il decorso della reazione riflette la maggiore ossidabilità dei prodotti di addizione rispetto ai prodotti di partenza.²³ La tendenza alla formazione di diaddotti è stata osservata anche conducendo la reazione per autossidazione all'aria, indipendentemente dalla concentrazione di **1** e dal tempo di reazione. In questo contesto, il decorso particolarmente favorevole della reazione con tirosinasi può essere interpretato in termini di una specificità di substrato dell'enzima, che ossida preferenzialmente il prodotto di partenza rispetto al prodotto di monoaddizione.²⁰ Nello sviluppo successivo degli esperimenti si è cercato, pertanto, di ottimizzare la reazione di ossidazione con tirosinasi, seguendone il decorso mediante analisi HPLC.

Inizialmente la reazione è stata condotta in tampone fosfato a pH 7.4 con il substrato in concentrazione 2 mM, in presenza di 100 U/mL di tirosinasi. Ad un tempo di reazione di 1 h il prodotto principale della miscela è risultato il composto I a *t_R* 21 min, accompagnato dai prodotti II-IV a tempi di ritenzione leggermente maggiori (Figura 16). Dall'analisi LC/MS i componenti della miscela sono stati identificati come monoaddotti (prodotti I-III) e diaddotto (prodotto IV).

In considerazione dei costi piuttosto elevati della tirosinasi, in una serie successiva di esperimenti si è cercato di stabilire la quantità minima di enzima che garantisse un consumo soddisfacente di substrato. Utilizzando 50 U/mL di tirosinasi non si sono osservate variazioni significative nelle rese dei prodotti rispetto alla

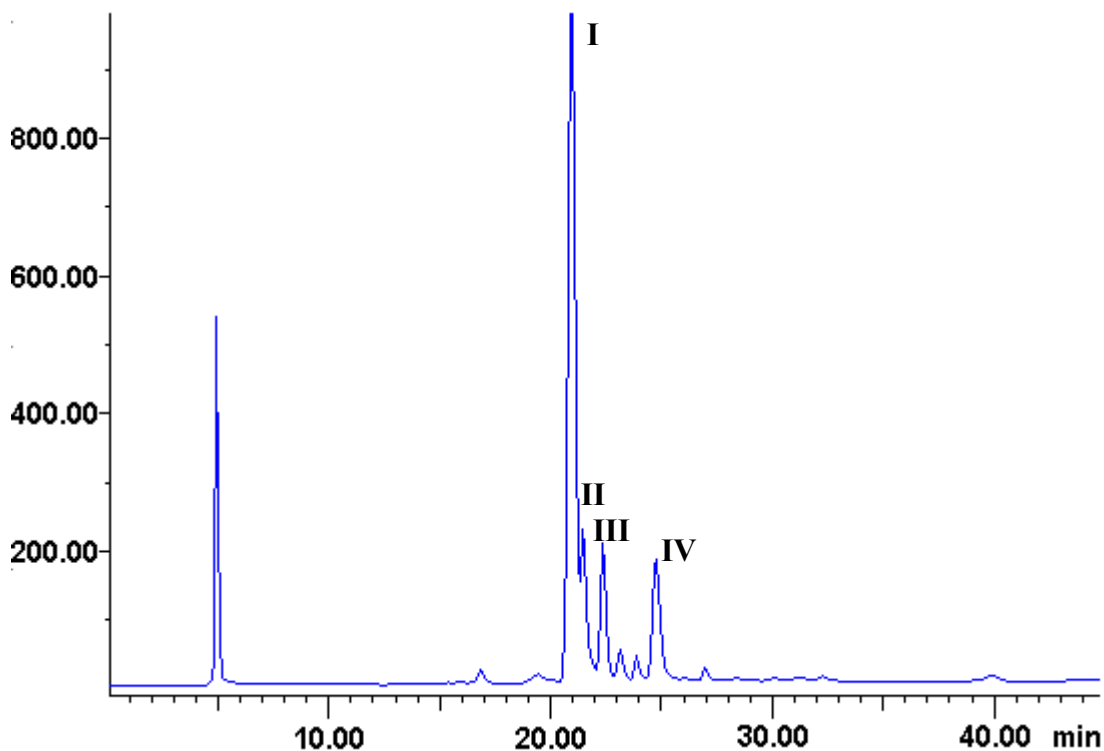


Figura 16. Profilo elutografico della miscela di reazione di **1** con tirosinasi in presenza di *N*-acetil-L-cisteina ad un tempo di reazione di 1 h.

reazione condotta con maggiori quantità di enzima, mentre con quantità minori (ad esempio 20 U/mL) il consumo del substrato non è stato completo. Ulteriori prove hanno permesso di stabilire che il rapporto ottimale substrato/*N*-acetilcisteina è di 1:2.

La reazione è stata quindi condotta in tali condizioni su scala preparativa e dopo 2 h l'ossidazione è stata interrotta per acidificazione a pH 3 con HCl 2 M. La miscela è stata estratta con acetato di etile per allontanare eventuali tracce del prodotto di partenza non reagito e la fase acquosa, portata a piccolo volume per allontanamento del solvente sotto vuoto, è stata frazionata mediante HPLC preparativa per dare il prodotto I, identificato mediante spettroscopia NMR come l'addotto desiderato **2** (Figura 17).

Lo spettro ^1H NMR presentava infatti, nella zona a campi bassi, due doppietti ($J=8.4$ Hz) a δ 6.80 e 6.96, attribuiti ai protoni in posizione *orto* dell'anello aromatico, e un singoletto a δ 7.63, relativo al protone sul C-3 della catena propenoica; la zona a campi alti era invece caratterizzata dalla presenza di due doppi doppietti a δ 2.85 ($J=13.2, 10.0$ Hz) e 3.32 ($J=13.2, 4.4$ Hz) e di un multipletto a δ 3.98, attribuiti ai protoni della

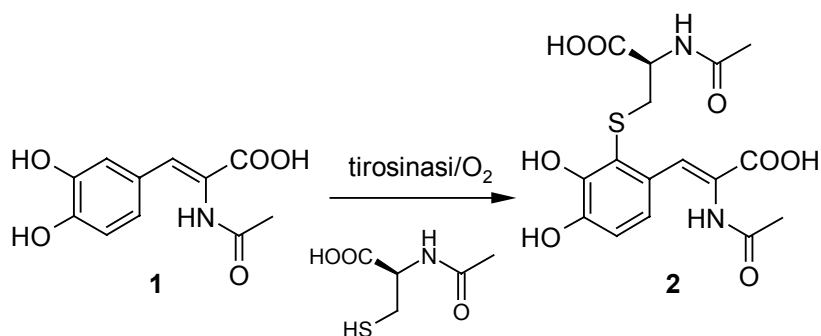


Figura 17. Formazione di **2** per ossidazione di **1** con tirosinasi in presenza di *N*-acetil-L-cisteina.

N-acetil-L-cisteina. La configurazione *Z* del doppio legame è stata dedotta dallo spettro ROESY, che mostrava una correlazione tra il segnale del protone H-6' a δ 6.80 e il segnale del protone N-H del gruppo acetilammino in posizione 2 della catena propenoica a δ 9.11. In Figura 18 è riportata l'assegnazione delle risonanze ^1H e ^{13}C NMR di **2** come dedotta da esperimenti di correlazione eteronucleare protone-carbonio diretta e long range (^1H , ^{13}C HSQC-DEPT e ^1H , ^{13}C HMBC).

La resa di isolamento di **2** è stata del 49%.

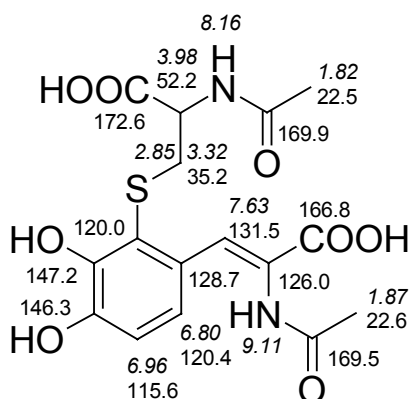


Figura 18. Assegnazione delle risonanze NMR protoniche e del carbonio di **2**.

Riduzione di **2**. Sintesi dell'acido 2-acetilammino-3-[2-(2-acetilammino-2-carbossietiltilio)-3,4-diidrossifenil]propanoico (**3**)

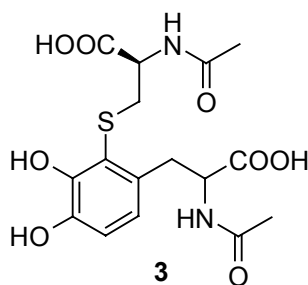
La necessità di ottenere la 2-*S*-CD con la configurazione dei centri chirali delle due catene amminoacidiche analoga a quella che si osserva nel prodotto naturale ha

fortemente orientato e condizionato la ricerca delle metodologie di riduzione del sistema propenoico di **2**. Infatti se metodi basati sull'uso di metalli in acidi (Zn in acido acetico o Sn in acido cloridrico) potevano sembrare una scelta di elezione, considerando anche la presenza delle funzioni acetamidiche da rimuovere nell'ultimo stadio della sintesi, la necessità di effettuare una riduzione stereoselettiva ha fatto preferire piuttosto procedimenti basati sull'idrogenazione catalitica.

In una prima serie di esperimenti è stata valutata la possibilità di utilizzare una catalisi eterogenea, che permettesse un facile allontanamento del catalizzatore al termine della reazione. Inizialmente la riduzione è stata effettuata sull'intera miscela ottenuta nello stadio precedente piuttosto che sul prodotto purificato, nell'intento di effettuare un unico stadio di purificazione al termine dell'intera procedura sintetica. Utilizzando una bomba di idrogenazione capace di realizzare pressioni di H₂ anche molto elevate (fino a 100 atm), la reazione è stata condotta in metanolo in presenza di Pd supportato su carbone (Pd-C 10%). Tuttavia, pur adottando condizioni di reazione piuttosto drastiche, anche dopo 18 h non si è osservata una riduzione apprezzabile. Per verificare se la mancata riduzione fosse dovuta alle caratteristiche del doppio legame, la reazione di idrogenazione è stata condotta sull'acido **1**, prima dell'aggiunta della *N*-acetil-L-cisteina. Su tale sistema la reazione ha avuto luogo nel corso di 2 h in maniera quantitativa, come evidenziato dall'analisi LC/MS della miscela di reazione. Su questa base si è ritenuto che le difficoltà nella riduzione di **2** potessero essere attribuite alla presenza di specie interferenti nella miscela, per esempio *N*-acetil-L-cisteina residua o prodotti derivanti dalla sua ossidazione nelle condizioni di reazione. È noto infatti che composti solforati hanno la capacità di avvelenare i catalizzatori utilizzati nelle idrogenazioni.²⁴ Pertanto in una serie successiva di esperimenti la riduzione è stata effettuata sul prodotto **2** accuratamente purificato mediante HPLC preparativa come confermato dall'analisi LC/MS, che ha evidenziato la completa rimozione della *N*-acetil-L-cisteina residua e di un altro componente significativo della miscela, identificato come il disolfuro corrispondente. Tuttavia, anche in tali condizioni, non si è osservata un'idrogenazione significativa.

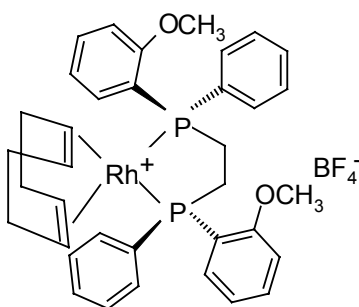
Alla luce di questi esperimenti è sembrato ragionevole concludere che l'ingombro sterico offerto dal sostituente in posizione 2 dell'anello catecolico fosse tale da impedire l'avvicinamento della porzione propenoica della molecola al sito catalitico. Nelle prove

successive è stato pertanto utilizzato un catalizzatore omogeneo, il cloruro di tris(trifenilfosfina)rodio(I), noto anche come catalizzatore di Wilkinson. In questo caso, conducendo la reazione in metanolo ad una pressione di H₂ di 50 atm, è stata osservata una riduzione quantitativa in 18 h. L'analisi HPLC della miscela di idrogenazione ha rivelato la presenza di due prodotti in rapporto 1:1, identificati mediante analisi LC/MS e ¹H NMR come i due diastereoisomeri del prodotto atteso (**3**). Il rapporto di formazione dei prodotti indica che la catena della *N*-acetil-L-cisteina non è in grado di indurre alcuna stereoselezione nell'addizione di idrogeno.



La reazione di idrogenazione in fase omogenea è stata effettuata anche sulla miscela grezza ottenuta dall'ossidazione di **1** in presenza di *N*-acetil-L-cisteina. Tuttavia, anche in questo caso, pur con rapporti catalizzatore/prodotto elevati, si è avuta soltanto una parziale idrogenazione, per cui nello sviluppo della procedura sintetica lo stadio di purificazione cromatografica deve necessariamente precedere la riduzione della catena propenoica.

Al fine di ottenere soltanto il prodotto **3** con la configurazione dei centri chirali delle catene amminoacidiche analoga a quella della 2-*S*-CD naturale si è scelto di utilizzare un catalizzatore omogeneo chirale. Da un'analisi della letteratura è stato riconosciuto come adatto allo scopo il tetrafluoroborato di (*R,R*)-(-)-1,2-bis[(*o*-metossifenil)fenilfosfino]etano(1,5-cicloottadiene) rodio(I).



Tale catalizzatore è infatti ampiamente utilizzato per la riduzione asimmetrica di acidi α -amilamminoacrilici, portando alla formazione dell'enantiomero con configurazione *S*, sia nel caso dell'isomero *Z* che dell'isomero *E*. Nel caso dell'acido α -acetilamminocinnammico l'isomero *E* viene idrogenato con un eccesso enantiomerico del 47%, mentre l'isomero *Z* è idrogenato 100 volte più velocemente e con un eccesso enantiomerico del 94%.²⁵ Questo agente catalitico presenta inoltre il vantaggio di essere disponibile in commercio, per cui non è necessario sintetizzarlo.

La reazione di idrogenazione di **2** è stata condotta in metanolo ad una pressione di H₂ di 50 atm. E' stata osservata una completa riduzione dopo 72 h in presenza del 3% in moli di catalizzatore.

Idrolisi acida di 3

La miscela di idrogenazione è stata ridotta a piccolo volume per allontanamento del solvente sotto vuoto e sottoposta a idrolisi in HCl 3 M, a riflusso, per 5 h, in atmosfera di Ar. L'uso di un'atmosfera controllata si è reso necessario per evitare processi ossidativi cui danno luogo le cisteinildopa in ambiente fortemente acido.²⁶ Al termine della reazione la miscela è stata lasciata raffreddare e si è osservata la precipitazione del catalizzatore, insolubile nel mezzo acquoso, che è stato così allontanato per semplice filtrazione. La miscela ottenuta dall'idrolisi è stata quindi analizzata per HPLC (Figura 19). La 2-*S*-CD con la configurazione dei centri chirali analoga a quella del composto naturale è stata identificata mediante coiniezione con uno standard derivante dalla reazione di addizione della L-cisteina al dopachinone.¹⁶ L'eccesso diastereoisomerico è risultato pari all'86%.

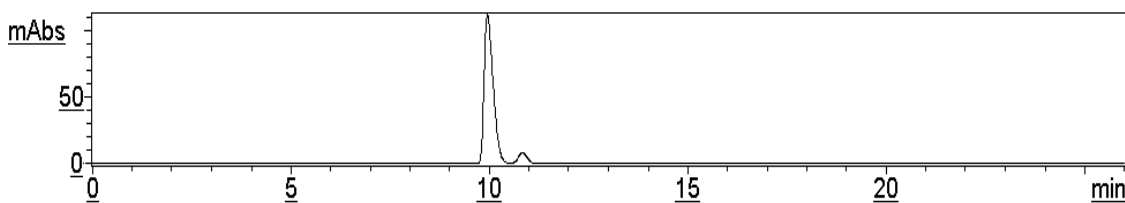


Figura 19. Profilo elutografico della miscela di idrolisi acida di **3** da riduzione con il catalizzatore chirale.

La 2-*S*-CD è stata ottenuta come solido incolore per trattamento del residuo della miscela di idrolisi disciolto in etanolo con acetato di etile, con una resa dell'87%.

Chimica ossidativa della 2-S-CD e analisi di feomelanine sintetiche

Dopo aver messo a punto la procedura di sintesi, è stato effettuato un esame sistematico della reattività ossidativa in condizioni biomimetiche della 2-S-CD in confronto a quella della 5-S-CD, nonché un'analisi mediante degradazione chimica di feomelanine sintetiche preparate a partire dai due isomeri separati o da loro miscele, allo scopo di fornire una possibile interpretazione per la formazione di BTCA e 2-BTCA in rapporto 1:1 nelle miscele di degradazione di feomelanine naturali.

L'ipotesi che il rapporto BTCA/2-BTCA possa riflettere il rapporto di formazione delle cisteinildopa regioisomeriche *in vivo* sembra, infatti, in prima istanza da escludere. Una serie di studi sull'ossidazione della L-dopa con tirosinasi in presenza di L-cisteina, riconosciuta come reazione modello per la biosintesi delle cisteinildopa, ha infatti mostrato che la 5-S-CD e la 2-S-CD si formano invariabilmente in rapporto 5:1. In tale rapporto, d'altra parte, esse vengono anche rinvenute nei fluidi fisiologici, ad esempio nell'urina.²⁷ E' chiaro, tuttavia, che altri meccanismi di controllo enzimatico potrebbero essere operativi nella regolazione della biosintesi delle cisteinildopa nei feomelanociti.

Un'interpretazione alternativa del risultato osservato nelle miscele di degradazione dei pigmenti naturali potrebbe basarsi sulla diversa tendenza all'ossidazione delle due cisteinildopa regioisomeriche. L'analisi HPLC a vari tempi di una miscela di autossidazione dei due isomeri in quantità equimolari ha evidenziato una velocità di consumo paragonabile per i due composti. Con altri sistemi ossidanti il consumo delle cisteinildopa è risultato così rapido da non permettere determinazioni cinetiche affidabili. Tale risultato, tuttavia, è indicativo soltanto di una paragonabile tendenza all'ossidazione dei due isomeri, ma non fornisce alcun dato sulla stabilità relativa dei prodotti generati nel processo ossidativo. In studi precedenti di ossidazione delle due cisteinildopa mediante radiolisi ad impulsi era stata, in effetti, osservata una vita media notevolmente differente per i relativi *o*-chinoni.²⁸ In particolare il chinone della 2-S-CD decadeva più velocemente e mostrava una maggiore velocità di ciclizzazione, suggerendo una maggiore reattività della 2-S-CD negli stadi iniziali della feomelanogenesi. Su questa base, il rapporto 1:1 osservato tra il BTCA e il 2-BTCA potrebbe riflettere una differente partecipazione delle due cisteinildopa alla formazione del polimero feomelanico.

Analisi di feomelanine sintetiche

Per determinare il contributo della 2-S-CD e della 5-S-CD nella biosintesi delle feomelanine sono stati preparati diversi pigmenti sintetici per ossidazione dei due regioisomeri in condizioni biomimetiche. Le melanine sono state, quindi, sottoposte alla stessa procedura di degradazione ossidativa utilizzata per le feomelanine naturali, ovvero con perossido di idrogeno all'1.5% in idrossido di sodio 1 M per 24 h.¹⁴ Le miscele di degradazione così ottenute sono state analizzate mediante HPLC per stimare le rese relative di formazione del BTCA e del 2-BTCA.

In una prima serie di esperimenti sono state ottimizzate le condizioni di ossidazione per la preparazione di feomelanine sintetiche a partire da una miscela equimolare di 2-S-CD e 5-S-CD. Si è scelto di utilizzare come ossidanti sistemi enzimatici coinvolti nei processi di feomelanogenesi *in vivo*, quali tirosinasi/O₂ e perossidasi/H₂O₂.^{14,29} Dalla degradazione di una feomelanina preparata per ossidazione con tirosinasi il BTCA e il 2-BTCA sono stati ottenuti in rapporto 3:1 (Figura 20). La discrepanza osservata tra il rapporto di formazione dei due acidi benzotiazolici e quello delle cisteinildopa di partenza può essere interpretata sulla base di dati di letteratura, secondo i quali la 5-S-CD è un miglior substrato per la tirosinasi e viene ossidata in maniera preferenziale rispetto alla 2-S-CD.³⁰

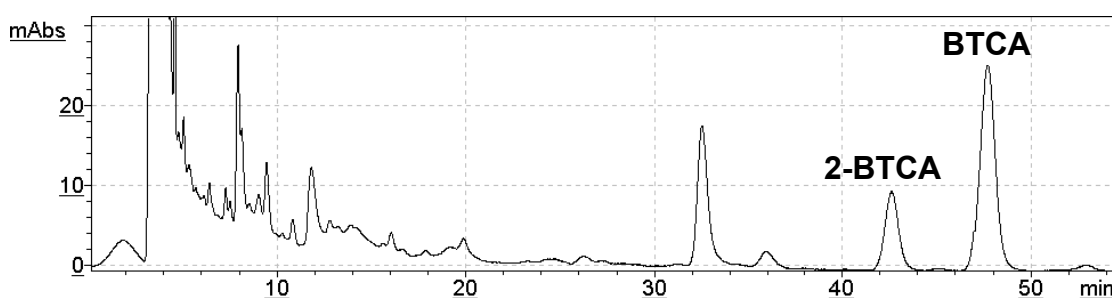


Figura 20. Profilo elutografico della miscela di degradazione di una feomelanina sintetica preparata da una miscela equimolare di 2-S-CD e 5-S-CD con tirosinasi/O₂.

Negli esperimenti successivi la preparazione di feomelanine sintetiche è stata quindi effettuata con il sistema perossidasi/H₂O₂,¹⁴ che ha portato alla formazione, a seguito di degradazione, del BTCA e del 2-BTCA in rapporto 2:1, evidenziando

nuovamente una maggiore ossidabilità della 5-S-CD. Anche interrompendo la reazione di ossidazione negli stadi iniziali, per esaltare eventuali differenze di reattività tra i due isomeri, non si sono osservate variazioni significative nel rapporto tra i due acidi benzotiazolici.

Al fine di mimare quanto più possibile le condizioni di formazione dei pigmenti feomelaninici *in vivo*, in altri esperimenti l'ossidazione delle due cisteinildopa in quantità equimolari è stata condotta con perossidasi/H₂O₂ in presenza di ioni Zn²⁺, uno dei metalli maggiormente presente nella cute e nei capelli, in cui si rinviene in concentrazioni fino a 200 µg/g.³¹ La degradazione del pigmento così preparato non ha portato, tuttavia, a sostanziali differenze nelle rese relative di formazione dei due acidi benzotiazolici, che sono stati ottenuti in rapporto 2:1.

Dopo aver esaminato il comportamento ossidativo della 2-S-CD e della 5-S-CD in miscela, si è passati a valutare le caratteristiche di pigmenti preparati a partire da ciascun isomero separatamente. Le rese relative di 2-BTCA e BTCA da una melanina da 2-S-CD e da una da 5-S-CD preparate con perossidasi/H₂O₂, rispettivamente, sono risultate paragonabili.

Avendo osservato un differente comportamento delle due cisteinildopa separatamente o in miscela, è stata quindi esaminata la degradazione ossidativa di una miscela di una feomelanina da 2-S-CD e di una da 5-S-CD in rapporto 1:5, ovvero nello stesso rapporto in cui si presume si formino *in vivo* le due cisteinildopa. In queste condizioni gli acidi benzotiazolici sono stati ottenuti in rapporto 1:5, riflettendo il rapporto tra le due feomelanine di partenza.

In un'altra serie di esperimenti sono stati valutati gli effetti di vari parametri sulla reazione di degradazione della miscela delle due feomelanine in rapporto 1:5. Inizialmente la degradazione è stata effettuata in condizioni 5 volte più diluite, al fine di mimare quanto più possibile le condizioni di degradazione di una melanina isolata da fonti naturali, dal momento che quest'ultima contiene in realtà solo il 20% in peso di pigmento, a causa della forte aggregazione con la matrice proteica che ne impedisce una rimozione completa per digestione enzimatica dei tessuti.²⁶ In tali condizioni si è avuto un incremento nella resa di formazione del BTCA da parte della melanina da 5-S-CD, con conseguente ottenimento del BTCA e del 2-BTCA in rapporto 7:1.

Un'inversione di tendenza si è invece osservata conducendo la reazione di degradazione in presenza di ioni Zn^{2+} (2.5 mg di solfato di zinco eptaidrato per 5 mg di pigmento): l'analisi HPLC ha infatti evidenziato la presenza del BTCA e del 2-BTCA in rapporto 4:1, che è variato ulteriormente fino a 3:1 quadruplicando la quantità di solfato di zinco.

In una fase finale dello studio è stato esaminato l'effetto del tempo di reazione della degradazione ossidativa sulle rese relative degli acidi benzotiazolici. La feomelanina da 2-S-CD e quella da 5-S-CD sono state degradate in miscela in rapporto 1:5, effettuando diversi prelievi nel tempo. L'analisi HPLC ha evidenziato una più rapida formazione del 2-BTCA rispetto al BTCA (Tabella 2).

Tabella 2. Rese relative di formazione del BTCA e del 2-BTCA nel tempo dalla degradazione di una miscela di una feomelanina da 2-S-CD e di una da 5-S-CD in rapporto 1:5.

Tempo (h)	BTCA: 2-BTCA
1	3.0:1
4.5	3.9:1
10	4.0:1
20	5.2:1

Come si può osservare, nel caso dei pigmenti sintetici il rapporto tra gli acidi benzotiazolici più simile a quello ottenuto dalla degradazione per 24 h di una feomelanina naturale si riscontra dopo solo 1 h. Questo dato potrebbe essere interpretato considerando che la degradazione del pigmento naturale, profondamente inglobato nella matrice proteica, può avere luogo solo dopo una sostanziale disgregazione della cheratina.

Chimica ossidativa della 2-S-CD

Allo scopo di valutare eventuali differenze di reattività tra la 2-S-CD e la 5-S-CD e quindi la diversa tendenza a prendere parte alla formazione del pigmento feomelanico, è stato effettuato un esame della chimica ossidativa della 2-S-CD nelle stesse condizioni in cui è stata effettuata la preparazione dei pigmenti sintetici.

E' noto che in tali condizioni la 5-S-CD va incontro a ciclizzazione della catena della cisteina formando un intermedio *o*-chinonimminico (QI) che evolve preferenzialmente per decarbossilazione portando alla 2*H*-1,4-benzotiazina (BTZ)⁸

(Figura 21) (capitolo 4). In presenza di ioni Zn^{2+} il decorso dell'ossidazione è modificato e la formazione di un complesso con QI favorisce la generazione della 2*H*-1,4-benzotiazina carbossilata (BTZCA).³² Tale intermedio può seguire differenti percorsi di reazione: l'aggiunta di H_2O e successiva ossidazione e decarbossilazione danno luogo ad una 3-ossodihydrobenzotiazina (ODHB),³³ che non subisce ulteriori trasformazioni; alternativamente il BTZCA può dimerizzare attraverso una reazione di accoppiamento ossidativo con formazione di 2,2'-bibenzotiazine, caratterizzate da un legame semplice tra le posizioni 2 di due unità benzotiaziniche (Figura 21)²⁶ (capitolo 4).

Su questa base, in una prima serie di esperimenti l'ossidazione della 2-*S*-CD è stata condotta in presenza di ioni Zn^{2+} , considerando anche che i pigmenti sintetici preparati o degradati in presenza del metallo sono risultati tra quelli con le caratteristiche più simili alle feomelanine naturali (pag. 30). La 2-*S*-CD è stata ossidata in concentrazione 12 mM a pH 6.8 con perossidasi/ H_2O_2 in presenza di 1.2 equivalenti molarli di ioni Zn^{2+} . La miscela di reazione è stata analizzata nel tempo mediante LC/MS in modalità ESI+.

In Figura 22 è mostrato il profilo TIC della miscela di reazione dopo 10 min. La miscela presentava quattro prodotti principali, eluiti a 29.8 (**a**), 32.5 (**b**), 35.5 (**c**) e 36.8 (**d**) min. I composti **a** e **c** erano caratterizzati da ioni pseudomolecolari $[M+H]^+$ a m/z 313 e 327, rispettivamente, mentre i prodotti **b** e **d** mostravano ioni pseudomolecolari $[M+H]^+$ a m/z 311 e 325. La differenza di due unità nei pesi molecolari lasciava supporre che questi ultimi fossero i corrispondenti prodotti di ossidazione di **a** e **c**. A conferma di tale ipotesi, i composti **b** e **d** scomparivano a seguito di riduzione della miscela con $NaBH_4$ per dar luogo ad **a** e **c**.

E' da notare che la formazione di prodotti con ioni pseudomolecolari analoghi a quelli dei prodotti **a-d** non è mai stata osservata per reazione della 5-*S*-CD in una varietà di condizioni ossidanti.

L'analisi della miscela di reazione a 1 h mostrava un consumo di **a** e **c**, con il concomitante aumento di **b** e **d** e la comparsa di altri due prodotti principali a t_R 16.3 e 26.2 min (Figura 23). Il primo era caratterizzato da uno ione pseudomolecolare $[M+H]^+$

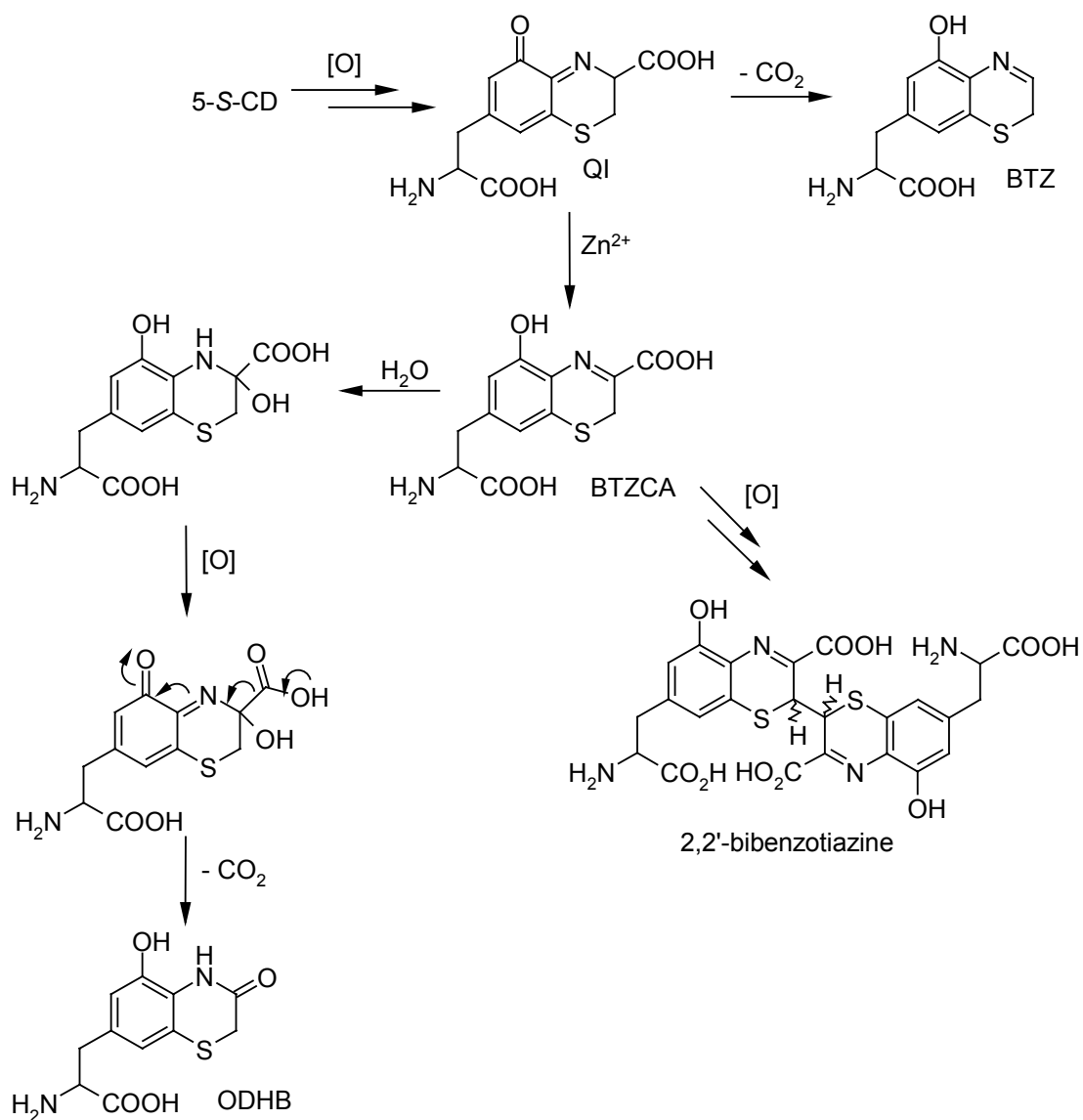


Figura 21. Reazione di ossidazione della 5-S-CD con perossidasi/H₂O₂.

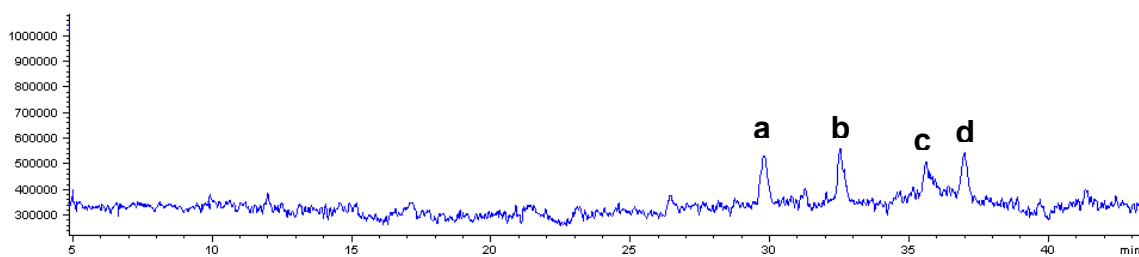


Figura 22. Profilo TIC della miscela di ossidazione della 2-S-CD con perossidasi/H₂O₂ in presenza di ioni Zn²⁺ ad un tempo di reazione di 10 min.

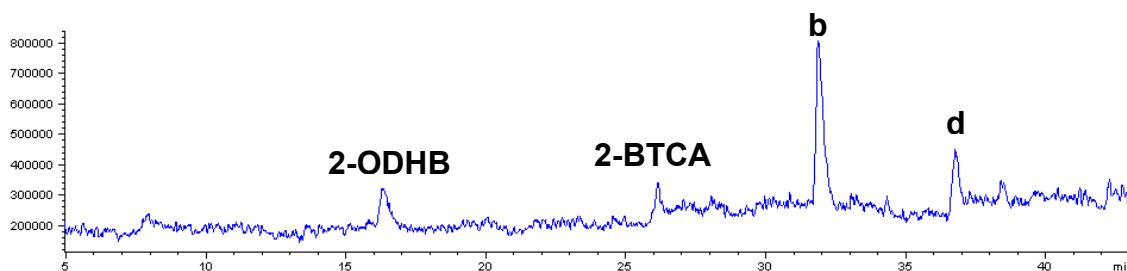
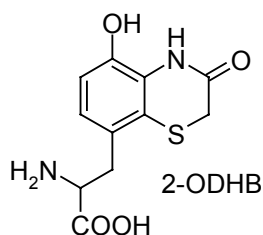


Figura 23. Profilo TIC della miscela di ossidazione della 2-S-CD con perossidasi/H₂O₂ in presenza di ioni Zn²⁺ ad un tempo di reazione di 1 h.

a m/z 269, per cui è stato ipotizzato che si trattasse della 8-(2-ammino-2-carbossietil)-5-idrossi-3-osso-3,4-diidro-1,4-benzotiazina (2-ODHB), analoga alla ODHB ottenuta dalla ossidazione della 5-S-CD.^{8,33}



Il prodotto eluito a 26.2 min è stato invece identificato come il 2-BTCA (ione pseudomolecolare $[M+H]^+ = 283$ m/z) per confronto con il composto isolato dalla miscela di degradazione di un campione di feomelanina naturale. Da notare che la 5-S-CD, nelle stesse condizioni di reazione, non porta alla formazione del BTCA in quantità significative.

L'analisi della miscela di ossidazione a tempi successivi mostrava una graduale diminuzione dei composti **b** e **d**, accompagnata da un aumento della 2-ODHB e del 2-BTCA, che raggiungevano la massima concentrazione ad un tempo di 3 h (Figura 24), senza andare incontro ad ulteriori evoluzioni.

Per valutare l'effetto degli ioni Zn²⁺ sul decorso dell'ossidazione della 2-S-CD, in altri esperimenti la reazione è stata condotta in assenza di metallo. Non è stata, tuttavia, apprezzata alcuna variazione significativa nella distribuzione dei prodotti, diversamente da quanto osservato per la 5-S-CD (capitolo 4).

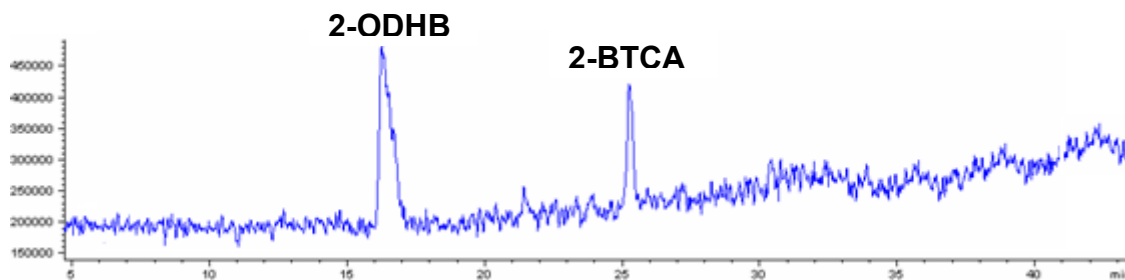


Figura 24. Profilo TIC della miscela di ossidazione della 2-*S*-CD con perossidasi/H₂O₂ in presenza di ioni Zn²⁺ ad un tempo di reazione di 3 h.

Sulla base delle conoscenze relative alla chimica ossidativa della 5-*S*-CD sono state avanzate delle ipotesi strutturali e meccanicistiche per i prodotti di ossidazione della 2-*S*-CD. La formazione della 2*H*-1,4-benzotiazina carbossilata (2-BTZCA) (Figura 25) rappresenterebbe lo stadio iniziale dell'ossidazione, come confermato dalla presenza di un prodotto caratterizzato da uno ione pseudomolecolare [M+H]⁺ a *m/z* 297 nelle prime fasi della reazione (non mostrato). L'aggiunta di H₂O e successiva ossidazione e decarbossilazione darebbero quindi luogo alla 2-ODHB, secondo un meccanismo analogo a quello precedentemente descritto per la formazione della ODHB dalla 5-*S*-CD (Figura 21).

Alternativamente, l'ossidazione del 2-BTZCA seguita da addizione di H₂O in posizione 2 porterebbe alla formazione di un emtiochetale, corrispondente verosimilmente al prodotto **a**, che per ulteriore ossidazione darebbe luogo alla 2-ossobenzotiazina **b**. Quest'ultima potrebbe quindi subire addizione di H₂O in posizione 2 e successivamente andare incontro ad una reazione di contrazione d'anello dell'unità benzotiazinica, portando ad un derivato benzotiazolico che per decarbossilazione ossidativa darebbe infine luogo al 2-BTCA (Figura 25). Un meccanismo analogo era stato precedentemente ipotizzato per la formazione di acidi 6-idrossibenzotiazolcarbossilici dai corrispondenti intermedi benzotiazinici.³⁴ E' da notare che nel caso della 5-*S*-CD la contrazione di intermedi benzotiazinici a dare il BTCA è stata osservata soltanto in condizioni di ossidazione drastiche (ad es. NaOH/H₂O₂).¹³

La differenza di 14 unità tra gli ioni pseudomolecolari [M+H]⁺ dei prodotti **c** e **d** rispetto ad **a** e **b**, rispettivamente, suggerisce l'aggiunta di un atomo di ossigeno attraverso una via ossidativa. Si potrebbe, pertanto, ipotizzare un'ossidazione a carico

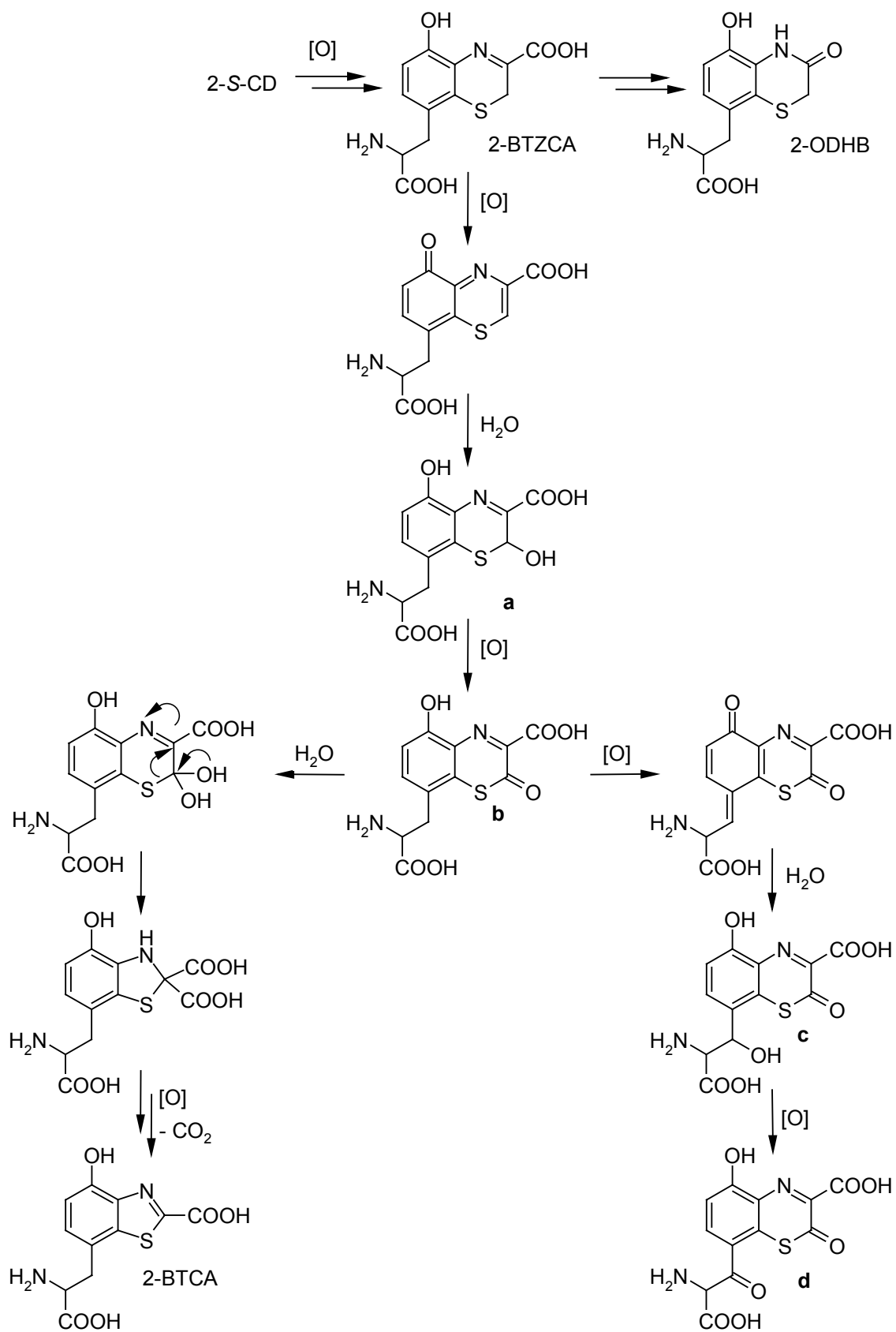


Figura 25. Meccanismo proposto per l'ossidazione della 2-S-CD.

dell'anello fenolico di **b**, seguita da addizione di H₂O sulla posizione benzilica con formazione di un idrossiderivato (**c**) suscettibile di ulteriore ossidazione per dare **d** (Figura 25).

Le ipotesi strutturali e meccanicistiche avanzate per i prodotti di ossidazione della 2-*S*-CD si basano esclusivamente sulle informazioni ottenute dall'analisi LC/MS delle miscele di reazione e su quanto descritto in letteratura riguardo alla chimica ossidativa della 5-*S*-CD, e necessitano pertanto di ulteriori conferme attraverso l'isolamento e la completa caratterizzazione degli intermedi osservati. Sulla base dei dati preliminari a disposizione è chiaro, tuttavia, che le due cisteinildopa presentano reattività significativamente differenti. In particolare la 2-*S*-CD ha mostrato una spiccata tendenza alla formazione del 2-BTCA in condizioni di rilevanza fisiologica, diversamente da quanto osservato nel caso della 5-*S*-CD.

In un'ultima serie di esperimenti la reazione di ossidazione della 2-*S*-CD è stata condotta in presenza di quantità equimolari di 5-*S*-CD, allo scopo di verificare se la reattività ossidativa della prima sia in qualche modo influenzata dalla presenza del regioisomero nella stessa miscela di reazione, condizione che può effettivamente verificarsi nel processo di feomelanogenesi *in vivo*.

L'analisi LC/MS della miscela dopo 3 h ha evidenziato la presenza della 2-ODHB, del 2-BTCA e dei prodotti **b** e **d** di ossidazione della 2-*S*-CD, accanto alla ODHB (*t_R* 21.6 min) e ai derivati 2,2'-bibenzotiazinici (*t_R* 37.7, 38.2, 39.9 min) della 5-*S*-CD (Figura 26). Il decorso della reazione di ciascuna cisteinildopa non sembra, quindi, essere in alcun modo influenzato dalla presenza dell'altro regioisomero.

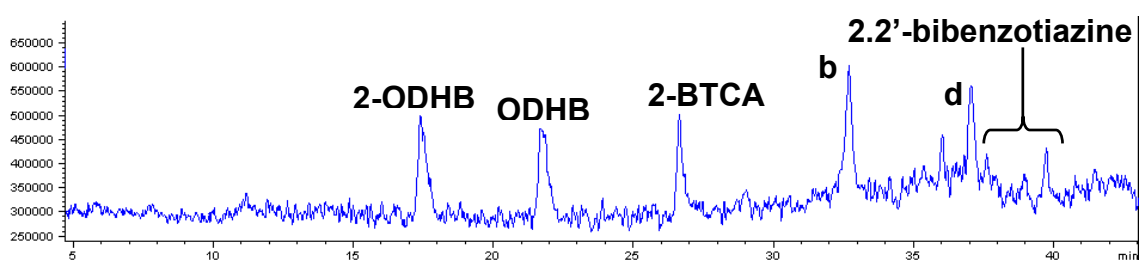


Figura 26. Profilo TIC della miscela di ossidazione della 2-*S*-CD e della 5-*S*-CD in quantità equimolari con perossidasi/H₂O₂ in presenza di ioni Zn²⁺ ad un tempo di reazione di 3 h.

Sintesi del 2-BTCA

La reattività ossidativa della 2-*S*-CD caratterizzata nei precedenti esperimenti ha suggerito una strategia per un facile ottenimento del 2-BTCA, un composto di potenziale interesse come *marker* strutturale delle feomelanine.

E' noto che i sistemi 2*H*-1,4-benzotiazinici subiscono contrazione di anello a benzotiazoli in condizioni acide ed alcaline,^{34,35} processo probabilmente responsabile anche della formazione del BTCA e del 2-BTCA nella reazione di degradazione delle feomelanine in condizioni alcaline. Sono state pertanto inizialmente messe a punto le condizioni di formazione della 3-carbossi-1,4-benzotiazina 2-BTZCA per ossidazione della 2-*S*-CD, su cui indurre successivamente la reazione di contrazione di anello.

L'ossidazione della 2-*S*-CD è stata condotta con ferricianuro di potassio in tampone fosfato a pH 7.4 in presenza di ioni Zn²⁺. L'analisi LC/MS ha evidenziato un consumo completo della 2-*S*-CD dopo 20 min, con formazione del 2-BTZCA come prodotto principale.

E' stata quindi valutata la possibilità di effettuare la reazione di contrazione dell'anello benzotiazinico in ambiente basico. L'alcalinizzazione della miscela con NaOH 6 M, seguita dopo 20 min da acidificazione per interrompere la reazione, ha portato alla formazione di due composti principali, come evidenziato dall'analisi HPLC (Figura 27).

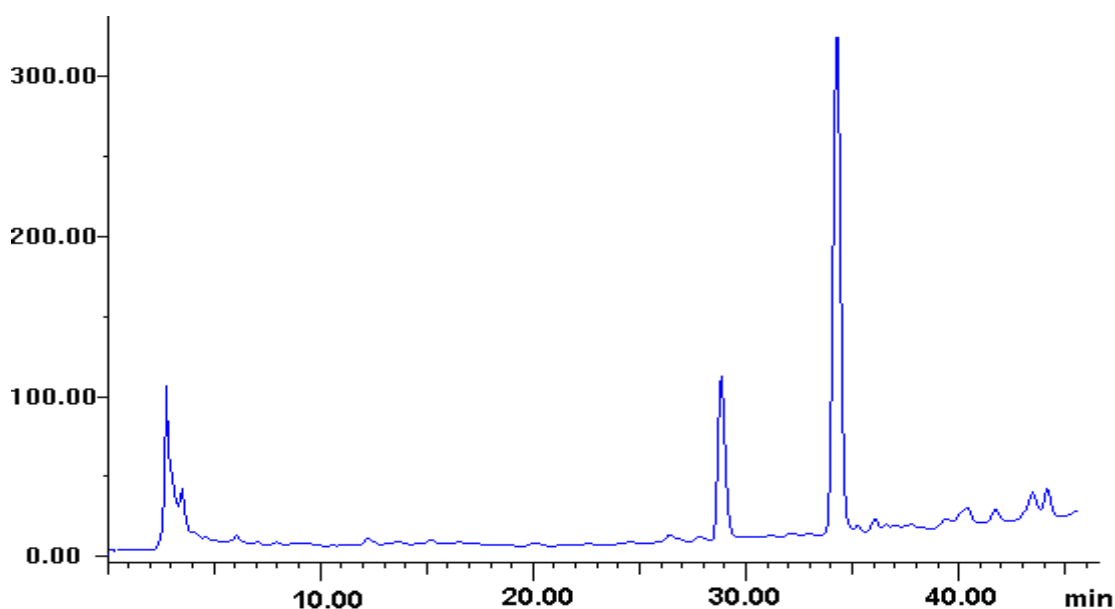


Figura 27. Profilo di eluizione della miscela di preparazione del 2-BTCA con NaOH 6 M.

La reazione è stata quindi condotta su scala preparativa e la miscela frazionata mediante HPLC. Da analisi LC/MS e ^1H NMR il prodotto a 34.5 min è stato identificato come il 2-BTCA. Il prodotto eluito a 29.0 min è stato invece identificato come la 2-ODHB sulla base dello ione pseudomolecolare $[\text{M}+\text{H}]^+$ a m/z 269. Questa procedura non è apparsa, quindi, soddisfacente per la preparazione del 2-BTCA, date le basse rese di isolamento dovute alla formazione della 2-ODHB e di materiale polimerico. Nell'ipotesi che questi ultimi derivassero dalle condizioni fortemente alcaline utilizzate, in esperimenti successivi la miscela di reazione è stata trattata con una base più debole, quale una soluzione di NH_3 17 M. In queste condizioni, tuttavia, è stata osservata una maggiore formazione della 2-ODHB, a fronte di una minore resa di 2-BTCA.

Su questa base, in una seconda serie di esperimenti è stata considerata la possibilità di indurre la reazione di contrazione dell'anello benzotiazinico per acidificazione. Le migliori rese di formazione del 2-BTCA sono state ottenute per aggiunta di HCl 12 M, unitamente a persolfato di sodio. L'aggiunta di un ossidante efficace in ambiente acido è stata necessaria in quanto la formazione del 2-BTCA richiede uno stadio ossidativo ulteriore dopo la generazione dell'intermedio 2-BTZCA. Il profilo HPLC della miscela di reazione è mostrato in Figura 28.

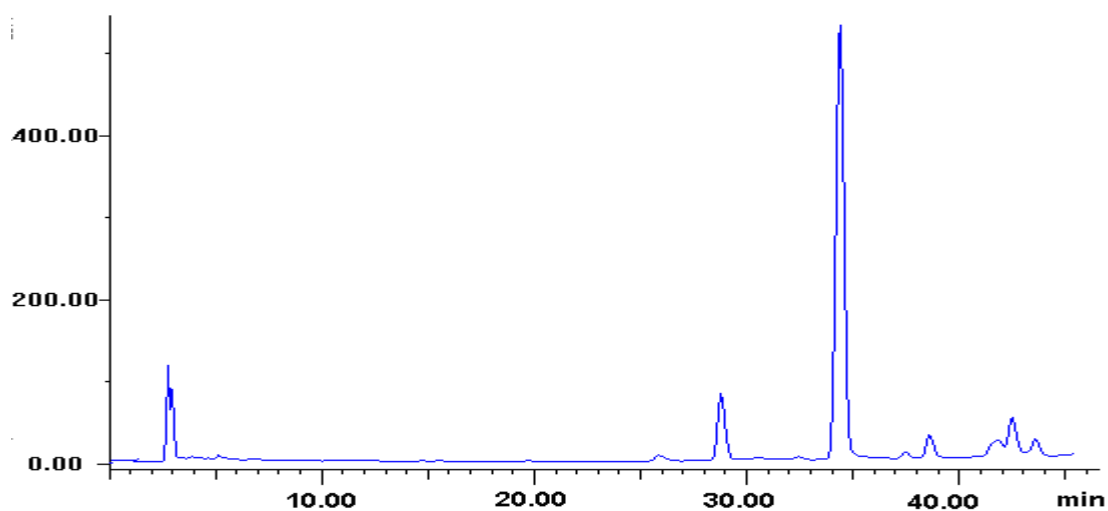
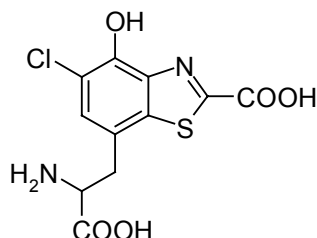


Figura 28. Profilo di eluizione della miscela di preparazione del 2-BTCA con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8/\text{HCl}$ 12 M.

In tali condizioni si osservava tuttavia una diminuzione del 2-BTCA nel tempo, accompagnata dalla formazione di un prodotto a t_R 42.2 min (Figura 29). Tale prodotto è stato isolato per HPLC preparativa e identificato dall'analisi LC/MS e ^1H NMR come un prodotto di clorurazione del 2-BTCA, verosimilmente il 5-cloroderivato.



Per evitare la formazione di tale composto, dovuta probabilmente alla generazione di una specie ossidata del cloro nelle condizioni acide utilizzate, negli esperimenti successivi la reazione è stata interrotta per aggiunta di bisolfito di sodio al momento della massima formazione del 2-BTCA.

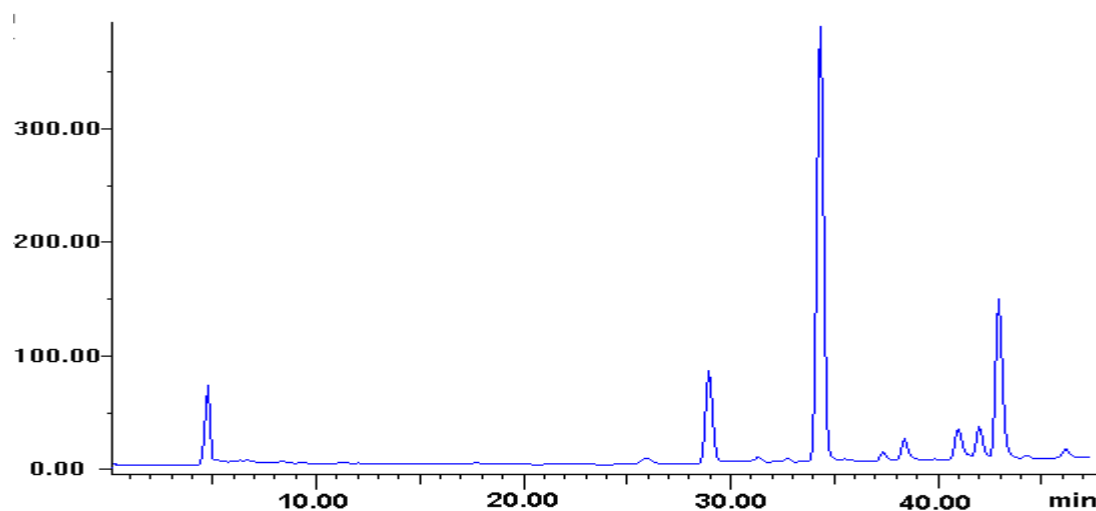


Figura 29. Profilo di eluizione della miscela di preparazione del 2-BTCA con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8/\text{HCl}$ 12 M dopo 24 h.

La reazione è stata condotta su scala preparativa e la purificazione mediante HPLC ha fornito il 2-BTCA con una resa del 45%, che ha reso possibile effettuare una completa caratterizzazione spettroscopica del composto. Lo spettro ^1H NMR presentava nella zona a campi bassi due doppietti ($J = 8.0$ Hz) a δ 6.65 e 7.13, attribuiti ai protoni in posizione *orto* dell'anello aromatico; la zona a campi alti era invece caratterizzata dalla presenza di due doppi doppietti a δ 3.11 ($J = 15.2, 10.4$ Hz) e 3.38 ($J = 15.2, 4.4$ Hz) e di

un doppio doppietto a δ 4.50, attribuiti ai protoni della catena amminoacidica. In Figura 30 è riportata l'assegnazione delle risonanze ^1H e ^{13}C NMR del 2-BTCA come dedotta da tecniche eteronucleari protone-carbonio diretta e long range (^1H , ^{13}C HSQC-DEPT e ^1H , ^{13}C HMBC).

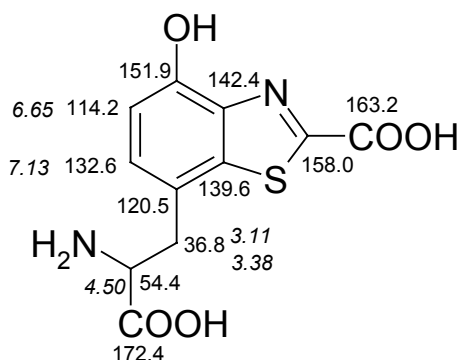


Figura 30. Assegnazione delle risonanze NMR protoniche e del carbonio del 2-BTCA.

Particolarmente interessante è stata l'analisi del potere ottico rotatorio del 2-BTCA, che è risultato inaspettatamente nullo. Ciò può essere attribuito ad un processo di racemizzazione con perdita di chiralità della catena amminoacidica, dovuto a inevitabili equilibri tautomerici della forma ossidata del 2-BTZCA, come mostrato in Figura 31. Una reattività a carico della catena amminoacidica è stata, d'altra parte, ipotizzata anche nel caso della reazione di ossidazione della 2-S-CD con perossidasi/ H_2O_2 (composti **c** e **d**, Figura 25).

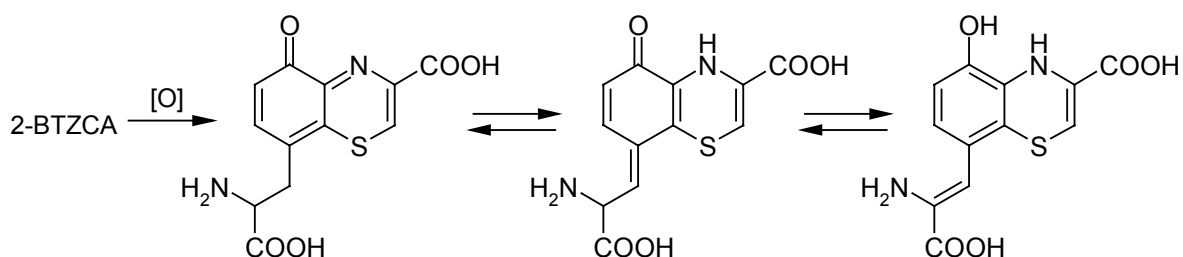


Figura 31. Equilibri tautomerici della forma ossidata del 2-BTZCA.

Su questa base non si può escludere che anche il 2-BTCA di origine naturale si presenti in forma racemica. Non è stato, tuttavia, possibile verificare tale ipotesi, dal

momento che l'isolamento dalle miscele di degradazione di pigmenti naturali porta al composto in rese eccessivamente basse, insufficienti ai fini di un'accurata analisi polarimetrica.

4. RIESAME DEL CROMOFORO DELLE FEOMELANINE

Nonostante numerosi dati clinici ed epidemiologici abbiano mostrato che gli individui dai capelli rossi presentano una maggiore suscettibilità al danno attinico e ai tumori cutanei rispetto ai soggetti eumelanici, una relazione diretta tra le proprietà fotochimiche delle feomelanine e i tumori della pelle non è stata ancora dimostrata. In questo contesto appare pertanto necessaria una definizione dettagliata delle proprietà strutturali dei pigmenti feomelanici.

E' ormai opinione consolidata che le feomelanine siano costituite da unità benzotiaziniche derivanti dall'ossidazione della 5-S-CD,⁸ un'ipotesi che manca tuttavia di un'evidenza sperimentale diretta. Inoltre il termine "benzotiazina" è comunemente associato ad una varietà di unità strutturali, caratterizzate tuttavia da proprietà cromoforiche differenti.

Su questa base, allo scopo di effettuare una valutazione critica delle proprietà spettrofotometriche delle feomelanine, una parte del lavoro di dottorato è stata diretta ad un'analisi comparativa delle proprietà cromoforiche di potenziali precursori dei pigmenti feomelanici generati per ossidazione della 5-S-CD, con l'obiettivo di determinare se e in che grado ognuno di essi possa essere incluso tra i determinanti del cromoforo feomelanico.

In Figura 32 sono mostrati gli spettri di assorbimento in tampone fosfato a pH 7.4 di una feomelanina naturale isolata da capelli rossi e di feomelanine sintetiche prodotte per ossidazione della 5-S-CD con perossidasi/H₂O₂ in presenza o in assenza di Zn²⁺.

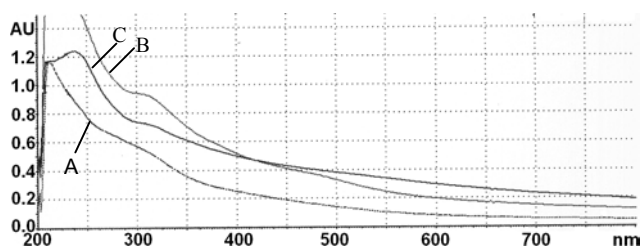


Figura 32. Spettri di assorbimento a pH 7.4 di una feomelanina naturale da capelli rossi (A) e di una feomelanina sintetica da 5-S-CD preparata in presenza (B) o in assenza (C) di Zn²⁺.

L'aggiunta di Zn^{2+} nella miscela di ossidazione è stata effettuata sulla base dei livelli piuttosto alti in cui tale metallo è presente nei capelli rossi³¹ e del suo effetto stabilizzante sul decorso della feomelanogenesi *in vitro*,²⁶ che rende possibile l'identificazione di specie intermedie nelle miscele di reazione attraverso profili cromatografici più netti e definiti.

L'esame degli spettri di assorbimento in Figura 32 mostra una buona similitudine tra i pigmenti naturali e sintetici, tutti caratterizzati da un massimo piuttosto slargato intorno a 305 nm.

Allo scopo di ottenere informazioni sulla natura delle specie responsabili delle caratteristiche cromoforiche dei pigmenti feomelanici, in una serie successiva di esperimenti il decorso delle reazioni di ossidazione della 5-S-CD in presenza o in assenza di Zn^{2+} è stato esaminato mediante spettroscopia di assorbimento UV-visibile. Gli spettri in Figura 33 indicano un marcato effetto dello Zn^{2+} nel rallentare la reazione, rendendo possibile l'identificazione di ben definite "fasi cromoforiche".

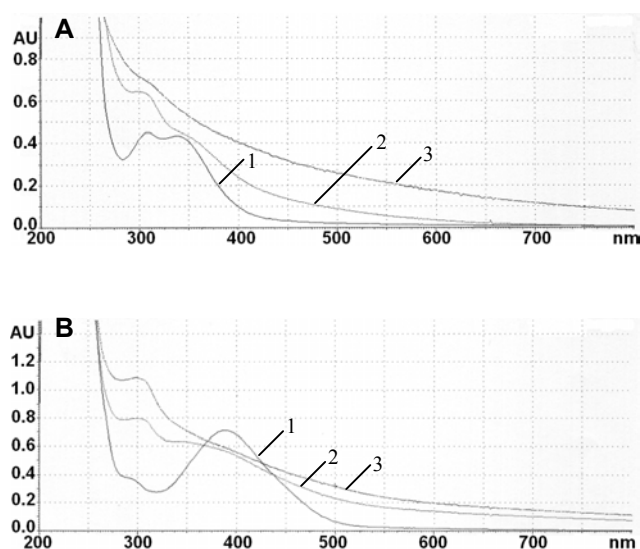


Figura 33. Decorso spettrofotometrico delle reazioni di ossidazione della 5-S-CD in assenza (**A**) e in presenza (**B**) di Zn^{2+} . **A:** traccia 1, 30 s; traccia 2, 5 min; traccia 3, 2 h; **B:** traccia 1, 15 min; traccia 2, 3 h; traccia 3, 24 h.

In particolare, mentre in assenza di Zn^{2+} (Figura 33A) si è osservata la rapida comparsa, in 30 s, di due massimi di assorbimento, uno a 309 nm che persiste dopo 2 h,

e uno a 339 nm che decade invece in pochi minuti, in presenza del metallo (Figura 33B) si è osservato nei primi minuti lo sviluppo di un cromoforo ben definito centrato a 390 nm, che subisce uno spostamento ipsocromico a 337 nm per aggiunta di acido etilendiamminotetraacetico (EDTA), indicando la presenza di un complesso metallico. Nel corso del tempo il cromoforo a 390 nm ha dato luogo a due bande, a 302 e 356 nm, di cui soltanto la prima è risultata persistente dopo 24 h. La centrifugazione della miscela di reazione a questo stadio ha permesso la separazione di un pigmento caratterizzato dallo spettro di assorbimento mostrato in Figura 32; l'analisi UV del surnatante ha rivelato la presenza di un cromoforo con un massimo di assorbimento a 302 nm (non mostrato).

Su questa base, in esperimenti successivi le miscele di ossidazione della 5-*S*-CD sono state analizzate per HPLC e LC/MS in modalità ESI+. Il profilo HPLC della miscela di ossidazione condotta in presenza di Zn²⁺ ad un tempo di reazione di 15 min (Figura 34A) ha mostrato la presenza di un unico prodotto principale (t_R 9.5 min), caratterizzato da un massimo di assorbimento a 340 nm e da uno ione pseudomolecolare [M+H]⁺ a m/z 297 (Figura 34B). La riduzione della miscela con sodio boroidruro ha portato alla formazione di due composti in rapporto 1:1 (Figura 34C, t_R 27.3 e 27.9 min), con massimi di assorbimento a 290 nm e ioni pseudomolecolari [M+H]⁺ a m/z 299. Su questa base, il composto eluito a 9.5 min in Figura 34A è stato identificato come l'acido benzotiazincarbossilico BTZCA **1**, in grado di formare un complesso stabile con lo ione Zn²⁺ (λ_{max} 390 nm, Figura 33B) e suscettibile di riduzione a dare le 3-carbossidiidrobenzotiazine diastereoisomeriche **2**. L'analisi HPLC della miscela di reazione dopo 3 h (Figura 34D) ha mostrato la conversione completa della benzotiazina **1** in svariate specie, tra cui la 3-osso-3,4-diidrobenzotiazina ODHB **3** (traccia inferiore a 280 nm, t_R 25.1 min, [M+H]⁺ m/z 269) e i dimeri 2,2'-bibenzotiazinici diastereoisomerici **4**, eluiti a 40.6, 40.9 e 43.4 min (traccia superiore a 340 nm, [M+H]⁺ m/z 591, Figura 34E). Le assegnazioni strutturali sono state confermate dal comportamento a seguito di riduzione con sodio boroidruro: mentre, infatti, l' ODHB **3** non è risultata suscettibile di riduzione (Figura 34F), come confermato da esperimenti separati sul composto puro, i dimeri **4** hanno dato luogo ai prodotti di riduzione **5** ([M+H]⁺ m/z 595), due dei quali sono stati identificati come le specie eluite a 29.0 e 37.0 min (Figura 34F). L'analisi cromatografica dopo 5 h ha mostrato una graduale

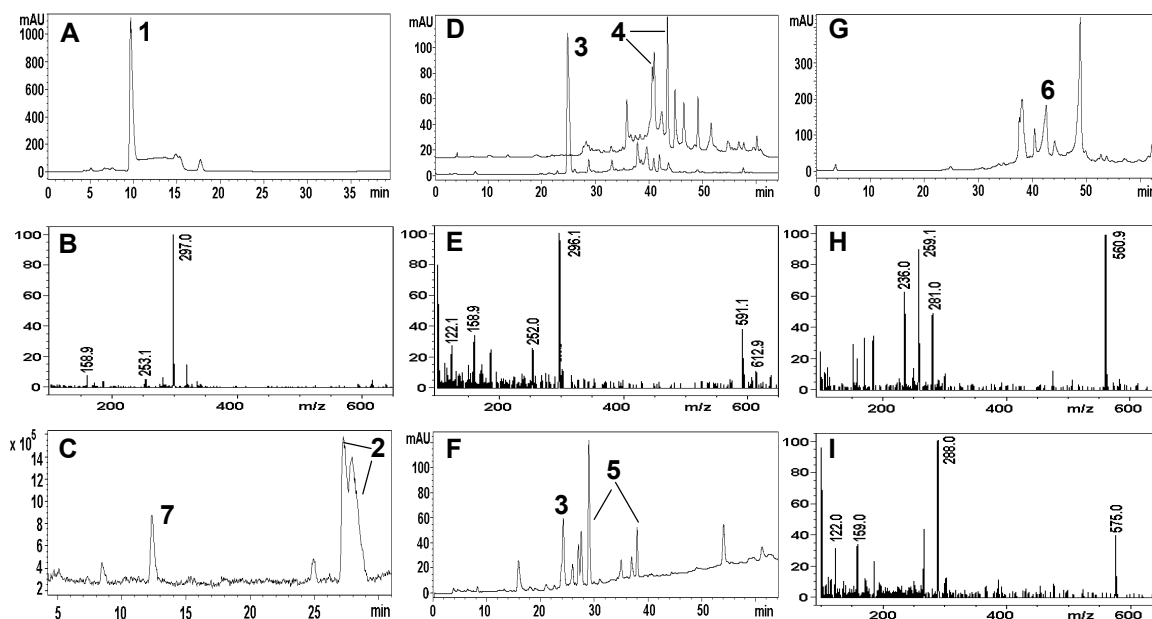
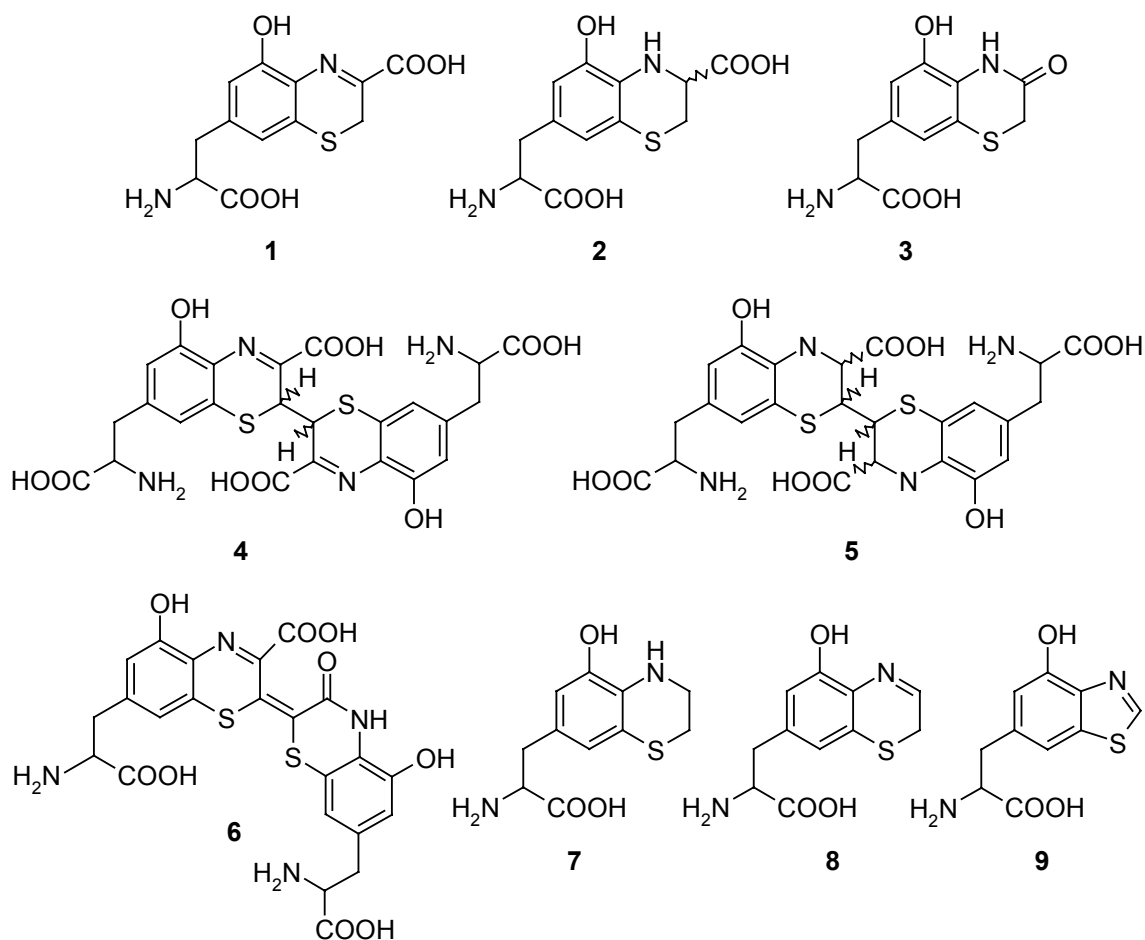


Figura 34. Profili elutografici e spettri ESI+/MS delle miscele di ossidazione della 5-S-CD in presenza di Zn^{2+} . **A:** profilo elutografico della miscela ad un tempo di reazione di 15 min (eluente II, rivelazione a 340 nm); **B:** spettro ESI+/MS del composto eluito a 9.5 min; **C:** profilo LC/ESI+/MS della miscela ad un tempo di reazione di 15 min dopo riduzione con $NaBH_4$ (eluente I); **D:** profilo elutografico della miscela ad un tempo di reazione di 3 h (eluente I, traccia inferiore: rivelazione a 280 nm; traccia superiore: rivelazione a 340 nm); **E:** spettro ESI+/MS dei composti eluiti a 40.6, 40.9 e 43.4 min; **F:** profilo elutografico della miscela ad un tempo di reazione di 3 h dopo riduzione con $NaBH_4$ (eluente I, rivelazione a 280 nm); **G:** profilo di eluizione della miscela ad un tempo di reazione di 5 h (eluente I, rivelazione a 460 nm); **H:** spettro ESI+/MS del composto eluito a 42.9 min; **I:** spettro ESI+/MS del composto eluito a 49.2 min. I picchi elutografici corrispondenti ai composti identificati sono indicati con i numeri di struttura. Le condizioni di eluizione sono descritte nella Parte Sperimentale (capitolo 9).

conversione dei dimeri **4** in una serie di composti non identificati, caratterizzati da un intenso assorbimento a 460 nm (Figura 34G), tra i quali il prodotto eluito a 42.9 min ($[M+H]^+$ m/z 561, Figura 34H) è stato identificato come il tricromato C (**6**) per confronto delle proprietà cromatografiche e cromoforiche con quelle di un campione



autentico.²⁶ La Figura 34I mostra, invece, lo spettro di massa della specie eluita a 49.2 min, caratterizzata da un picco pseudomolecolare $[M+H]^+$ a m/z 575, indicativo di una struttura anch'essa tricocromo-simile. L'analisi HPLC dopo 24 h ha evidenziato la scomparsa dei dimeri **4** e dei tricocromi e la persistenza della ODHB **3**, accanto a prodotti polari non identificati (non mostrato).

La miscela di reazione condotta in assenza di Zn^{2+} dopo 5 min ha mostrato un pattern cromatografico molto poco definito. Tuttavia a seguito di riduzione con sodio boridruro si è osservata la comparsa di un prodotto principale a t_R 12.0 min, identificato come la diidrobentotiazina **7** ($[M+H]^+$ m/z 255), e delle diidrobentotiazine carbossilate diastereoisomeriche **2** in rapporto 3:1 (Figura 35A e 35B). Ciò suggerisce la formazione, nelle fasi iniziali della reazione, della benzotiazina decarbossilata **8**, accanto a piccole quantità del BTZCA **1**. Il fatto che il rapporto tra le diidrobentotiazine diastereoisomeriche **2** sia diverso dall'1:1 atteso dalla riduzione di **1** con sodio boridruro indica che l'isomero di **2** avente la configurazione al C-3 relazionata alla

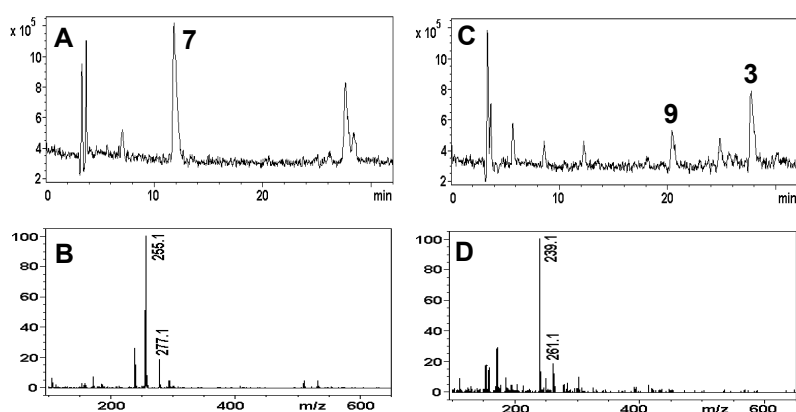


Figura 35. Profili LC/ESI+MS e spettri ESI+MS delle miscele di ossidazione della 5-S-CD in assenza di Zn^{2+} . **A:** profilo LC/ESI+MS della miscela ad un tempo di reazione di 5 min dopo riduzione con $NaBH_4$ (eluente I); **B:** spettro ESI+MS del composto eluito a 12.0 min; **C:** profilo LC/ESI+MS della miscela ad un tempo di reazione di 2 h dopo riduzione con $NaBH_4$ (eluente I); **D:** spettro ESI+MS del composto eluito a 20.3 min. I picchi elutografici corrispondenti ai composti identificati sono indicati con i numeri di struttura. Le condizioni di eluizione sono descritte nella Parte Sperimentale (capitolo 9).

L-cisteina è presente nella miscela di reazione prima della riduzione, come risultato di uno scambio redox tra l'*o*-chinonimmina derivante dalla ciclizzazione della catena cisteinica della 5-S-CD e la 5-S-CD stessa.³⁶ Dopo 1 h (Figura 35C) si è osservata la scomparsa della diidrobenzotiazina **7**, e i componenti principali della miscela dopo riduzione sono risultati la ODHB **3** e un composto a t_R 20.3 min ($[M+H]^+$ m/z 239, Figura 35D), identificato come il benzotiazolo **9** per confronto con un campione autentico.³³ In altri esperimenti è stato effettivamente osservato che, analogamente a **3**, **9** non è suscettibile di riduzione con sodio boroidruo.

Dati i differenti comportamenti dei vari prodotti di ossidazione intermedi nei confronti della riduzione, il trattamento delle feomelanine con sodio boroidruo può fornire informazioni importanti sulla natura delle unità strutturali presenti nel pigmento. Pertanto, in un'altra serie di esperimenti è stato verificato se il trattamento con sodio boroidruo comportasse una variazione del cromoforo del pigmento feomelanico, ed è stato osservato che nelle condizioni in cui la benzotiazina BTZCA **1** si riduce

efficacemente il cromoforo delle feomelanine naturali e sintetiche non andava incontro ad alcuna variazione.

Sulla base degli esperimenti condotti è stato possibile trarre diverse conclusioni. Innanzitutto gli ioni Zn^{2+} sono in grado di influenzare il decorso cinetico, chimico e spettrofotometrico dell'ossidazione della 5-S-CD, favorendo in particolare la ritenzione del gruppo carbossilico negli intermedi benzotiazinici iniziali, ma non modificano in maniera significativa le caratteristiche del pigmento finale, come d'altra parte si può osservare in Figura 32, in cui gli spettri di assorbimento delle feomelanine sintetiche preparate in presenza e in assenza di Zn^{2+} risultano molto simili.

Un altro punto centrale che è emerso dal presente studio è che non tutte le unità "benzotiaziniche" comunemente ritenute presenti nelle feomelanine presentano spettri di assorbimento in accordo con le caratteristiche dei pigmenti finali. In particolare, unità strutturali del tipo 2*H*-1,4-benzotiazinico assorbirebbero a lunghezze d'onda maggiori di 305 nm, massimo di assorbimento caratteristico delle feomelanine. Tali unità, inoltre, andrebbero incontro a spostamento ipsocromico a seguito di riduzione con sodio boroidruro, effetto non osservato sui pigmenti feomelanici. D'altra parte l'assorbimento a 305 nm e la non suscettibilità alla riduzione dell'unità strutturale 3-osso-3,4-diidrobenzotiazinica, presente sia nell'intermedio monomero che nei tricocromi, suggerirebbero un contributo significativo di tale elemento nello scheletro feomelanico. Anche i benzotiazoli assorbono a lunghezze d'onda più basse rispetto alle 2*H*-1,4-benzotiazine e potrebbero, pertanto, ugualmente contribuire al cromoforo delle feomelanine. Inoltre essi non sono riducibili con sodio boroidruro e la loro formazione rappresenta un'altra possibile evoluzione delle 2*H*-1,4-benzotiazine, attraverso una contrazione d'anello.^{33,37,38} In questo contesto vale la pena ricordare che i primi modelli strutturali delle feomelanine incorporavano unità benzotiazoliche e non benzotiaziniche.³⁹⁻⁴¹

In Figura 36 sono mostrati gli spettri di assorbimento della feomelanina naturale e delle ipotetiche unità strutturali presenti nel pigmento. Accanto ai due cromofori principali che renderebbero conto dell'assorbimento intorno ai 300 nm (tracce B e C), le unità 2,2'-bibenzotiaziniche e tricocromiche potrebbero contribuire all'assorbimento a lunghezze d'onda elevate.

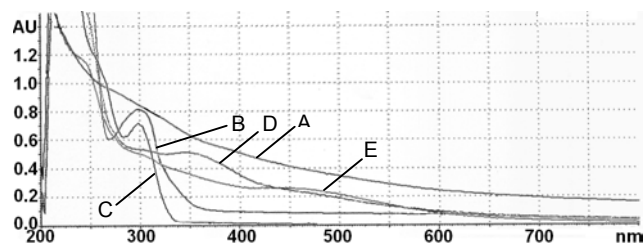


Figura 36. Spettri di assorbimento a pH 7.4 di una feomelanina naturale da capelli rossi (A), della ODHB **3** (B), del benzotiazolo **9** (C), dei dimeri **4** (D) e del tricocromo C **6** (E).

In Figura 37 è mostrato uno schema riassuntivo sull'origine delle principali unità cromoforiche delle feomelanine.

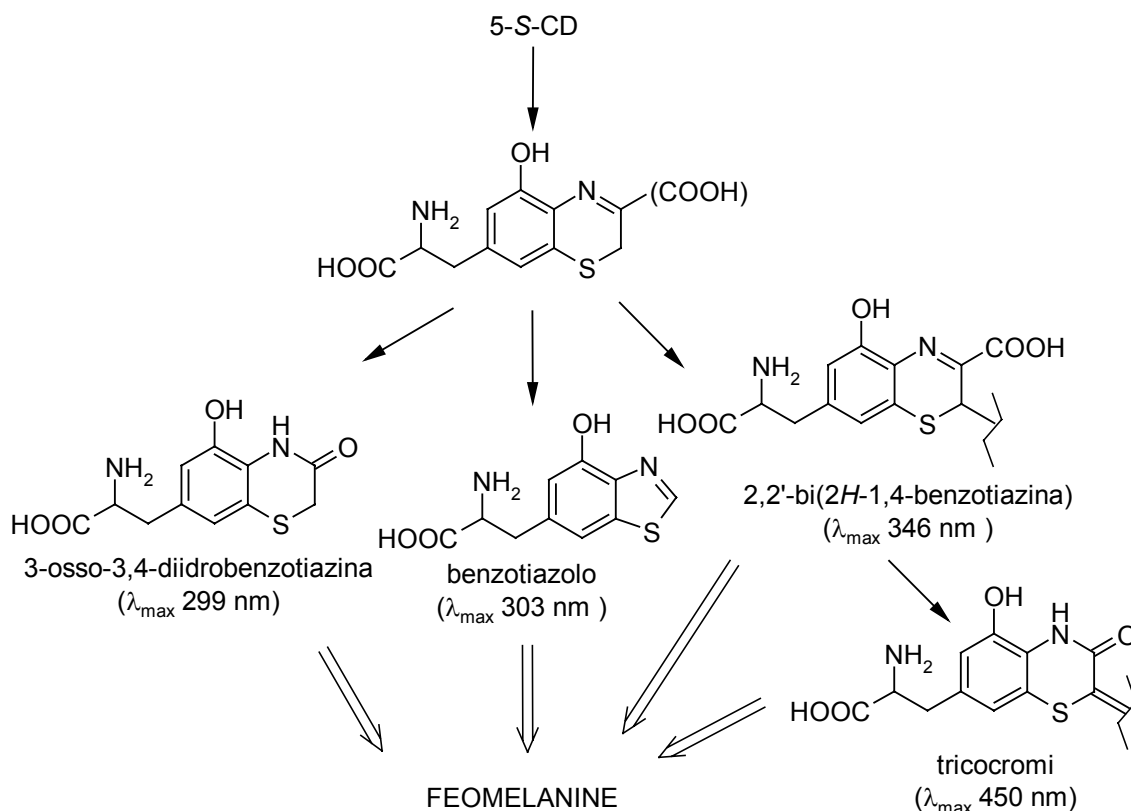


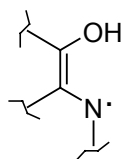
Figura 37. Principali unità cromoforiche presenti nelle feomelanine.

5. CARATTERIZZAZIONE EPR DI FEOMELANINE

Una parte del lavoro di dottorato, condotta in collaborazione con la Jagiellonian University di Cracovia e attualmente ancora in corso, è stata diretta alla caratterizzazione di campioni di feomelanine sintetiche e naturali mediante spettroscopia di risonanza elettronica paramagnetica (EPR). Eumelanine e feomelanine contengono infatti radicali liberi, che possono essere caratterizzati attraverso spettroscopia EPR.⁴²⁻⁴⁵

In particolare sono state prese in esame feomelanine sintetiche preparate per ossidazione della 5-S-CD con il sistema perossidasi/H₂O₂¹⁴ e un campione di feomelanina naturale isolata da capelli rossi. Gli spettri EPR sono stati registrati a 9.5 GHz (banda X) su sospensioni acquose contenenti ca. 2-3 mg/mL di pigmento, a -196 °C per ottenere un buon rapporto segnale/rumore. Tutti i campioni sono stati presaturati con una soluzione di acetato di zinco (concentrazione finale 10 mM, pH finale 4.5) così da incrementare l'intensità del segnale.^{43,46}

In Figura 38 sono mostrati gli spettri EPR della feomelanina naturale (A) e di una feomelanina sintetica preparata per ossidazione della 5-S-CD con perossidasi/H₂O₂ (B), caratterizzati entrambi dalla presenza delle tre bande caratteristiche delle feomelanine, attribuite ad un radicale di tipo semichinonimminico con accoppiamento iperfine con un atomo di azoto:⁴³



In un'altra serie di esperimenti sono stati registrati gli spettri EPR di feomelanine sintetiche preparate per ossidazione della 5-S-CD con perossidasi/H₂O₂ in presenza di ioni Zn²⁺ (capitolo 4). La reazione è stata condotta in presenza di 1.2 equivalenti molariali di Zn²⁺ e interrotta dopo 2 h o 24 h. In Figura 39 sono riportati gli spettri EPR dei pigmenti sintetici così ottenuti.

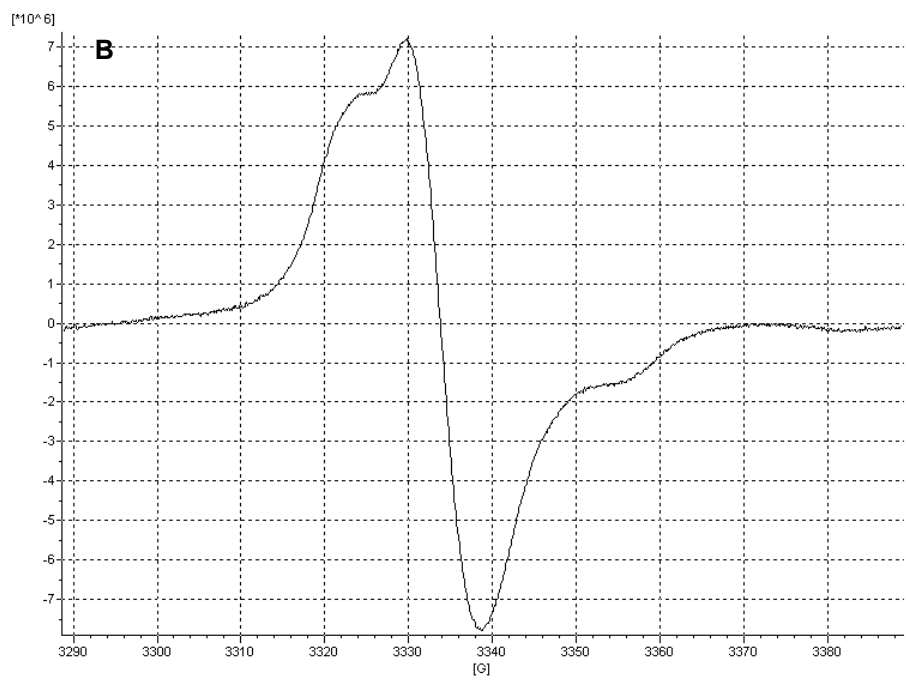
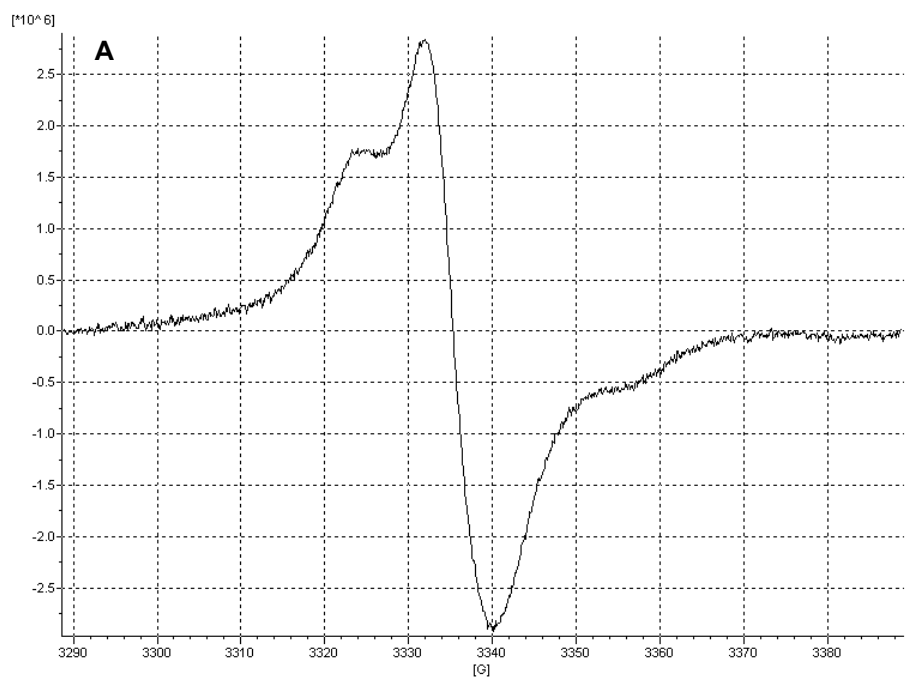


Figura 38. Spettri EPR di una feomelanina isolata da capelli rossi (**A**) e di una feomelanina da 5-S-CD/perossidasi- H_2O_2 (**B**).

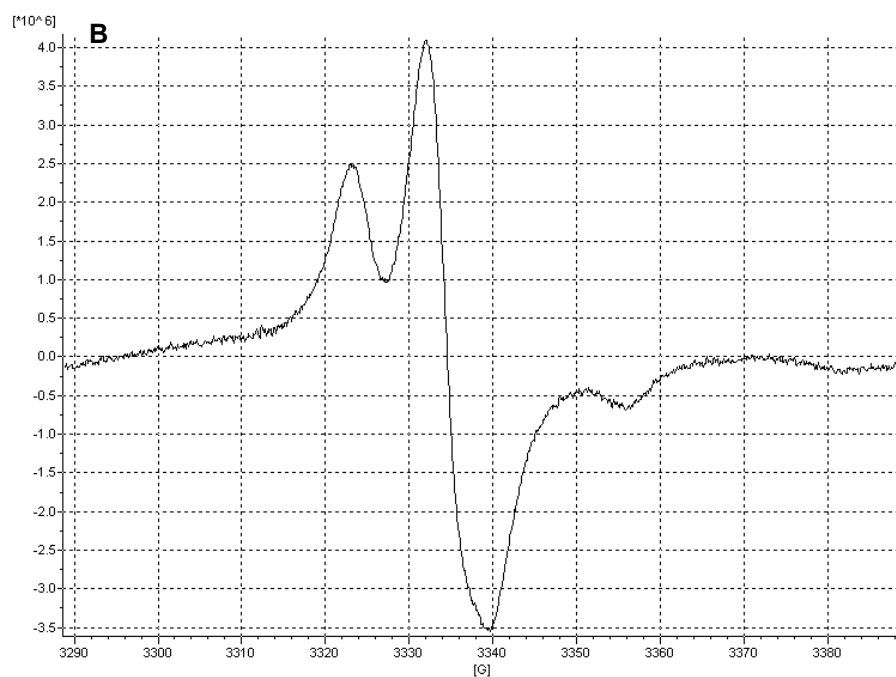
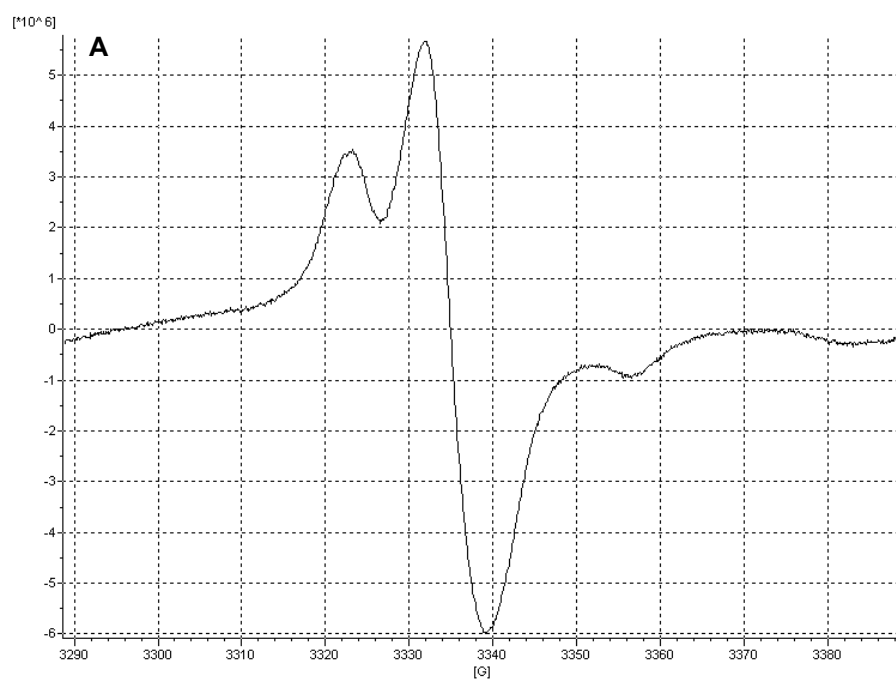
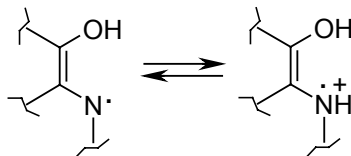


Figura 39. Spettri EPR di una feomelanina sintetica prodotta per ossidazione della 5-S-CD con perossidasi/ H_2O_2 in presenza di ioni Zn^{2+} ad un tempo di 2 h (A) o di 24 h (B).

Gli spettri EPR registrati a pH acidi (1.5) (Figura 40) sono risultati più complessi, in accordo con quanto riportato in letteratura,⁴³ verosimilmente per effetto di un ulteriore accoppiamento iperfine con un protone:



La spettroscopia EPR è stata utilizzata anche per valutare la fotoreattività dei diversi campioni di feomelanine. In particolare sono stati determinati il consumo di ossigeno e la produzione di superossido fotoindotti. Le sospensioni acquose dei pigmenti (1 mg/mL) sono state irradiate con luce blu (390-490 nm) a temperatura ambiente. La variazione della concentrazione di ossigeno nel tempo è stata determinata mediante ossimetria EPR utilizzando l'mHCTPO come *spin probe*.⁴⁷ Per la rivelazione dello ione superossido è stato utilizzato il DMPO come *spin trap*.^{47,48} Per confronto sono state prese in esame anche feomelanine sintetiche preparate da L-dopa e L-cisteina,²⁹ in presenza o in assenza di ioni zinco.

La Figura 41 mostra il consumo fotoindotto di ossigeno (A) e la produzione di superossido (B) per i vari campioni di feomelanine. Il consumo di ossigeno maggiore è stato osservato per le feomelanine sintetiche preparate in presenza di ioni Zn^{2+} , in particolare per la feomelanina da dopa + cisteina + Zn^{2+} ($k = -3.13 \times 10^{-3}$ mM/s) e per quella da 5-S-CD + Zn^{2+} a 2 h ($k = -1.61 \times 10^{-3}$ mM/s). Questa tendenza non è stata riscontrata quando è stata considerata la produzione di superossido, verosimilmente perchè altri meccanismi sono operativi nel consumo di ossigeno fotoindotto.

I risultati ottenuti indicano che gli ioni Zn^{2+} sono in grado di influenzare il decorso delle reazioni di preparazione delle feomelanine sintetiche portando a pigmenti caratterizzati da una maggiore fotoreattività, suggerendo un potenziale ruolo di tale metallo come fattore responsabile delle note proprietà fotosensibilizzanti delle feomelanine.

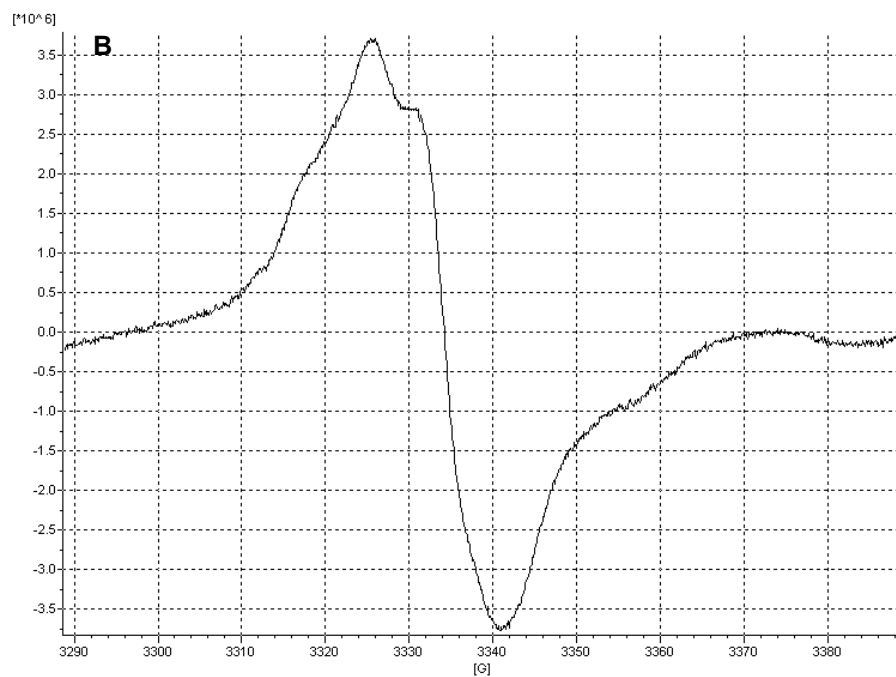
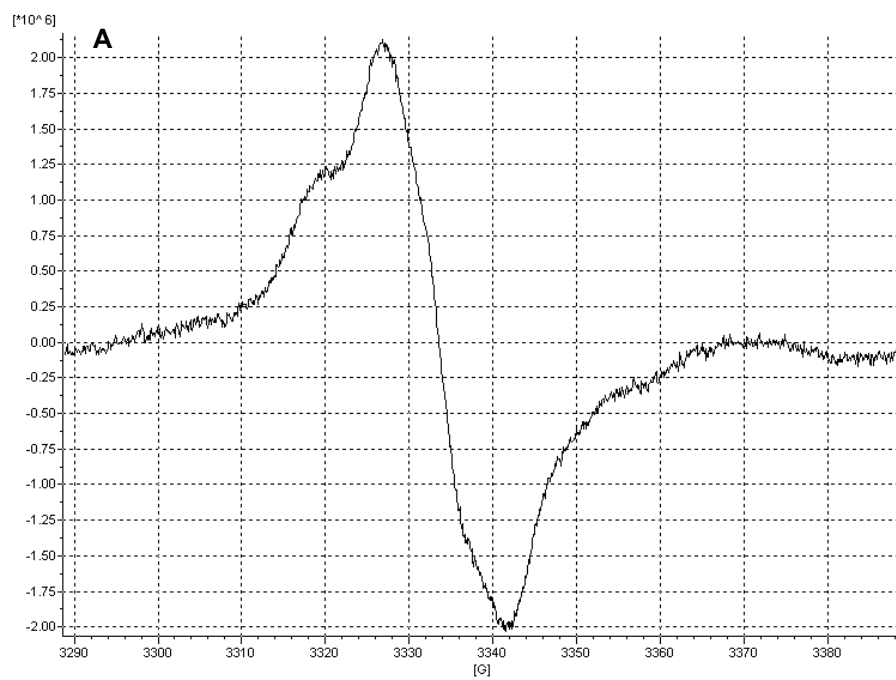
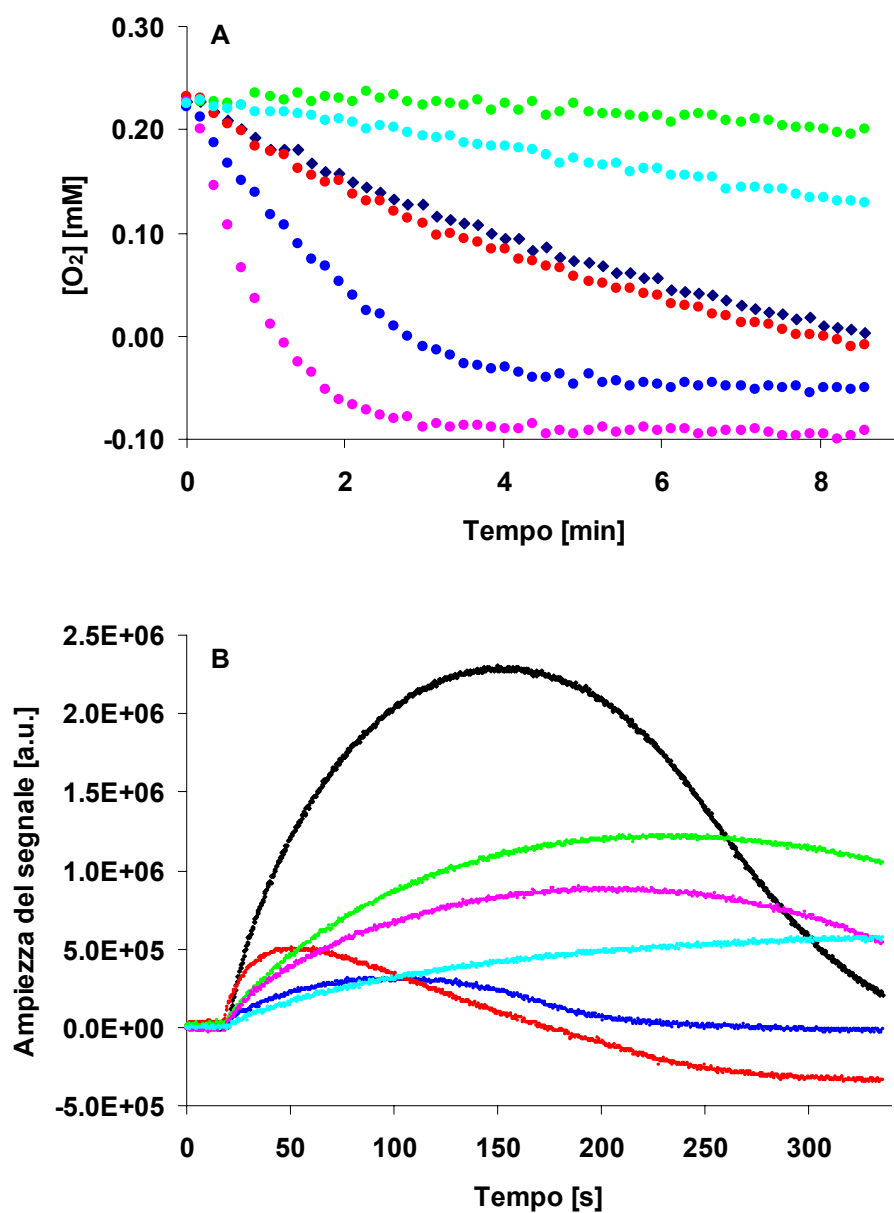


Figura 40. Spettri EPR a pH 1.5 di una feomelanina sintetica prodotta per ossidazione della 5-S-CD con perossidasi/ H_2O_2 in presenza di ioni Zn^{2+} ad un tempo di 2 h (A) o di 24 h (B).



- Feomelanina da 5-S-CD
- Feomelanina da 5-S-CD + Zn^{2+} (2 h)
- Feomelanina da 5-S-CD + Zn^{2+} (24 h)
- Feomelanina da capelli rossi
- Feomelanina da dopa + cisteina
- Feomelanina da dopa + cisteina + Zn^{2+}

Figura 41. Consumo di ossigeno (A) e produzione di superossido (B) a seguito di fotirradiazione dei campioni di feomelanine.

6. VALUTAZIONE DELLA PIGMENTAZIONE ACQUISITA PERSISTENTE COME INDICATORE DELLA CAPACITA' DI FOTOPROTEZIONE INDIVIDUALE

La radiazione UV rappresenta uno dei principali fattori di rischio ambientali nell'insorgenza dei tumori cutanei.⁴⁹ Studi epidemiologici hanno dimostrato che la relazione tra il tempo e la modalità di esposizione alla radiazione solare e l'insorgenza del cancro varia a seconda del tipo di tumore cutaneo. Mentre il carcinoma a cellule squamose è fortemente associato ad un danno attinico cumulativo,⁵⁰ il carcinoma a cellule basali e il melanoma sembrano relazionati principalmente ad episodi intermittenti di esposizione solare intensa.⁵¹⁻⁵³ Inoltre è stato dimostrato che le scottature solari, specialmente durante l'infanzia e l'adolescenza, rappresentano un importante fattore di rischio per il melanoma.⁵⁴

La suscettibilità alla fotocarcinogenesi è spesso associata ad una bassa pigmentazione costitutiva. Il recettore 1 della melanocortina (MC1R) è un regolatore chiave della pigmentazione umana. Varianti genetiche di tale recettore sono associate a capelli rossi e carnagione chiara e diversi studi hanno dimostrato che queste varianti determinano un aumento dello sviluppo di tumori cutanei.^{55,56} Pertanto, mentre il fenotipo dai capelli rossi rappresenta un "marchio" per l'individuazione dei soggetti a rischio, la previsione nell'ambito degli altri fenotipi, in particolare per gli individui di fenotipo intermedio, risulta più complessa. L'incidenza di melanoma e di altri tumori cutanei è tuttavia piuttosto elevata anche per tali gruppi.

Attualmente la metodologia maggiormente adottata per la valutazione della sensibilità ai raggi UV è la classificazione di Fitzpatrick.¹¹ Un'identificazione basata su una riportata tendenza a scottarsi e ad abbronzarsi rappresenta, tuttavia, un criterio piuttosto soggettivo, per cui appare chiaro che un approccio alternativo, basato sulla determinazione di parametri oggettivi quali fototest di vario tipo combinati con la quantificazione dei livelli di melanina, potrebbe fornire un criterio più affidabile per la valutazione della suscettibilità ai raggi UV in individui non facilmente classificabili come soggetti a rischio sulla base delle caratteristiche feno/fototipiche.

Su questa base una parte del lavoro di dottorato è stata diretta ad esaminare la relazione esistente tra la minima dose eritemigena (MED), l'intensità della

pigmentazione acquisita dopo 5, 9 e 16 giorni a seguito di irradiazione con una dose pari a una MED e i livelli di PTCA in un gruppo di individui non feomelanici.

I soggetti scelti (50, 20-46 anni) sono stati divisi in tre gruppi sulla base delle caratteristiche fenotipiche. In particolare quelli (no. 6) con capelli biondi e occhi chiari (blu o verdi) sono stati classificati nel gruppo fenotipico 1, quelli (no. 27) dai capelli castano chiaro nel gruppo 2 e quelli dai capelli castano scuro/neri nel gruppo 3. Il fototipo è stato assegnato sulla base della classificazione di Fitzpatrick:¹¹ 18 individui sono stati classificati come fototipo II, 20 come fototipo III e 12 come fototipo IV.

In Figura 42 sono riportati i livelli di melanina determinati come PTCA vs i tre gruppi fenotipici (A) o i fototipi (B). E' stata osservata una buona correlazione tra i livelli di PTCA e i fenotipi, con differenze significative tra il gruppo 1 (86.8 ± 66 ng/mg) e il gruppo 2 (153.9 ± 64 ng/mg) ($p < 0.01$) e tra il gruppo 2 e il gruppo 3 (289.1 ± 93 ng/mg) ($p < 0.01$). La correlazione è risultata meno evidente, ma comunque significativa, per i fototipi, con $p < 0.01$ tra il fototipo II (131.6 ± 75 ng/mg) e il fototipo III (222.7 ± 113 ng/mg) o IV (258.3 ± 74 ng/mg).

In Figura 43 sono mostrati i valori di MED vs i gruppi fenotipici (A) e i fototipi (B). La MED è risultata maggiore nel gruppo fenotipico 3 (82.5 ± 15 mJ/cm²) che nel gruppo fenotipico 2 (75.0 ± 14 mJ/cm²) ($p = 0.05$), mentre i gruppi 1 (78.8 ± 14 mJ/cm²) e 2 non hanno mostrato differenze statisticamente significative. Nessuna differenza significativa ($p > 0.05$) è stata osservata quando è stata considerata la classificazione in fototipi.

In Figura 44 è riportata l'intensità della pigmentazione sviluppata dopo 5, 9 e 16 giorni a seguito di irradiazione con una dose pari a una MED vs i gruppi fenotipici (A) e i fototipi (B). La risposta pigmentaria è stata determinata con un DermaSpectrometer ed espressa come la differenza (Δ) tra le intensità della pigmentazione finale (acquisita) e iniziale (costitutiva). Soltanto al 16° giorno è stato possibile osservare differenze statisticamente significative tra i gruppi fenotipici, in particolare tra il gruppo 3 (2.7 ± 1.9) e il gruppo 1 (1.1 ± 1.4) ($p < 0.01$) o il gruppo 2 (1.1 ± 1.4) ($p < 0.01$). A nessun tempo è stato invece possibile discriminare tra i gruppi fenotipici 1 e 2. Anche per quanto riguarda i fototipi differenze significative tra i gruppi sono state osservate soltanto al 16° giorno ($p < 0.01$).

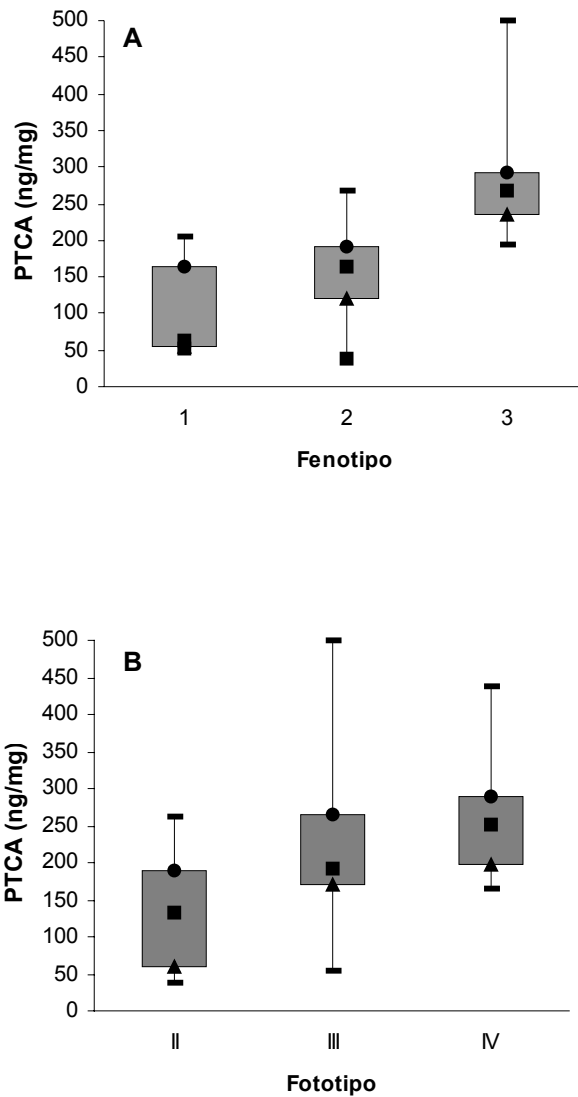


Figura 42. Livelli di PTCA (ng/mg di capelli) vs i gruppi fenotipici (A) o i fototipi (B). ▲: 25° percentile; ■: mediana; ●: 75° percentile; —: valori minimo e massimo.

In Figura 45 i valori di MED sono riportati vs i livelli di PTCA: differenze significative sono state osservate tra individui con livelli di PTCA maggiori o minori di 100 ng/mg ($p < 0.05$). Quando è stata considerata la pigmentazione persistente a 16 giorni (Figura 46) i soggetti con livelli elevati di melanina (PTCA >200 ng/mg) hanno

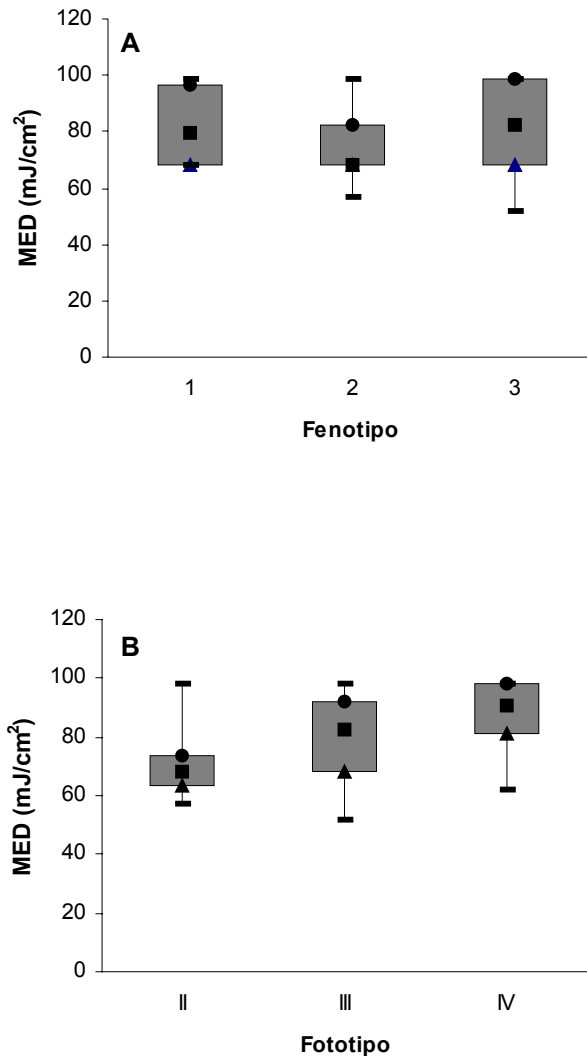


Figura 43. Valori di MED vs i gruppi fenotipici (A) o i fototipi (B). ▲: 25° percentile; ■: mediana; ●: 75° percentile; —: valori minimo e massimo.

mostrato una pigmentazione acquisita significativamente più elevata ($p < 0.01$) rispetto agli individui con bassi livelli di melanina, ma non è stato possibile osservare differenze significative per livelli di PTCA inferiori ai 200 ng/mg.

In conclusione i risultati ottenuti hanno mostrato che una correlazione diretta tra il contenuto di melanina nei capelli e il fenotipo esiste soltanto per il gruppo fenotipico 3, mentre la correlazione tra i livelli di melanina e i fototipi è meno evidente (Figura 42). Né il fenotipo né il fototipo hanno mostrato una correlazione significativa con la sensibilità ai raggi UV misurata in termini di MED (Figura 43): i valori di MED non

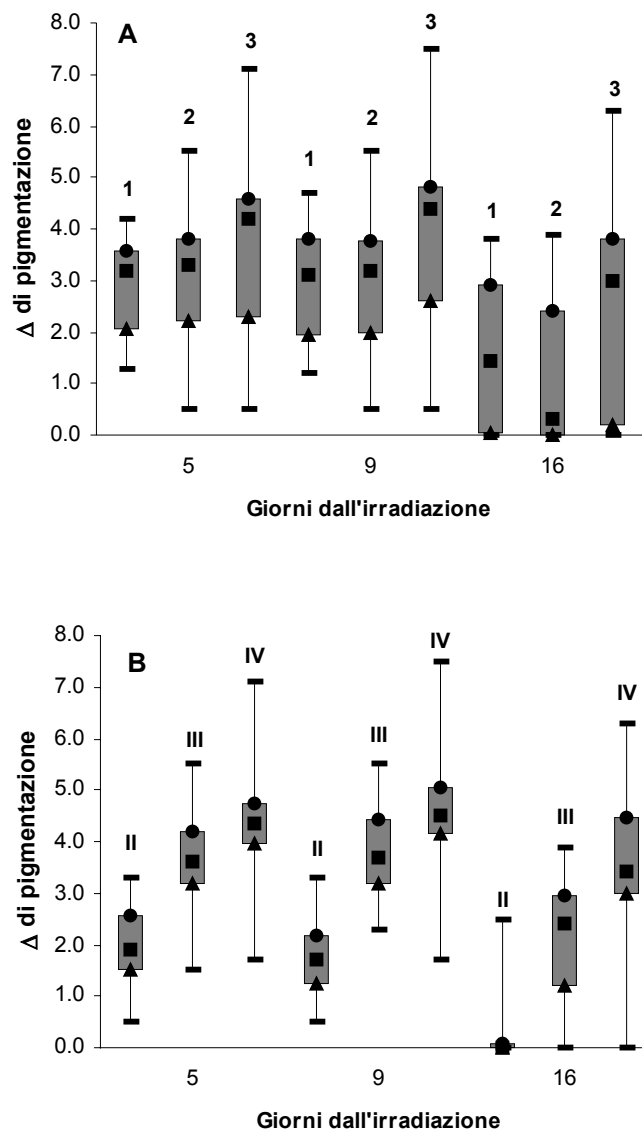


Figura 44. Δ di pigmentazione (differenza tra pigmentazione acquisita e costitutiva) al 5°, 9° e 16° giorno dall'irradiazione vs i gruppi fenotipici (A) o i fototipi (B). \blacktriangle : 25° percentile; \blacksquare : mediana; \bullet : 75° percentile; $-$: valori minimo e massimo.

sono, infatti, risultati significativamente più elevati nel fototipo IV rispetto al fototipo III e al fototipo II, indicando una completa sovrapposizione dei dati anamnestici riguardanti la fotosensibilità con i valori di MED.

I livelli di melanina nei capelli non hanno mostrato una correlazione significativa con la risposta eritemigena (Figura 45). Al contrario, la correlazione tra il contenuto di melanina nei capelli e la tendenza alla pigmentazione (Figura 46) si è dimostrata un parametro affidabile per la valutazione della fotosensibilità individuale: infatti soltanto i soggetti con livelli di PTCA superiori ai 200 ng/mg hanno mostrato una pigmentazione persistente al 16° giorno significativa. Una distinzione così netta non è stata osservata quando è stata considerata la pigmentazione a breve termine (5 giorni).

Nel complesso i risultati ottenuti i) evidenziano che il fenotipo o il fototipo non rappresentano un indice affidabile di fotosensibilità; ii) sottolineano l'importanza dell'identificazione e del dosaggio di melanina nei capelli; iii) suggeriscono che la determinazione della pigmentazione persistente a 16 giorni può rappresentare una metodologia semplice e non invasiva per la valutazione della capacità di fotoprotezione individuale, con particolare riferimento ad esposizioni solari intense ed intermittenti, per soggetti per i quali non è possibile una classificazione diretta sulla base delle caratteristiche fenotipiche o dei dati anamnestici.

7. STUDI COLLATERALI SULLE EUMELANINE

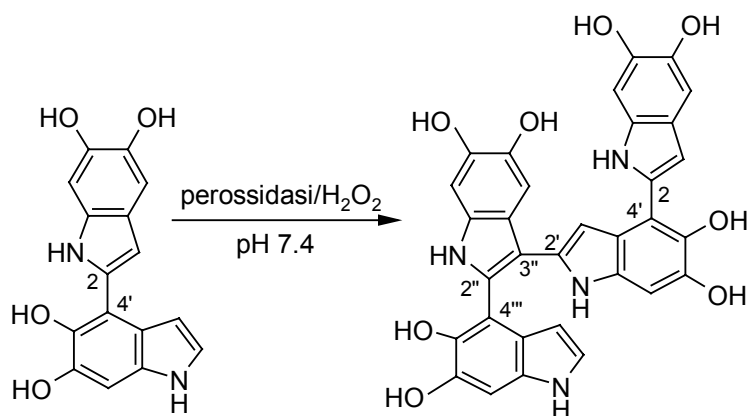
Nel corso del dottorato di ricerca sono stati condotti una serie di studi collaterali volti alla definizione della struttura e dei meccanismi di formazione delle eumelanine. Infatti, sebbene oggetto di studi da oltre un secolo per le numerose implicazioni in campo biomedico ed in cosmetica, le eumelanine rappresentano ancora oggi un problema aperto: le conoscenze sulla loro struttura e biosintesi sono tuttora limitate, a causa della notevole insolubilità di tali pigmenti in tutti i solventi, della loro eterogeneità chimica e della mancanza di una struttura cristallina, fattori che hanno impedito l'applicazione delle comuni tecniche di indagine chimica e spettroscopica. Poco è anche noto sulle relazioni tra la struttura e alcune peculiari proprietà delle eumelanine, quali l'assorbimento di radiazione nell'intero intervallo UV-visibile, un segnale EPR persistente e la capacità di ridursi ed ossidarsi reversibilmente.⁴⁵

La definizione dei meccanismi di formazione delle eumelanine rappresenta, pertanto, un obiettivo di fondamentale importanza per consentire di formulare ipotesi più attendibili sulla struttura e sul ruolo biologico di tali pigmenti.

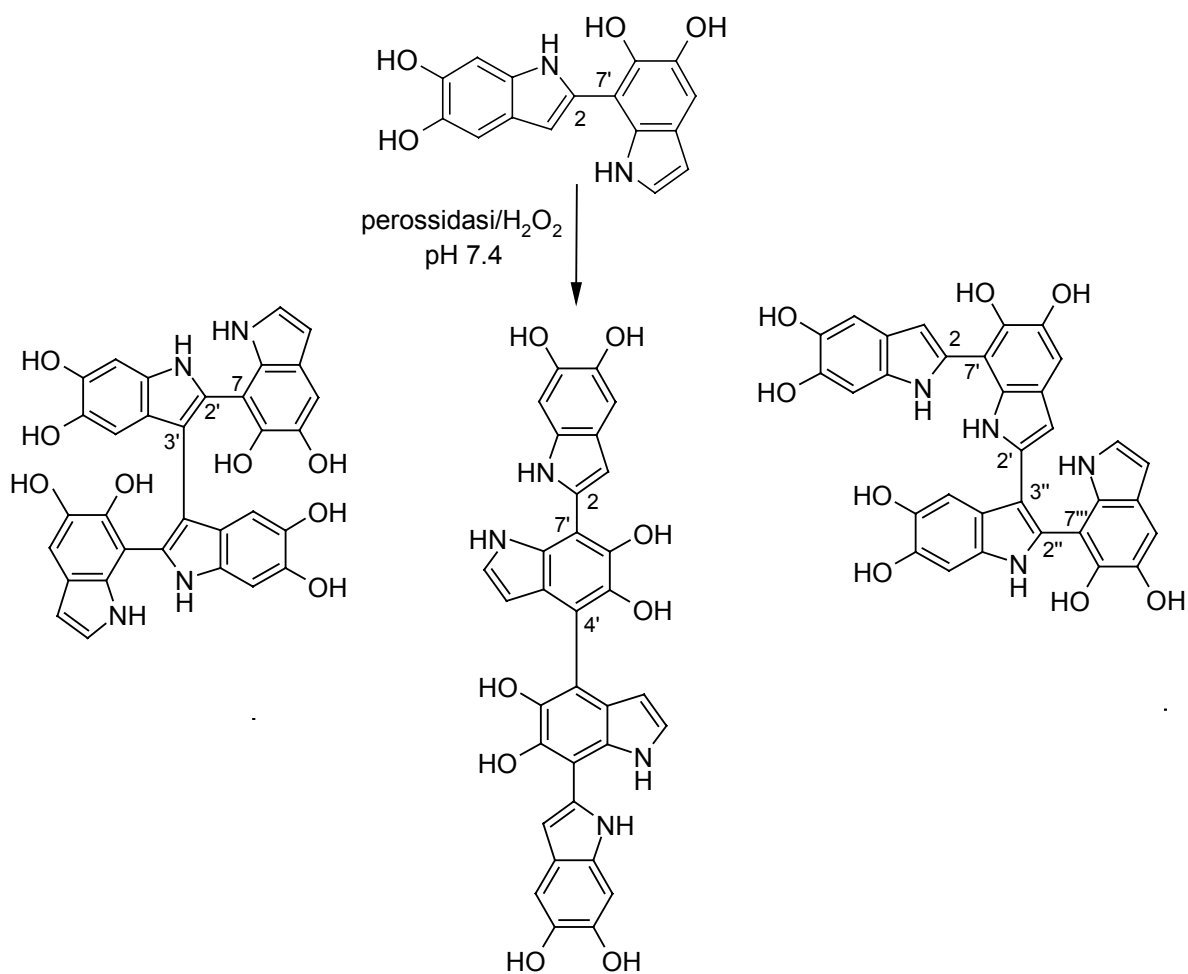
E' opinione ormai consolidata che lo studio del meccanismo di polimerizzazione dei 5,6-diidrossindoli rappresenta uno degli approcci più promettenti per la definizione della struttura e del processo di formazione dei biopolimeri naturali. Negli ultimi anni l'interesse verso tale processo è cresciuto ulteriormente in relazione alle potenziali applicazioni dei polimeri dei 5,6-diidrossiindoli in una varietà di settori attinenti la chimica dei materiali, dai semiconduttori "soft" ai materiali schermanti e ai sistemi fotovoltaici.

Studi precedenti sulla chimica ossidativa del 5,6-diidrossiindolo in condizioni biomimetiche hanno portato all'isolamento e alla caratterizzazione di derivati dimerici e trimerici.⁵⁷ L'ottenimento di informazioni sulla struttura e sulle proprietà di oligomeri superiori è stato ostacolato dalla notevole complessità delle miscele di reazione, dovuta al moltiplicarsi delle specie regioisomeriche al progredire del processo di polimerizzazione ossidativa. Una strategia conveniente per superare tali difficoltà consiste nel ridurre il numero dei possibili regioisomeri degli oligomeri superiori attraverso l'ossidazione di opportuni precursori oligomerici inferiori, ad esempio i dimeri. Questo tipo di approccio ha consentito, nel corso del dottorato di ricerca, di

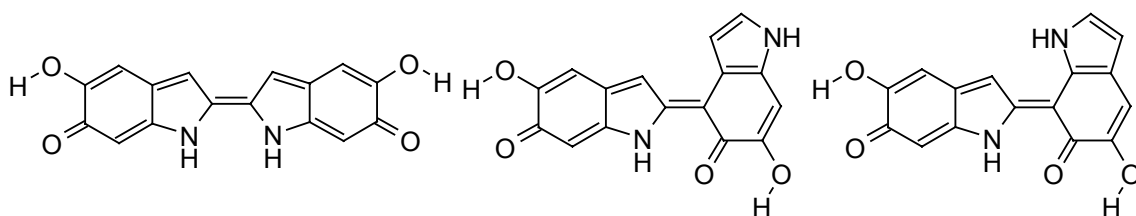
isolare il primo tetramero del 5,6-diidrossiindolo per ossidazione del dimero 5,5',6,6'-tetraidrossi-2,4'-biindolile:



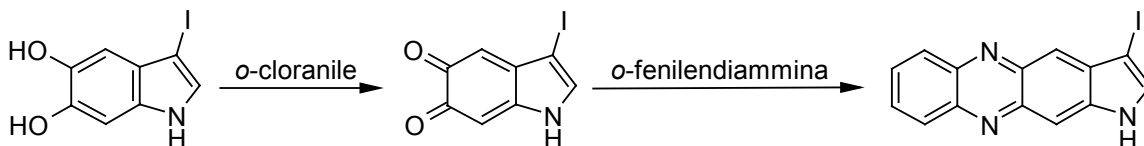
Una reazione analoga condotta sul dimero 5,5',6,6'-tetraidrossi-2,7'-biindolile ha invece portato all'isolamento di tre tetrameri, caratterizzati da legami di tipo 3,3'-, 4,4'-, e 2,3'- tra le unità dimeriche:



Risultati interessanti per quanto concerne i meccanismi di formazione delle eumelanine sono stati ottenuti attraverso l'utilizzo della radiolisi ad impulsi, una tecnica ampiamente utilizzata per la caratterizzazione di intermedi di reazione altamente instabili, quali specie radicaliche e chinoni. In particolare è stata presa in esame l'ossidazione dei dimeri 2,2'-, 2,4'- e 2,7'- del 5,6-diidrossindolo. Gli esperimenti di radiolisi ad impulsi, condotti presso la Free Radical Resarch Facility del laboratorio di Daresbury (UK), hanno mostrato che i dimeri danno inizialmente luogo a semichinoni con massimi di assorbimento a 460-480 nm, che decadono rapidamente con una cinetica di secondo ordine dando luogo a specie caratterizzate da massimi di assorbimento a 490-570 nm. Calcoli quantomeccanici hanno consentito di identificare tali specie come i derivati chinonmetidici estesi 2-sostituiti:



In un'altra serie di studi sono stati presi in esame gli effetti di vari sostituenti sulle proprietà chimiche e spettroscopiche del sistema 5,6-diidrossiindolico. In particolare l'introduzione di un atomo di iodio in posizione 3 ha consentito la caratterizzazione di un 5,6-indolchinone relativamente stabile, attraverso l'uso combinato di intrappolamento chimico, radiolisi ad impulsi e calcoli quantomeccanici. L'ossidazione chimica del 5,6-diidrossi-3-iodoindolo è stata condotta con *o*-cloranile a freddo: è stata osservata la formazione di una specie caratterizzata da massimi di assorbimento a 400 e 600 nm, identificata verosimilmente come il 3-iodo-5,6-indolchinone, che per reazione con *o*-fenilendiammina ha portato alla 3-iodo-1*H*-pirrolo[2,3-*b*]fenazina:



L'ossidazione mediante radiolisi ad impulsi ha portato alla formazione di un semichinone con massimi di assorbimento a 380 e 520 nm, che è andato rapidamente

incontro ad un decadimento di secondo ordine con formazione di una specie caratterizzata dagli stessi massimi di assorbimento del chinone generato chimicamente.

8. CONCLUSIONI

Il presente lavoro di dottorato è stato diretto all'analisi e allo studio delle proprietà strutturali dei pigmenti melanici, con particolare riguardo verso le feomelanine, da sempre considerate responsabili dell'elevata suscettibilità al danno attinico e ai tumori cutanei degli individui di carnagione chiara.

Un primo risultato importante è stato lo sviluppo di una nuova metodologia per l'analisi simultanea di eumelanine e feomelanine nei tessuti pigmentati, un aspetto di particolare interesse dal momento che l'identificazione e la quantificazione del tipo di pigmentazione nella cute e nei capelli rappresenta un utile parametro per l'individuazione di soggetti ad alta predisposizione verso i tumori della pelle. In particolare sono state sviluppate condizioni cromatografiche che rispetto ai metodi precedenti presentano il vantaggio di essere di facile esecuzione e di garantire una buona riproducibilità dei tempi di ritenzione, e che quindi risultano adatte per l'analisi su scala routinaria, in studi su vasti campioni di popolazione.

Nell'ambito dello studio della relazione tra livelli di melanine nei tessuti cutanei e fotosensibilità, risultati interessanti sono stati ottenuti quando è stata esaminata la correlazione esistente tra MED, livelli di PTCA nei capelli e intensità della pigmentazione acquisita a seguito di irradiazione: da tale studio è emerso che la determinazione della pigmentazione persistente a 16 giorni può rappresentare una metodologia semplice e non invasiva per la valutazione della capacità di fotoprotezione individuale in soggetti di fenotipo/fototipo intermedio, non facilmente classificabili come persone a rischio sulla base dei soli dati anamnestici.

Per quanto riguarda gli studi diretti alla definizione della struttura e dei meccanismi di formazione delle feomelanine, degna di nota è stata l'identificazione del 2-BTCA nelle miscele di degradazione di feomelanine naturali, che ha aperto nuove prospettive nello studio del ruolo della 2-S-CD nella biosintesi delle feomelanine. In questo contesto si è inserita la seconda parte del lavoro di ricerca condotto nell'ambito del dottorato, che è stata diretta allo studio della reattività della 2-S-CD allo scopo di ottenere evidenze che potessero fornire un'interpretazione su basi chimiche delle caratteristiche dei pigmenti naturali. A tale scopo è stata preliminarmente sviluppata una nuova procedura di sintesi della 2-S-CD, in 3 stadi e con una resa complessiva del 25%,

del tutto soddisfacente se confrontata con quelle delle procedure precedentemente utilizzate che non superano il 3%. Gli studi sulla chimica ossidativa della 2-S-CD, attualmente ancora in corso, hanno evidenziato una reattività differente rispetto alla 5-S-CD: infatti, mentre nel caso di quest'ultima gli intermedi benzotiazinici danno luogo a dimerizzazione, quelli formati dalla 2-S-CD seguono altre vie di reazione, subendo preferenzialmente contrazione di anello a dare il 2-BTCA. Studi successivi dovranno chiarire se unità strutturalmente relazionate al 2-BTCA siano effettivamente incorporate nelle feomelanine. Di particolare interesse è stata anche la messa a punto di una procedura di facile accesso al 2-BTCA, di potenziale interesse come nuovo *marker* per il dosaggio dei livelli di feomelanine nei tessuti pigmentati.

Nell'ambito delle ricerche sulle caratteristiche strutturali dei pigmenti feomelanici si inseriscono gli studi sulle proprietà cromoforiche e sulla fotoreattività di diverse feomelanine sintetiche e di loro precursori in confronto con feomelanine naturali. Da tali studi è emerso un importante contributo, finora non considerato, di unità strutturali di tipo 3-osso-3,4-diidrobenzotiazinico e benzotiazolico nel determinare il cromoforo feomelanico centrato intorno ai 300 nm, mentre unità benzotiaziniche presenti in strutture di tipo dimerico o relazionabili ai tricocromi renderebbero conto dell'assorbimento nell'intervallo 350-550 nm. La fotoreattività dei vari campioni di feomelanine è stata esaminata mediante esperimenti di ossimetria e *spin-trapping* EPR: risultati interessanti sono stati ottenuti quando sono state considerate feomelanine sintetiche preparate in presenza di ioni zinco, che hanno portato al maggior consumo di ossigeno fotoindotto, suggerendo un potenziale ruolo di tale metallo nelle ben note proprietà fototossiche delle feomelanine.

Infine, nel corso del dottorato di ricerca sono stati condotti una serie di studi collaterali sulla chimica ossidativa del 5,6-diidrossiindolo e di suoi oligomeri, che costituiscono un importante passo avanti nella definizione della struttura e dei meccanismi di formazione delle eumelanine, aspetti di grande interesse in svariati ambiti, dalla cosmetica, ad esempio nella preparazione di tinture per capelli e di filtri solari, alla messa a punto di materiali schermanti le radiazioni elettromagnetiche, fino alla progettazione di materiali semiconduttori e celle fotovoltaiche.

9. PARTE SPERIMENTALE

Gli spettri UV sono stati realizzati con uno spettrofotometro a serie di diodi (Hewlett Packard modello 8453E).

Gli spettri NMR sono stati registrati su spettrometri Bruker o Varian a 400 o 200 MHz, rispettivamente. Gli esperimenti ^1H , ^1H COSY, ^1H , ^{13}C HSQC-DEPT, ^1H , ^{13}C HMBC e ROESY sono stati eseguiti utilizzando programmi di impulsi standard della libreria Bruker. I valori di chemical shift sono riportati in δ (ppm) e riferiti al tetrametilsilano.

Le analisi TLC sono state eseguite su lastre in gel di silice di spessore di 0.25 mm con indicatore di fluorescenza.

Le analisi HPLC sono state realizzate con uno strumento Shimadzu modello SCL-10AV VP con pompe modello LC-10AD VP e rivelatore UV-visibile SPD-10AV VP, con uno strumento Gilson dotato di pompe modello 305/306 e di un rivelatore UV Shimadzu SPD 10A VP o con uno strumento Agilent 1100 con rivelatore UV. A scopi preparativi è stato utilizzato uno strumento Agilent 1200 con rivelatore UV (rivelazione a 280 nm) e una colonna Econosil C18 (250 mm \times 22 mm, 10 μm).

Le analisi LC/MS sono state realizzate in modalità elettrospray ioni positivi (ESI+) utilizzando uno strumento LC/MSD Agilent 1100 VL nelle seguenti condizioni: pressione del nebulizzatore 50 psi; drying gas azoto flussato a 12 L/min a una temperatura di 350 °C; voltaggio del capillare all'ingresso 4000 V; voltaggio del frammentatore 80 V.

Le misure del potere ottico rotatorio sono state effettuate su un polarimetro Jasco P-1010.

9.1 SVILUPPO DI UNA NUOVA METODOLOGIA PER L'ANALISI DI EUMELANINE E FEOMELANINE IN TESSUTI PIGMENTATI. IDENTIFICAZIONE DI UN NUOVO *MARKER* STRUTTURALE DELLE FEOMELANINE

Materiali e metodi

La L-dopa, il perossido di idrogeno (soluzione al 30%), il ditiotreitolo, la tirosinasi da fungo (EC 1.14.18.1), la perossidasi da rafano (EC 1.11.1.7) e la proteinasi K da *Tritirachium album* (EC 3.4.21.64) sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich.

La 5-*S*-cisteinildopa (5-*S*-CD),¹⁶ la 2-*S*-cisteinildopa (2-*S*-CD)¹⁶ e l'acido 1,3-tiazol-2,4,5-tricarbossilico (TTCA)⁵⁸ sono stati sintetizzati secondo procedure descritte in letteratura. L'acido 6-(2-ammino-2-carbossietil)-2-carbossi-4-idrossibenzotiazolo (BTCA)¹³ e l'acido pirrol-2,3,5-tricarbossilico (PTCA)¹² sono stati ottenuti per degradazione con perossido d'idrogeno in ambiente alcalino di una feomelanina e di una eumelanina sintetica, rispettivamente.

Le feomelanine sintetiche da 5-*S*-CD/perossidasi-H₂O₂¹⁴ e da 5-*S*-CD/tirosinasi²⁹ sono state preparate secondo procedure riportate in letteratura.

Per le analisi HPLC è stata utilizzata una colonna Synergi Hydro-RP 80A (250 mm × 4.60 mm, 4 μm) con acido formico 1% (pH 2.8)/metanolo 97:3 v/v come eluente, ad una velocità di flusso di 0.7 mL/min. La rivelazione è stata effettuata a 254 e 280 nm.

Le analisi LC/MS sono state realizzate utilizzando una colonna Synergi Hydro-RP 80A (250 mm × 4.60 mm, 4 μm) e acido formico 0.5%/metanolo 9:1 v/v come eluente, ad una velocità di flusso 0.4 mL/min.

Preparazione dei tessuti

Le iridi umane e di scimmia sono state ottenute come descritto.^{59,60}

I campione di cute (ca. 2 mm²) sono stati ottenuti per escissione da un'area di pelle priva di nevi o lesioni pigmentate e prima dell'analisi sono stati trattati con una miscela cloroformio/metanolo 2:1 v/v.

I campioni di capelli sono stati ottenuti e lavati come descritto.¹⁴

Isolamento di feomelanine naturali da peli di coniglio o da capelli rossi

Il pigmento è stato isolato da peli di coniglio rosso Fulvo di Borgogna o da capelli rossi come precedentemente descritto con alcune modifiche.²⁶ In breve, 1.5 g di peli o di

capelli sono stati finemente sminuzzati ed omogeneizzati in tampone fosfato 0.1 M (pH 7.5) (50 mL). La miscela è stata trattata con proteinasi K (12 mg, 13 U/mg) e ditiotreitolo (150 mg) a 37 °C, sotto vigorosa agitazione, in atmosfera di argon. Dopo 18 h la miscela è stata centrifugata per 20 min a 7000 rpm a 4 °C; il precipitato è stato lavato con acido acetico 1% (2 × 1 mL), mentre il surnatante è stato acidificato a pH 3 con HCl 6 M, tenuto a 4 °C per 1 h, e quindi centrifugato per 30 min, a 7000 rpm, a 4 °C, per dare un precipitato che è stato lavato per due volte con acido acetico 1% (2 × 1 mL). I precipitati riuniti sono stati sospesi in tampone fosfato 0.1 M (pH 7.5) (2.5 mL) e trattati nuovamente con proteinasi K (0.3 mg) e ditiotreitolo (1.2 mg) come sopra. Dopo 18 h la miscela è stata trattata come precedentemente descritto e i precipitati riuniti sottoposti ad altre due digestioni nelle condizioni del secondo trattamento. Il precipitato finale è stato lavato con acqua e liofilizzato.

Degradazione chimica di melanine e tessuti pigmentati

La degradazione è stata effettuata come riportato in letteratura¹⁴ con alcune modifiche. In breve, l'opportuno campione (10 mg di capelli o 5 mg di melanina sintetica o naturale) è stato sospeso in NaOH 1 M (1 mL) e trattato con H₂O₂ 1.5% a temperatura ambiente e sotto vigorosa agitazione. Dopo 24 h la miscela è stata trattata con una soluzione acquosa di Na₂S₂O₅ al 5% (200 µL), acidificata a pH 3 con H₃PO₄ 85%, filtrata su membrana di nylon (13 mm, 0.45 µm) e analizzata per HPLC. Per la degradazione delle iridi ogni campione è stato trattato con 200 µL di NaOH 1 M e H₂O₂ 1.5%. I campione di cute (15-20 mg) sono stati trattati con 300 µL di NaOH 1 M e H₂O₂ 1.5%.

Preparazione della feomelanina sintetica da 2-S-CD/tirosinasi

E' stata utilizzata una procedura riportata in letteratura per la 5-S-CD²⁹ con alcune modifiche. In breve, 90 mg di 2-S-CD (0.28 mmol) sono stati sciolti in tampone fosfato 0.05 M (pH 6.8) (100 mL) e alla soluzione sono state aggiunte la L-dopa (2.8 mg, 14 µmol) e la tirosinasi (3.3 mg, 1530 U/mg). La miscela è stata tenuta sotto flusso di ossigeno a 37 °C per 4 h, al termine delle quali è stata acidificata a pH 3 con HCl 2 M e conservata a 4 °C. Dopo 16 h la miscela è stata centrifugata per 30 min, a 7000 rpm, a 4 °C, ed il precipitato ottenuto è stato lavato per tre volte con acido acetico 1% (3 × 10 mL), una volta con acqua (10 mL) e liofilizzato.

Isolamento del 7-(2-ammino-2-carbossietil)-2-carbossi-4-idrossibenzotiazolo (2-BTCA)

La melanina da 2-S-CD/tirosinasi è stata degradata con H₂O₂/NaOH come riportato sopra. La miscela di degradazione è stata quindi frazionata su cartuccia C-18 (Alltech, 300 mg) ambientata con HCOOH 0.1 M ed eluita prima con HCOOH 0.1 M (5 mL) e successivamente con una miscela HCOOH 0.1 M/metanolo 1:1 v/v. Quest'ultima frazione è stata acidificata a pH 2, estratta con acetato di etile, e la fase acquosa portata a secco a pressione ridotta per dare il 2-BTCA (5 mg).

2-BTCA: ¹H NMR (D₂O/DCl): δ 3.29 (1H, dd, *J* = 17.8, 9.6 Hz, CH₂), 3.43 (1H, dd, *J* = 17.8, 4.0 Hz, CH₂), 4.45 (1H, br t, CH), 6.87 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5), 7.27 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-6); ESI+/MS: *m/z* 283 [M+H]⁺, 305 [M+Na]⁺.

9.2. SINTESI E REATTIVITA' DELLA 2-S-CISTEINILDOPA

Materiali e metodi

La L-dopa, la 3,4-diidrossibenzaldeide, la *N*-acetilglicina, l'acetato di sodio, il carbone palladiato (10%), il perossido di idrogeno (soluzione al 30%), il solfato di zinco eptaidrato, il ferricianuro di potassio, il persolfato di sodio, la tirosinasi da fungo (EC 1.14.18.1) e la perossidasi da rafano (EC 1.11.1.7) sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich. L'idrossido di ammonio (soluzione acquosa 17 M) è stato acquistato dalla Romil. Il cloruro di tris(trifenilfosfina)rodio(I) e la *N*-acetil-L-cisteina sono stati acquistati dalla Fluka. Il tetrafluoroborato di (*R,R*)-(-)-1,2-bis[(*o*-metossifenil)fenilfosfino]etano(1,5-cicloottadiene) rodio(I) è stato acquistato dalla Acros.

La 5-*S*-cisteinildopa (5-*S*-CD) è stata preparata secondo una procedura descritta in letteratura.¹⁶

Le analisi HPLC sono state realizzate con i seguenti sistemi cromatografici:

1. Colonna Sphereclone ODS (250 mm × 4.60 mm, 5 μm).
 - 1.1 Sistema eluente: acido formico 0.1 M (solvente A), metanolo (solvente B), 0-5 min 5% solvente B, 5-45 min dal 5 al 60% solvente B, 45-50 min 60% solvente B; velocità di flusso 1 mL/min; rivelazione a 280 nm (sistema cromatografico 1).
 - 1.2 Sistema eluente: acido trifluoroacetico 0.5% (solvente A), metanolo (solvente B), 0-15 min dal 10 al 15% solvente B, 15-55 min dal 15 al 60% solvente B; velocità di flusso 0.7 mL/min; rivelazione a 280 nm (sistema cromatografico 2).
2. Colonna Synergi Hydro–RP 80A (250 mm × 4.60 mm, 4 μm).
 - 2.1 Sistema eluente: acido formico 1% (pH 2.8)/metanolo 97:3 v/v; velocità di flusso 0.7 mL/min; rivelazione a 254 e 280 nm (sistema cromatografico 3).
 - 2.2 Sistema eluente: acido trifluoroacetico 0.1%/metanolo 99:1 v/v; velocità di flusso 0.7 mL/min; rivelazione a 280 nm (sistema cromatografico 4).

Le analisi LC/MS sono state effettuate utilizzando una colonna Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 mm × 4.60 mm, 3.5 μm) con il seguente sistema eluente: acido

trifluoroacetico 0.1% (solvente A), metanolo (solvente B), 0-15 min dal 10 al 15% solvente B, 15-55 min dal 15 al 60% solvente B, ad una velocità di flusso di 0.4 mL/min.

Sintesi della 2-S-cisteinildopa (2-S-CD)

Sintesi dell'acido 2-acetilammino-3-(3,4-diidrossifenil)propenoico (1)

La 3,4-diidrossibenzaldeide (1 g, 7.2 mmol), l'acetato di sodio (2.3 g, 28 mmol) e l'*N*-acetilglicina (1 g, 8.5 mmol) sono stati sciolti in anidride acetica (7.8 mL) e la miscela è stata tenuta sotto agitazione a 120 °C. Il decorso della reazione è stato seguito mediante TLC (eluente cloroformio/metanolo 98:2 v/v). Dopo 5 h la miscela è stata diluita in tampone fosfato 0.1 M (pH 7.4) (10 mL) ed estratta con acetato di etile (3 × 15 mL). Gli estratti organici riuniti sono stati lavati con tampone fosfato 0.1 M (pH 7.4) (2 × 15 mL), anidrificati su solfato di sodio e portati a secco.

Il residuo ottenuto (2.2 g) è stato ripreso in HCl 0.2 M (74 mL) e tenuto a ricadere a 100 °C. Il decorso della reazione è stato seguito mediante TLC (eluente cloroformio/metanolo/acido acetico 8:2:1 v/v/v). Dopo 1 h la miscela è stata filtrata ancora calda e il filtrato, lasciato raffreddare a temperatura ambiente, è stato estratto con etere etilico (3 × 30 mL). La fase acquosa è stata portata a secco per dare **1** (1.0 g, resa 59%).

1. UV (CH₃OH): λ_{\max} 292, 319 nm; ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 2.05 (3H, s, CH₃), 6.71 (1H, d, *J*=8.2 Hz, H-5'), 6.88 (1H, d, *J*=8.2 Hz, H-6'), 7.08 (1H, s, H-3), 7.11 (1H, s, H-2'), 9.15 (br s, OH), 9.23 (1H, s, NH), 9.45 (br s, OH); LC/MS (sistema cromatografico 1): *m/z* 238 [M+H]⁺, 260 [M+Na]⁺.

Sintesi dell'acido (Z)-2-acetilammino-3-[2-(2-acetilammino-2-carbossietiltilio)-3,4-diidrossifenil]propenoico (2)

1 (500 mg, 2.1 mmol) è stato sciolto in tampone fosfato 0.01 M (pH 7.4) (1.15 L). Sono state quindi aggiunte l'*N*-acetil-L-cisteina (690 mg, 4.2 mmol) e la tirosinasi (50 U/mL) e la miscela è stata tenuta sotto vigorosa agitazione a temperatura ambiente. Il decorso della reazione è stato seguito per HPLC (sistema cromatografico 1). Dopo 2 h, a consumo completo del prodotto di partenza, la miscela è stata portata a pH 3 con HCl 6 M ed estratta con acetato di etile (3 × 300 mL). La fase acquosa è stata portata a secco, ripresa in acqua e frazionata per HPLC preparativa (eluente acido formico 0.1 M/metanolo 88:12 v/v, velocità di flusso 30 mL/min) per dare **2** (410 mg, resa 49%).

2. UV (CH₃OH): λ_{\max} 257, 314 nm; ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 1.82 (3H, s, COCH_{3cys}), 1.87 (3H, s, COCH₃), 2.85 (1H, dd, $J=13.2, 10.0$ Hz, CH_{2cys}), 3.32 (1H, dd, $J=13.2, 4.4$ Hz, CH_{2cys}), 3.98 (1H, m, CH_{cys}), 6.80 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-6'), 6.96 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5'), 7.63 (1H, s, H-3), 8.16 (1H, d, $J=8.0$ Hz, NH_{cys}), 9.11 (1H, s, NH); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ 22.5 (CH_{3cys}), 22.6 (CH₃), 35.2 (CH_{2cys}), 52.2 (CH_{cys}), 115.6 (C-5'), 120.0 (C-2'), 120.4 (C-6'), 126.0 (C-2), 128.7 (C-1'), 131.5 (C-3), 146.3 (C-4'), 147.2 (C-3'), 166.8 (C-1), 169.5 (NHCO), 169.9 (NHCO_{cys}), 172.6 (COOH_{cys}); LC/MS (sistema cromatografico 1): m/z 399 [M+H]⁺, 421 [M+Na]⁺; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +43.9$ ($c=0.25$, CH₃OH).

Sintesi e idrolisi dell'acido 2-acetilammino-3-[2-(2-acetilammino-2-carbossietiltilio)-3,4-diidrossifenil]propanoico (3)

Ad una soluzione di **2** (800 mg, 2.01 mmol) in metanolo (30 mL) è stato aggiunto il tetrafluoroborato di (*R,R*)-(-)-1,2-bis[(*o*-metossifenil)fenilfosfino]etano(1,5-cicloottadiene) rodio(I) (44 mg, 0.06 mmol). La miscela è stata tenuta sotto agitazione in una bomba di idrogenazione ad una pressione di 50 atm a temperatura ambiente. Il decorso della reazione è stato seguito per HPLC (sistema cromatografico 1) e per UV. Dopo 72 h la miscela è stata portata a secco per dare **3**. A quest'ultimo, ripreso in metanolo (3 mL), è stato aggiunto HCl 3 M (48 mL) e la miscela è stata tenuta a ricadere a 100 °C, sotto agitazione magnetica, in atmosfera di Ar. Il decorso della reazione è stato seguito per HPLC (sistema cromatografico 1). Dopo 5 h la miscela è stata lasciata raffreddare e filtrata. Il surnatante è stato portato a secco, ripreso in etanolo (15 mL) e aggiunto lentamente a 500 mL di acetato di etile sotto agitazione. Il precipitato flocculento incolore è stato recuperato per centrifugazione (5000 rpm, 30 min, 20 °C) e seccato sotto vuoto per 12 h. La 2-*S*-CD è stata ottenuta con una resa pari all'87%, con un eccesso diastereoisomerico dell'86% (analisi HPLC, sistema cromatografico 4).

2-*S*-CD: UV (H₂O): λ_{\max} 255, 293 nm; ¹H NMR (D₂O): δ 3.31 (1H, dd, $J=14.8, 4.4$ Hz, CH_{2cys}), 3.45 (1H, dd, $J=14.8, 7.2$ Hz, CH_{2cys}), 3.18 (1H, dd, $J=14.8, 8.8$ Hz, -CHCH₂), 3.67 (1H, dd, $J=14.8, 6.4$ Hz, -CHCH₂), 4.12 (1H, dd, $J=7.2, 4.4$ Hz, CH_{cys}), 4.23 (1H, dd, $J=8.8, 6.4$ Hz, -CHCH₂), 6.84 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-6), 6.96 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-5); ¹³C NMR (D₂O): δ 36.1 (-CHCH₂), 36.4 (CH_{2cys}), 55.9 (CH_{cys}), 58.9 (-CHCH₂), 118.8 (C-5), 119.7 (C-2), 124.3 (C-6), 132.0 (C-1), 145.6 (C-4), 148.6 (C-3),

172.0 (COOH_{cys}), 173.3 (COOH); LC/MS: m/z 317 [M+H]⁺, 339 [M+Na]⁺; [α]_D²⁰ = +40.2 ($c=0.25$, HCl 2 M).

Chimica ossidativa della 2-S-CD e analisi di feomelanine sintetiche

Preparazione di feomelanine sintetiche

La feomelanina da tirosinasi è stata preparata secondo una procedura riportata in letteratura²⁹ con alcune modifiche. In breve, ad una soluzione di 5-S-CD (45 mg, 0.14 mmol) e 2-S-CD (45 mg, 0.14 mmol) in tampone fosfato 0.05 M (pH 6.8) (100 ml) sono state aggiunte la L-dopa (2.80 mg, 0.014 mmol) e la tirosinasi (1.16 mg, 5370 U/mg). La miscela è stata tenuta sotto agitazione a 37 °C sotto flusso di ossigeno per 4 h.

Le feomelanine da perossidasi/H₂O₂ sono state preparate secondo una procedura riportata in letteratura.¹⁴ In breve, ad una soluzione di 2-S-CD e 5-S-CD in rapporti variabili (1:0, 1:1, 0:1) (50 mg totali, 0.16 mmol) in tampone fosfato 0.1 M (pH 6.8) (12.5 mL) sono state aggiunte la perossidasi (1.15 mg, 181 U/mg) e una soluzione acquosa di H₂O₂ al 30% (19 μL). La miscela è stata tenuta sotto agitazione a temperatura ambiente per 2 h. Quando necessario la reazione è stata interrotta dopo 5 min. In altre preparazioni la reazione è stata condotta in presenza di ZnSO₄ × 7H₂O (46 mg, 0.16 mmol).

In tutte le preparazioni descritte al termine della reazione la miscela è stata portata a pH 3 con HCl 2 M e tenuta a 4 °C per 16 h. Il precipitato è stato recuperato per centrifugazione (7000 rpm, 30 min, 4 °C), lavato tre volte con acido acetico all'1% (3 × 10 mL), una volta con acqua (10 mL) e liofilizzato.

Degradazione chimica di feomelanine

La degradazione delle feomelanine è stata effettuata secondo quanto riportato in letteratura¹⁴ con alcune modifiche. In breve, i campioni di feomelanina (5 mg) o una miscela di feomelanina da 2-S-CD e di feomelanina da 5-S-CD in rapporto 1:5 (5 mg totali) sono stati trattati con NaOH 1 M (1 mL) e H₂O₂ all'1.5%. La miscela è stata tenuta sotto agitazione a temperatura ambiente e dopo 24 h trattata con una soluzione di Na₂S₂O₅ al 5% (200 μL), portata a pH 3 con H₃PO₄ all'85% e filtrata su membrana di nylon (13 mm, 0.45 μm). Il surnatante è stato analizzato per HPLC (sistema cromatografico 3). In altri esperimenti la degradazione della miscela di feomelanina da 2-S-CD e di feomelanina da 5-S-CD è stata: i) interrotta dopo 1, 4.5 o 10 h; ii) effettuata

in presenza di $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (2.5 mg o 10 mg); iii) condotta in 5 mL di NaOH 1 M, con 250 μL di H_2O_2 al 30%.

Chimica ossidativa della 2-S-CD

Ad una soluzione di 2-S-CD (3 mg, 0.009 mmol) in tampone fosfato 0.1 M (pH 6.8) (750 μL) sono stati aggiunti $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (3.3 mg), una soluzione di perossidasi 181 U/mL (69 μL) e H_2O_2 al 30% (1 μL). La miscela è stata tenuta sotto vigorosa agitazione a temperatura ambiente e analizzata periodicamente mediante LC/MS. In altri esperimenti la reazione è stata condotta in assenza di ioni zinco o in presenza di quantità equimolari di 5-S-CD.

Sintesi del 2-BTCA

Ad una soluzione di 2-S-CD (5 mg, 0.016 mmol) in tampone fosfato 50 mM (pH 7.4) (670 μL) sono state aggiunte una soluzione di $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (5.7 mg in 80 μL di tampone fosfato 50 mM (pH 7.4)) (il pH della miscela è stato riportato a 7.4 per aggiunta di una soluzione di idrossido di ammonio 17 M) e una di $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (5.3 mg in 80 μL di tampone fosfato 50 mM (pH 7.4)). Dopo 20 min la miscela è stata trattata con:

- 1) NaOH 6 M (150 μL) e dopo 20 min HCl 6 M fino a pH 1;
- 2) NH_3 17 M (150 μL) e dopo 20 min HCl 6 M fino a pH 1;
- 3) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (11.7 mg, 0.048 mmol) e HCl 12 M (800 μL);
- 4) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (11.7 mg, 0.048 mmol), HCl 12 M (800 μL) e dopo 20 min $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (6 mg, 0.032 mmol).

Il decorso della reazione è stato seguito per HPLC (sistema cromatografico 2) e LC/MS.

Le reazioni sottoposte ai trattamenti 1, 3 e 4 sono state ripetute a partire da 50 mg di 2-S-CD e le miscele sono state frazionate per HPLC preparativa (eluente acido trifluoroacetico 0.2%/metanolo 8:2 v/v, velocità di flusso 40 mL/min) a dare nell'ordine :

- 1) 8-(2-ammino-2-carbossietil)-5-idrossi-3-osso-3,4-diidro-1,4-benzotiazina (2-ODHB) (8 mg, resa 19%) e 2-BTCA (12 mg, resa 27%);
- 3) 7-(2-ammino-2-carbossietil)-2-carbossi-5-cloro-4-idrossibenzotiazolo (15 mg, resa 30%) e 2-BTCA (10 mg, resa 23%);
- 4) 2-BTCA (20 mg, resa 45%).

2-ODHB: UV (H₂O): λ_{\max} 296 nm; LC/MS: m/z 269 [M+H]⁺.

7-(2-ammino-2-carbossietil)-2-carbossi-5-cloro-4-idrossibenzotiazolo: UV (HCl 0.5 M): λ_{\max} 261, 280, 318 nm; ¹H NMR (D₂O/DCl): δ 3.15 (1H, dd, $J=$ 15.2, 10.4 Hz, -CHCH₂), 3.41 (1H, dd, $J=$ 15.2, 4.0 Hz, -CHCH₂), 4.49 (1H, dd, $J=$ 10.4, 4.0 Hz, -CHCH₂), 7.27 (1H, s, H-6); LC/MS: m/z 317 [M+H]⁺, 319 [M+2+H]⁺, 339 [M+Na]⁺.

2-BTCA: UV (HCl 0.5 M): λ_{\max} 252, 287, 346 nm (log ϵ 3.54, 3.25, 2.67); ¹H NMR (D₂O/DCl): δ 3.11 (1H, dd, $J=$ 15.2, 10.4 Hz, -CHCH₂), 3.38 (1H, dd, $J=$ 15.2, 4.4 Hz, -CHCH₂), 4.50 (1H, dd, $J=$ 10.4, 4.4 Hz, -CHCH₂), 6.65 (1H, d, $J=$ 8.0 Hz, H-5), 7.13 (1H, d, $J=$ 8.0 Hz, H-6); ¹³C NMR (D₂O): δ 36.8 (-CHCH₂), 54.4 (-CHCH₂), 114.2 (C-5), 120.5 (C-7), 132.6 (C-6), 139.6 (C-7a), 142.4 (C-3a), 151.9 (C-4), 158.0 (C-2), 163.2 (C-2-COOH), 172.4 (-CHCOOH); LC/MS: m/z 283 [M+H]⁺, 305 [M+Na]⁺; $[\alpha]_D=0$ ($c=$ 0.25, HCl 2 M).

9.3. RIESAME DEL CROMOFORO DELLE FEOMELANINE

Materiali e metodi

Il perossido di idrogeno (soluzione al 30%), il solfato di zinco eptaidrato e la perossidasi da rafano (EC 1.11.1.7) sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich.

La 5-*S*-cisteinildopa (5-*S*-CD),¹⁶ la 7-(2-ammino-2-carbossietil)-5-idrossi-3,4-diidro-2*H*-1,4-benzotiazina (**2**),⁶¹ il 7-(2-ammino-2-carbossietil)-5-idrossi-3,4-diidro-2*H*-1,4-benzotiazin-3-one (ODHB) (**3**),⁶² la 2,2'-bi[7-(2-ammino-2-carbossietil)-3-carbossi-5-idrossi-2*H*-1,4-benzotiazina] (**4**),²⁶ il tricocromo C (**6**)²⁶ e il 6-(2-ammino-2-carbossietil)-4-idrossibenzotiazolo (**9**)³³ sono stati sintetizzati secondo procedure riportate in letteratura.

La feomelanina naturale da capelli rossi è stata isolata come descritto a pag. 70.

Le analisi HPLC e LC/MS sono state realizzate con una colonna Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) con i seguenti sistemi eluenti: acido trifluoroacetico 0.1% (solvente A), metanolo (solvente B), 0-15 min dal 10 al 15% solvente B, 15-55 min dal 15 al 60% solvente B, 55-65 min dal 60 all'80% solvente B, velocità di flusso 0.4 mL/min (eluente I); acido trifluoroacetico 0.5% (solvente A), metanolo (solvente B), 0-25 min dal 35 al 45% solvente B, 25-45 min dal 45 all'80% solvente B, velocità di flusso 0.4 mL/min (eluente II). La rivelazione è stata effettuata a 280, 340 o 460 nm.

*Ossidazione della 5-*S*-CD*

Ad una soluzione di 5-*S*-CD (100 mg, 0.32 mmol) in tampone fosfato 0.1 M (pH 6.8) (25 mL) sono state aggiunte la perossidasi (concentrazione finale 16.7 U/mL) e una soluzione acquosa di H₂O₂ al 30% (38 μL). La miscela è stata tenuta sotto agitazione a temperatura ambiente per 2 h e quindi portata a pH 3 con HCl 2 M e tenuta a 4 °C per 16 h. La melanina precipitata è stata recuperata per centrifugazione (7000 rpm, 30 min, 4 °C), lavata tre volte con acido acetico all'1% (3 × 10 mL), una volta con acqua (10 mL) e liofilizzata.

In altri esperimenti la reazione è stata condotta in presenza di ZnSO₄ × 7H₂O (111 mg, 1.2 equivalenti molar), con 100 U/mL di perossidasi e 228 μL di soluzione di H₂O₂ al 30%, aggiunte in due porzioni ad intervalli di 5 h. La miscela è stata tenuta sotto agitazione per 24 h e quindi portata a pH 3 con HCl 2 M, e la melanina precipitata è stata recuperata come sopra.

In entrambi i casi sono state periodicamente prelevate aliquote delle miscele di reazione, che sono state analizzate per HPLC, LC/MS o spettroscopia UV-visibile. Quando necessario le aliquote sono state ridotte con NaBH_4 .

9.4. CARATTERIZZAZIONE EPR DI FEOMELANINE

Materiali e metodi

Il perossido di idrogeno (soluzione al 30%) e la perossidasi da rafano (EC 1.11.1.7) sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich.

La 5-*S*-cisteinildopa (5-*S*-CD) è stata sintetizzata come descritto in letteratura.¹⁶

Le feomelanine sintetiche da 5-*S*-CD/perossidasi-H₂O₂¹⁴ e da dopa e cisteina²⁹ sono state preparate secondo procedure riportate in letteratura. La feomelanina da dopa e cisteina + Zn²⁺ è stata preparata come descritto in letteratura²⁹ a partire da 100 mg di L-dopa, in presenza di ZnSO₄ × 7H₂O (175 mg, 0.60 mmol).

La feomelanina naturale da capelli rossi è stata isolata come descritto a pag. 70.

*Preparazione delle feomelanine sintetiche da 5-*S*-CD in presenza di ioni zinco.*

Ad una soluzione di 5-*S*-CD (100 mg, 0.32 mmol) in tampone fosfato 0.05 M (pH 6.8) (25 ml) sono stati aggiunti ZnSO₄ × 7H₂O (111 mg, 0.38 mmol), perossidasi (2.3 mg, 181 U/mg) e H₂O₂ al 30% (37 μL), e la miscela è stata tenuta sotto agitazione, a temperatura ambiente, per 2 h. Per la preparazione della feomelanina da 5-*S*-CD + Zn²⁺ a 24 h la reazione è stata condotta su 70 mg di 5-*S*-CD come descritto a pag. 79.

In entrambe le preparazioni al termine della reazione la miscela è stata portata a pH 3 con HCl 2 M e tenuta a 4 °C per 16 h. Il precipitato è stato recuperato per centrifugazione (7000 rpm, 30 min, 4 °C), lavato tre volte con acido acetico all'1% (3 × 10 mL), una volta con acqua (10 mL) e infine sospeso in acqua.

9.5. VALUTAZIONE DELLA PIGMENTAZIONE ACQUISITA PERSISTENTE COME INDICATORE DELLA CAPACITA' DI FOTOPROTEZIONE INDIVIDUALE

Materiali e metodi

L'acido pirrol-2,3,5-tricarbossilico (PTCA) è stato ottenuto come precedentemente descritto.¹²

Le analisi HPLC sono state condotte in triplicato con una colonna Spherisorb S5 ODS2 (250 mm × 4.6 mm, 5 µm) con il sistema eluente precedentemente descritto.¹⁴ La rivelazione è stata effettuata a 280 nm.

L'irradiazione con raggi UVB è stata realizzata con una lampada munita di due tubi fluorescenti (Philips TL-12, 9 mW), con uno spettro di emissione compreso tra i 290 e i 320 nm (massimo a 300 nm).

L'intensità dell'eritema e della pigmentazione è stata misurata con un DermaSpectrometer, che misura la luce riflessa nello spettro visibile (400-700 nm), fornendo un indice numerico per i colori rosso (eritema) e nero (pigmentazione).

Sono stati presi in esame 50 volontari sani (20-46 anni), di cui è stato misurato il contenuto di melanina nei capelli, la minima dose eritemigena (MED) e la risposta pigmentaria. Non sono stati presi in esame individui dai capelli rossi.

I fototest per la determinazione della MED sono stati condotti durante l'inverno. Per ogni soggetto sono state irradiate sei aree di dimensioni 1 cm × 1 cm sulla superficie volare dell'avambraccio destro. La valutazione della MED è stata effettuata dopo 24 h. La risposta eritemigena è stata determinata come differenza tra il colore dell'area irradiata e quello di un'area di cute adiacente non irradiata. E' stata considerata come MED una dose in grado di produrre un'indice di eritema superiore a 7.0.

La pigmentazione delle aree irradiate con una dose pari a una MED è stata valutata dopo 5, 9 e 16 giorni. Come per la risposta eritemigena, la risposta pigmentaria è stata determinata come differenza di colore tra aree irradiate e non.

Analisi dei campioni di capelli

Le analisi sono state condotte in triplicato secondo la procedura precedentemente descritta¹⁴ con alcune modifiche. 5-10 mg di capelli finemente sminuzzati sono stati sospesi in NaOH 1 M (0.5-1 mL) e trattati con H₂O₂ 1.5% sotto vigorosa agitazione, per 4 h, a temperatura ambiente. La miscela è stata quindi trattata con Na₂S₂O₅ al 5% (200

$\mu\text{L}/\text{mL}$), acidificata a pH 4 con HCl 6 M e centrifugata a 3300 rpm. Il surnatante è stato analizzato per HPLC.

10. BIBLIOGRAFIA

1. Bliss, J. M.; Ford, D.; Swerdlow, A. J.; Armstrong, B. K.; Cristofolini, M.; Elwood, J. M.; Green, A.; Holly, E. A.; Mack, T.; MacKie, R. M.; Osterlind, A.; Walter, S. D.; Peto, J.; Easton, D. F. *Int. J. Cancer* **1995**, *62*, 367-376.
2. Sturm, R. A. *Melanoma Res.* **2002**, *12*, 405-416.
3. Rees, J. L. *Am. J. Hum. Genet.* **2004**, *75*, 739-751.
4. Prota, G. *Melanins and Melanogenesis*, Academic Press: San Diego CA, 1992.
5. Prota, G. *Fortsch. Chem. Org. Naturst*, Herz, W.; Kirby, G. W.; Moore, R. E.; Steglich, W.; Tamm, C. Eds.; Springer-Verlag: Wien, 1995, vol. 64, pp. 94-148.
6. Napolitano, A.; Memoli, S.; Crescenzi, O.; Prota, G. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 598-604.
7. Napolitano, A.; Memoli, S.; Prota, G. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 3009-3011.
8. Di Donato, P.; Napolitano, A. *Pigment Cell Res.* **2003**, *16*, 532-539.
9. Ito, S.; Prota, G. *Experientia* **1977**, *33*, 1118-1119.
10. Napolitano, A.; Costantini, C.; Crescenzi, O.; Prota, G. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 6365-6368.
11. Fitzpatrick, T. B. *Arch. Dermatol.* **1998**, *124*, 869-871.
12. Napolitano, A.; Pezzella, A.; Vincensi, M. R.; Prota, G. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 5913-5920.
13. Napolitano, A.; Vincensi, M. R.; d'Ischia, M.; Prota, G. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 6799-6802.
14. Napolitano, A.; Vincensi, M. R.; Di Donato, P.; Monfrecola, G.; Prota, G. *J. Invest. Dermatol.* **2000**, *114*, 1141-1147.
15. Ito, S.; Inoue, S.; Yamamoto, Y.; Fujita, K. *J. Med. Chem.* **1981**, *24*, 673-677.
16. Chioccaro, F.; Novellino, E. *Synth. Commun.* **1986**, *16*, 967-971.
17. Ito, S. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1983**, *56*, 365-366.
18. Ito, S.; Fujita, K. *Biochim. Biophys. Acta*, **1981**, *672*, 151-157.
19. Panzella, L.; Napolitano, A.; d'Ischia, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 4797-4805.
20. Cheynier, V. F.; Trousdale, E. K.; Singleton, V. L.; Salgues, M. J.; Wylde, R. J. *Agric. Food Chem.* **1986**, *34*, 217-221.
21. Bassil, D.; Makris, D. P.; Kefalas, P. *Food Res. Intern.* **2005**, *38*, 395-402.

22. Wong, H. N. C.; Xu, Z. L.; Chang, H. M. *Synthesis* **1992**, *8*, 793-797.
23. Amorati, R.; Fumo, M. G.; Menichetti, S.; Mugnaini, V.; Pedulli, G. F. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 6325-6332.
24. Mori A.; Miyakawa, Y.; Ohashi, E.; Haga, T.; Maegawa, T.; Sajiki, H. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3279-3281.
25. Vineyard, B. D.; Knowles, W. S.; Sabacky, M. J.; Bachman, G. L.; Weinkauff, D. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 5946-5952.
26. Napolitano, A.; Di Donato, P.; Prota, G. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 6958-6966.
27. Morishima, T.; Tatsumi, F.; Fukada, E.; Saito, M.; Fujita, M.; Nagashima, N.; Hanawa, S. *Arch. Dermatol. Res.* **1983**, *275*, 76-79.
28. Thompson, A.; Land, E. J.; Chedekel, M. R.; Subbarao, K. V.; Truscott, T. G. *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, *843*, 49-57.
29. Ito, S. *Pigment Cell Res.* **1989**, *2*, 53-56.
30. Agrup, G.; Hansson, C.; Rorsman, H.; Rosenger, E. *Arch. Dermatol. Res.* **1982**, *272*, 103-115.
31. Bertazzo, A.; Costa, C.; Biasiolo, M.; Allegri, G.; Cirrincione, G.; Presti, G. *Biol. Trace Elem. Res.* **1996**, *52*, 37-53.
32. Palumbo, A.; Nardi, G.; d'Ischia, M.; Misuraca, G.; Prota, G. *Gen. Pharmac.* **1983**, *14*, 253-257.
33. Di Donato, P.; Napolitano, A.; Prota, G. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1571*, 157-166.
34. Lowik, D. W. P. M.; Tisi, L. C.; Murray, J. A. H.; Lowe, C. R. *Synthesis* **2001**, *12*, 1780-1783.
35. Mc Capra, F.; Razavi, Z. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1975**, *2*, 42-43.
36. Napolitano, A.; Di Donato, P.; Prota, G. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1475*, 47-54.
37. Brown, C.; Davidson, R. M. *Adv. Heterocycl. Chem.* **1985**, *38*, 135-176.
38. Tesema, Y. T.; Pham, D. M.; Franz, K. J. *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 6102-6104.
39. Fattorusso, E.; Minale, L.; De Stefano, S.; Cimino, G.; Nicolaus, R. A. *Gazz. Chim. Ital.* **1968**, *98*, 1443-1463.
40. Patil, D. G.; Chedekel, M. R. *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 997-1000.
41. Lambert, C.; Sinclair, R. S.; Truscott, T. G.; Land, E. J.; Chedekel, M. R.; Liu, C. T. *Photochem. Photobiol.* **1984**, *39*, 5-10.

42. Sealy, R. C.; Felix, C. C.; Hyde, J. S.; Swartz, H. M. In *Free Radicals in Biology*, Pryor, W. A. Ed.; Academic: New York, 1980, vol. 4, pp. 209-259.
43. Sealy, R. C.; Hyde, J. S.; Felix, C. C.; Menon, I. A.; Prota, G.; Swartz, H. M.; Persad, S.; Haberman, H. F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1982**, *79*, 2885-2889.
44. Sealy, R. C.; Hyde, J. S.; Felix, C. C.; Menon, I. A.; Prota, G. *Science* **1982**, *217*, 545-547.
45. Meredith, P.; Sarna, T. *Pigment Cell Res.* **2006**, *19*, 572-594.
46. Felix, C. C.; Hyde, J. S.; Sarna, T.; Sealy, R. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 3922-3926.
47. Rózanowska, M.; Jarvis-Evans, J.; Korytowski, W.; Boulton, M. E.; Burke, J. M.; Sarna, T. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 18825-18830.
48. Rosen, G. M.; Finkelstein, M. D. *Adv. Free Radical Biol. Med.* **1985**, *1*, 345-375.
49. Black, H. S.; deGruijl, F. R.; Forbes, P. D.; Cleaver, J. E.; Ananthaswamy, H. N.; De Fabo, E. C.; Ullrich, S. E.; Tyrrell, R. *J. Photochem. Photobiol. B* **1997**, *40*, 29-47.
50. Gusterson, B. A.; Anbazhagan, R.; Warren, W.; Midgely, C.; Lane, D. P.; O'Hare, M.; Stamps, A.; Carter, R.; Jayatilake, H. *Oncogene* **1991**, *6*, 1785-1789.
51. Fabbrocini, G.; Battisti, S. In *Fotodermatologia*, CIC Ed. Internazionali, 2003, pp. 50-55.
52. Osterlind, A. *Acta Oncol.* **1992**, *31*, 903-908.
53. Rosso, S.; Zanetti, R.; Martinez, C. *Br. J. Cancer* **1996**, *73*, 1447-1454.
54. Langley, R. G.; Sober, A. J. *Cancer Invest.* **1997**, *15*, 561-567.
55. Healy, E. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **2004**, *20*, 283-288.
56. Rees, J. L.; Healy, E. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* **1997**, *2*, 94-98.
57. d'Ischia, M.; Napolitano, A.; Pezzella, A.; Land, E. J.; Ramsden, C. A.; Riley, P. A. *Adv. Heterocycl. Chem.* **2005**, *289*, 1-63.
58. Erlenmeyer, H.; Junod, J.; Guex, W.; Erne, M. *Helv. Chim. Acta* **1948**, *31*, 1342-1349.
59. Prota, G.; Hu, D. -N.; Vincensi, M. R.; McCormik, S. A.; Napolitano, A. *Exp. Eye Res.* **1998**, *67*, 293-299.
60. Prota, G.; Vincensi, M. R.; Napolitano, A.; Selen, G.; Stjerschantz, J. *Pigment Cell. Res.* **2000**, *13*, 147-150.

61. Prota, G.; Crescenzi, S.; Misuraca, G.; Nicolaus, R. A. *Experientia* **1970**, *26*, 1508-1509.
62. Prota, G.; Scherillo, G.; Nicolaus, R. A. *Gazz. Chim. Ital.* **1968**, *98*, 495-510.

11. PUBBLICAZIONI E PARTECIPAZIONI A CONVEGNI

Pubblicazioni

- ✓ Napolitano, A.; De Lucia, M.; **Panzella, L.**; d'Ischia, M. **The “benzothiazine” chromophore of pheomelanins: a reassessment.** *Photochem. Photobiol.* In stampa.
- ✓ d'Ischia, M.; Crescenzi, O.; Pezzella, A.; Arzillo, M.; **Panzella, L.**; Napolitano, A.; Barone, V. **Structural effects on the electronic absorption properties of 5,6-dihydroxyindole oligomers: the potential of an integrated experimental and DFT approach to model eumelanin optical properties.** *Photochem. Photobiol.* In stampa.
- ✓ Russo, V.; Borzacchiello, G.; Brun, R.; d'Ischia, M.; Napolitano, A.; Paciello, O.; **Panzella, L.**; Roperto, F.; Urraro, C.; Roperto, S. **Melanosis of the urinary bladder in a cow.** *Vet. Pathol.* In stampa.
- ✓ De Lucia, M.; Mainieri, F.; Verotta, L.; Maffei, M.; **Panzella, L.**; Crescenzi, O.; Napolitano, A.; Barone, V.; Appendino, G.; d'Ischia, M. **Nitration vs. nitrosation chemistry of menthofuran: remarkable fragmentation and dimerization pathways and expeditious entry into dehydromenthofurolactone.** *J. Org. Chem.* In stampa.
- ✓ Pezzella, A.; **Panzella, L.**; Natangelo, A.; Arzillo, M.; Napolitano, A.; d'Ischia, M. **5,6-dihydroxyindole tetramers with “anomalous” interunit bonding patterns by oxidative coupling of 5,5',6,6'-tetrahydroxy-2,7'-biindolyl: emerging complexities on the way toward an improved model of eumelanin buildup.** *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 9225-9230.
- ✓ Manini, P.; **Panzella, L.**; Napolitano, A.; d'Ischia, M. **Oxidation chemistry of norepinephrine: partitioning of the *o*-quinone between competing cyclization and chain breakdown pathways and their roles in melanin formation.** *Chem. Res. Toxicol.* **2007**, *20*, 1549-1555.
- ✓ **Panzella, L.**; De Lucia, M.; Napolitano, A.; d'Ischia, M. **The first expedient entry to the human melanogen 2-*S*-cysteinyl-dopa exploiting the anomalous regioselectivity of 3,4-dihydroxycinnamic acid-thiol conjugation.** *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 7650-7652.

- ✓ Procaccini, E. M.; Napolitano, A.; **Panzella, L.**; Prizio, E.; Monfrecola, G. **Long-lasting pigmentation more than its intensity is a reliable indicator of skin sun resistance.** *Dermatology* **2007**, *215*, 173-179.
- ✓ **Panzella, L.**; Manini, P.; Monfrecola, G.; d'Ischia, M.; Napolitano, A. **An easy-to-run method for routine analysis of eumelanin and pheomelanin in pigmented tissues.** *Pigment Cell Res.* **2007**, *20*, 128-133.
- ✓ **Panzella, L.**; Pezzella, A.; Napolitano, A.; d'Ischia, M. **The first 5,6-dihydroxyindole tetramer by oxidation of 5,5',6,6'-tetrahydroxy-2,4'-biindolyl and an unexpected issue of positional reactivity en route to eumelanin-related polymers.** *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1411-1414.
- ✓ Pezzella, A.; Crescenzi, O.; Natangelo, A.; **Panzella, L.**; Napolitano, A.; Navaratnam, S.; Edge, R.; Land, E. J.; Barone, V.; d'Ischia, M. **Chemical, pulse radiolysis and density functional studies of a new, labile 5,6-indolequinone and its semiquinone.** *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 1595-1603.
- ✓ Pezzella, A.; **Panzella, L.**; Crescenzi, O.; Napolitano, A.; Navaratnam, S.; Edge, R.; Land, E. J.; Barone, V.; d'Ischia, M. **Short-lived quinonoid species from 5,6-dihydroxyindole dimers en route to eumelanin polymers: integrated chemical, pulse radiolytic, and quantum mechanical investigation.** *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15490- 15498.
- ✓ Edge, R.; d'Ischia, M.; Land, E. J.; Napolitano, A.; Navaratnam, S.; **Panzella, L.**; Pezzella, A.; Ramsden, C. A.; Riley, P. A. **Dopaquinone redox exchange with dihydroxyindole and dihydroxyindole carboxylic acid.** *Pigment Cell Res.* **2006**, *19*, 443-450.
- ✓ d'Ischia, M.; **Panzella, L.**; Manini, P.; Napolitano, A. **The chemical basis of the antinitrosating action of polyphenolic cancer chemopreventive agents.** *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 3133-3144.
- ✓ Manini, P.; La Pietra, P.; **Panzella, L.**; Napolitano, A.; d'Ischia, M. **Glyoxal formation by Fenton-induced degradation of carbohydrates and related compounds.** *Carbohydr. Res.* **2006**, *341*, 1828-1833.
- ✓ **Panzella, L.**; De Lucia, M.; Amalfitano, C.; Pezzella, A.; Evidente, A.; Napolitano, A.; d'Ischia, M. **Acid-promoted reaction of the stilbene antioxidant resveratrol with nitrite ions: mild phenolic oxidation at the 4'-hydroxystiryl**

- sector triggering nitration, dimerization, and aldehyde-forming routes. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 4246-4254.
- ✓ De Lucia, M.; **Panzella, L.**; Crescenzi, O.; Napolitano, A.; Barone, V.; d'Ischia, M. **The catecholic antioxidant piceatannol is an effective nitrosation inhibitor via an unusual double bond nitration.** *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 2238-2242.
 - ✓ De Lucia, M.; **Panzella, L.**; Pezzella, A.; Napolitano, A.; d'Ischia, M. **Oxidative chemistry of the natural antioxidant hydroxytyrosol: hydrogen peroxide-dependent hydroxylation and hydroxyquinone/*o*-quinone coupling pathways.** *Tetrahedron* **2006**, *62*, 1273-1278.
 - ✓ **Panzella, L.**; Manini, P.; Napolitano, A.; d'Ischia, M. **The acid-promoted reaction of the green tea polyphenol epigallocatechin gallate with nitrite ions.** *Chem. Res. Toxicol.* **2005**, *18*, 722-729.
 - ✓ Manini, P.; Pezzella, A.; **Panzella, L.**; Napolitano, A.; d'Ischia, M. **New insight into the oxidative chemistry of noradrenaline: competitive *o*-quinone cyclisation and chain fission routes leading to an unusual 4-[bis-(1*H*-5,6-dihydroxyindol-2-yl)methyl]-1,2-dihydroxybenzene derivative.** *Tetrahedron* **2005**, *61*, 4075-4080.
 - ✓ **Panzella, L.**; Di Donato, P.; Comes, S.; Napolitano, A.; Palumbo, A.; d'Ischia, M. **Remarkable Chichibabin-type cyclotrimerization of 3-nitrotyrosine, tyrosine, and phenylalanine to 3,5-diphenylpyridine derivatives induced by hypochlorous acid.** *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 6457-6460.

Convegni

- ✓ Pezzella, A.; Crescenzi, O.; Arzillo, M.; **Panzella, L.**; Napolitano, A.; Barone, V.; d'Ischia, M. **Structural and electronic absorption properties of 5,6-dihydroxyindole oligomers. Integrated experimental and theoretical approaches.** 14th ESPCR Meeting, 14-17 ottobre **2007**, Bari (Ita).
- ✓ Napolitano, A.; **Panzella, L.**; De Lucia, M.; Monfrecola, G.; d'Ischia, M. **The pheomelanin chromophore revisited.** 14th ESPCR Meeting, 14-17 ottobre **2007**, Bari (Ita).
- ✓ Gauden, M.; Pezzella, A.; **Panzella, L.**; d'Ischia, M.; Sundström, V. **Photochemistry and reaction mechanisms of primary photoinduced**

- processes in melanin precursors. 14th ESPCR Meeting, 14-17 ottobre 2007, Bari (Ita).
- ✓ **Panzella, L.**; Szewczyk, G.; De Lucia, M.; Monfrecola, G.; Sarna, T.; Napolitano, A.; d'Ischia, M. **The role of zinc in pheomelanin synthesis. An EPR, LC/MS and chemical degradation assessment.** 14th ESPCR Meeting, 14-17 ottobre 2007, Bari (Ita).
 - ✓ De Lucia, M.; **Panzella, L.**; Manini, P.; Napolitano, A.; d'Ischia, M. **Benzothiazoles are monomer intermediates in pheomelanogenesis in vitro.** 14th ESPCR Meeting, 14-17 ottobre 2007, Bari (Ita).
 - ✓ Monfrecola, G.; **Panzella, L.**; Napolitano, A.; d'Ischia, M. **An easy-to-run method for routine analysis of eumelanin and pheomelanin in pigmented tissues and its application to the assessment of melanin level/type, skin phototype and UV sensitivity correlation.** 21st World Congress of Dermatology, 30 settembre-5 ottobre 2007, Buenos Aires (Arg).
 - ✓ Ambrogi, V.; Barone, V.; Carfagna, C.; d'Ischia, M.; Napolitano, A.; **Panzella, L.**; Pezzella, A.; Savarese, R. **Materiali funzionali bioispirati a struttura melanica controllata: polimerizzazione ossidativa del 5,6-diidrossiindolo in polivinilacolo/tampone fosfato.** AIM XVIII Convegno Nazionale, 16-20 settembre 2007, Catania (Ita).
 - ✓ De Lucia, M.; **Panzella, L.**; Napolitano, A.; d'Ischia, M. **Nuovi aspetti della chimica delle feomelanine, i pigmenti dei capelli rossi umani.** XXXI Congresso Nazionale della Divisione di Chimica Organica della Società Chimica Italiana, 9-14 settembre 2007, Cosenza (Ita).
 - ✓ Appendino, G.; Mainieri, F.; Verotta, L.; De Lucia, M.; **Panzella, L.**; Crescenzi, O.; Napolitano, A.; Barone, V.; d'Ischia, M. **Reazioni del mentofurano con acido nitroso: caratterizzazione strutturale e DFT di un inusuale prodotto di dimerizzazione.** XXXI Congresso Nazionale della Divisione di Chimica Organica della Società Chimica Italiana, 9-14 settembre 2007, Cosenza (Ita).
 - ✓ Napolitano, A.; **Panzella, L.**; Manini, P.; Monfrecola, G.; d'Ischia, M. **Structural markers for pheomelanin analysis: advances and perspectives.** 13th ESPCR Meeting, 24-27 settembre 2006, Barcellona (Spa).

- ✓ Pezzella, A.; **Panzella, L.**; Napolitano, A.; Crescenzi, O.; Barone, V.; d'Ischia, M.; Land, E. J. **Pulse radiolysis detection and computational analysis of quinones from 5,6-dihydroxyindole dimers: implication for eumelanin build up.** 13th ESPCR Meeting, 24-27 settembre 2006, Barcellona (Spa).
- ✓ **Panzella, L.**; Pezzella, A.; Crescenzi, O.; Land, E. J.; Napolitano, A.; Barone, V.; d'Ischia, M. **Conversione ossidativa di dimeri del 5,6-diidrossiindolo ad eumelanine: studio di intermedi chinonici mediante radiolisi ad impulsi e calcoli DFT.** XXII Congresso Nazionale della Società Chimica Italiana, 10-15 settembre 2006, Firenze (Ita).
- ✓ **Panzella, L.**; De Lucia, M.; Pezzella, A.; Crescenzi, O.; Napolitano, A.; Barone, V.; d'Ischia, M. **Reazioni di nitrurazione, dimerizzazione e scissione ossidativa del resveratrolo e del piceatannolo indotte da ioni nitrito in mezzo acido.** XXII Congresso Nazionale della Società Chimica Italiana, 10-15 settembre 2006, Firenze (Ita).
- ✓ **Panzella, L.**; De Lucia, M.; Amalfitano, C.; Pezzella, A.; Evidente, A.; Napolitano, A.; d'Ischia, M. **Reazioni di nitrurazione, dimerizzazione e scissione ossidativa del resveratrolo indotte da ioni nitrito in mezzo acido.** VII Convegno Nazionale "Giornate di Chimica delle Sostanze Naturali", 7-10 giugno 2006, Acquafredda-Maratea (Ita).
- ✓ **Panzella, L.**; Manini, P.; Napolitano, A.; Monfrecola, G.; d'Ischia, M. **Nuovi markers strutturali per l'analisi di pigmenti feomelanici naturali e sintetici.** VII Convegno Nazionale "Giornate di Chimica delle Sostanze Naturali", 7-10 giugno 2006, Acquafredda-Maratea (Ita).
- ✓ Appendino, G.; Mainieri, F.; De Lucia, M.; **Panzella, L.**; Napolitano, A.; d'Ischia, M. **La chimica del mentofurano: reazione con acido nitrico e acido nitroso, ossidazione a mentofurolattoni, e trapping periciclico con dienofili.** VII Convegno Nazionale "Giornate di Chimica delle Sostanze Naturali", 7-10 giugno 2006, Acquafredda-Maratea (Ita).
- ✓ De Lucia, M.; **Panzella, L.**; Crescenzi, O.; Napolitano, A.; Barone, V.; d'Ischia, M. **Il piceatannolo come agente antinitrosante: caratterizzazione di un inusuale prodotto di nitrurazione e analisi DFT del meccanismo di**

- formazione.** VII Convegno Nazionale “Giornate di Chimica delle Sostanze Naturali”, 7-10 giugno **2006**, Acquafredda-Maratea (Ita).
- ✓ Manini, P.; **Panzella, L.**; Napolitano, A.; d’Ischia, M. **Studio comparativo della formazione di gliosale per degradazione ossidativa di monosaccaridi e composti correlati indotta dal reagente di Fenton.** VII Convegno Nazionale “Giornate di Chimica delle Sostanze Naturali”, 7-10 giugno **2006**, Acquafredda-Maratea (Ita).
 - ✓ De Lucia, M.; **Panzella, L.**; Pezzella, A.; Napolitano, A.; d’ Ischia, M. **Un profilo della chimica ossidativa dell’idrossitirosolo in condizioni biomimetiche.** II Scuola delle Sostanze Naturali e di Chimica Bioorganica “Luigi Minale”, 29 giugno 2 luglio **2005**, Napoli (Ita).
 - ✓ **Panzella, L.**; Pezzella, A.; Napolitano, A.; d’Ischia, M. **Sintesi e caratterizzazione di tetrameri del 5,6-diidrossiindolo.** XXX Congresso Nazionale della Divisione di Chimica Organica della Società Chimica Italiana, 19-23 settembre **2005**, Siena (Ita).
 - ✓ **Panzella, L.**; De Lucia, M.; Pezzella, A.; Napolitano, A.; d’Ischia, M. **Basi chimiche dell’attività antiossidante e antinitrosante dell’idrossitirosolo.** XXX Congresso Nazionale della Divisione di Chimica Organica della Società Chimica Italiana, 19-23 settembre **2005**, Siena (Ita).
 - ✓ Pezzella, A.; **Panzella, L.**; Napolitano, A.; d’Ischia, M.; Land, E. J. **Oxidation chemistry of 5,6-dihydroxyindole dimers: a pulse radiolysis investigation of (semi)quinone intermediates and isolation of new tetramers.** 19th IPCC 18-22 Settembre **2005**, Reston, Virginia (USA).
 - ✓ Napolitano, A.; Manini, P.; **Panzella, L.**; Prizio, E.; Procaccini, E. M.; Monfrecola, G.; d’Ischia, M. **Benzothiazole carboxylic acid (BTCA) vs thiazole tricarboxylic acid (TTCA) as specific pheomelanin markers: relationship with skin phototype and UV sensitivity.** 19th IPCC 18-22 Settembre **2005**, Reston, Virginia (USA).