



## Zastosowanie spektroskopii EPR w badaniach jakościowych i ilościowych centrów paramagnetycznych melanin

### Application of EPR spectroscopy in qualitative and quantitative examinations of paramagnetic centers in melanin

Ewa Chodurek<sup>1</sup> , Barbara Pilawa<sup>2</sup> <sup>1</sup>Katedra i Zakład Biofarmacji, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach<sup>2</sup>Katedra i Zakład Biofizyki, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

#### STRESZCZENIE

Spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego (*electron paramagnetic resonance* – EPR) jest metodą przydatną w biologii i medycynie do badania substancji paramagnetycznych, ich roli w procesach chorobowych oraz terapii. Celem pracy jest przedstawienie podstaw fizycznych spektroskopii EPR oraz dokonanie przeglądu zastosowań metody EPR do badań jakościowych i ilościowych centrów paramagnetycznych melanin. Omówiono możliwości spektroskopii EPR i procedury eksperymentalne stosowane do wyznaczenia rodzajów centrów paramagnetycznych występujących w melaninach syntetycznych oraz w biopolimerach melaninowych. Parametrem spektroskopowym przydatnym do określenia rodzaju centrów paramagnetycznych jest współczynnik rozszczepienia spektroskopowego  $g$ , który zależy od lokalizacji niesparowanego elektronu w cząsteczce. W melaninach występują o-semichinonowe wolne rodniki o spinie  $S = 1/2$  oraz birodniki o spinie  $S = 1$ . Wolne rodniki i birodniki można odróżnić spektroskopowo poprzez analizy wpływu temperatury pomiaru na intensywność integralną linii EPR. Koncentracja centrów paramagnetycznych w melaninie jest proporcjonalna do intensywności integralnej widma EPR. Przedstawiono wpływ paramagnetycznych i diamagnetycznych jonów metali oraz tlenu na koncentrację centrów paramagnetycznych w melaninie. Dokonano przeglądu publikacji dotyczących wpływu substancji leczniczych na koncentrację centrów paramagnetycznych w melaninie. Przedstawiono przydatność spektroskopii EPR w identyfikowaniu melaniny w próbkach biologicznych, m.in. komórkach nowotworowych, bakteriach i grzybach.

#### SŁOWA KLUCZOWE

melanina, komórki nowotworowe, centra paramagnetyczne, wolne rodniki, birodniki, spektroskopia EPR

Received: 12.07.2021

Revised: 27.09.2021

Accepted: 13.12.2021

Published online: 27.04.2022

Adres do korespondencji: dr hab. n. farm. Ewa Chodurek, Katedra i Zakład Biofarmacji, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, ul. Jedności 8, 41-200 Sosnowiec, tel. +48 32 364 12 67, e-mail: echodurek@sum.edu.pl



Artykuł opublikowany w modelu Open Access i udostępniony na licencji Creative Commons Uznanie autorstwa-Na tych samych warunkach 4.0 Międzynarodowe (CC BY-SA 4.0), określającej zasady jego wykorzystania. Dozwolone jest kopiowanie, zmienianie, rozprowadzanie i przedstawianie utworu w dowolnym celu, także komercyjnym, pod warunkiem oznaczenia autorstwa i wykonanych modyfikacji utworu, jeśli takie zostały wykonane, a przetwarzając lub tworząc na podstawie utworu, należy udostępnić swoje dzieło na tej samej licencji co oryginał. Pełny tekst licencji dostępny na stronie <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/legalcode.pl>.

Wydawca: Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

**ABSTRACT**

Electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy is a method useful in biology and medicine to examine paramagnetic substances, their role in disease processes and therapy. The aim of this review work is to present the physical foundations of EPR spectroscopy and to review the applications of the EPR method for the qualitative and quantitative research on paramagnetic centers in melanin. The possibilities of EPR spectroscopy and experimental procedures applied to determine the types of paramagnetic centers existing in synthetic melanin and in melanin biopolymers are discussed. A useful spectroscopic parameter to determine the type of paramagnetic centers is the spectroscopic cleavage coefficient  $g$ , which depends on the location of the unpaired electron in the molecule. *o*-Semiquinone free radicals with spin  $S = 1/2$  and biradicals with spin  $S = 1$ , exist in melanin. Free radicals and biradicals can be distinguished spectroscopically by analysing the influence of temperature on the integral intensity of EPR lines. The concentration of paramagnetic centers in melanin is proportional to the intensity of the integral EPR spectrum. The influence of paramagnetic and diamagnetic metal ions, and oxygen on the concentration of paramagnetic centers in melanin is presented. The publications on the influence of medicinal substances on the concentration of paramagnetic centers in tumor cells were reviewed. The usefulness of EPR spectroscopy in identifying melanin in biological samples, among others, cancer cells, bacteria, and fungi, is presented.

**KEY WORDS**

melanin, tumor cells, paramagnetic centers, free radicals, biradicals, EPR spectroscopy

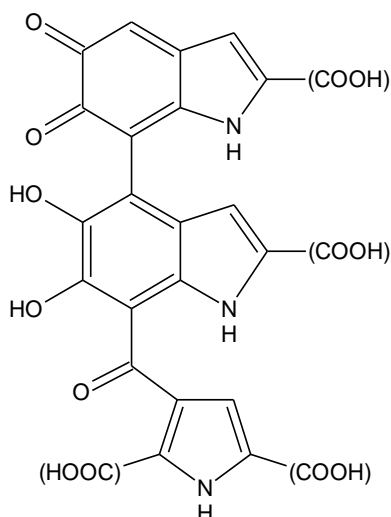
**WPROWADZENIE**

Paramagnetyczne właściwości melanin mają duże znaczenie w medycynie i farmacji. Celem pracy jest przedstawienie podstaw fizycznych spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego (*electron paramagnetic resonance* – EPR) oraz przegląd zastosowań metody EPR do badań jakościowych i ilościowych centrów paramagnetycznych melanin. Zastosowanie metody EPR w okulistyce i w farmacji przedstawiono we wcześniejszych pracach [1,2,3]. W niniejszej omówiono możliwości spektroskopii EPR i procedury eksperymentalne stosowane do wyznaczenia rodzajów centrów paramagnetycznych występujących w melaninach syntetycznych i biopolimerach melaninowych z uwzględnieniem melaniny pochodzącej z komórek nowotworowych. Szczególną uwagę zwrócono na spektroskopowe metody identyfikacji różnych rodzajów centrów paramagnetycznych oraz na znaczenie analizy kształtu linii układów wieloskładnikowych. Pokazano przykłady występowania kilku rodzajów centrów paramagnetycznych w melaninie. Przedstawiono zbiorczo informacje dotyczące różnych rodzajów centrów paramagnetycznych, które zostały dotychczas zidentyfikowane w melaninie z wykorzystaniem metody EPR. Szczególną uwagę zwrócono na to, iż *o*-semichinonowe wolne rodniki nie są jedynymi centrami paramagnetycznymi w melaninie. Dokonano przeglądu badań centrów paramagnetycznych biopolimerów melaninowych różnego pochodzenia.

**Melaniny**

Melaniny występujące w organizmach ludzkich i zwierzęcych to polimery sklasyfikowane jako eumelaniny [4,5]. Eumelaniny zawierają głównie atomy węgla (C), wodoru (H) i tlenu (O), natomiast siarka (S) występuje dodatkowo w feomelaninach [5,6]. Melaniny pochodzenia roślinnego nazywane są allomelaninami [4,5].

W przyrodzie najczęściej występuje eumelanina, której syntetycznym odnośnikiem jest DOPA-melanina [4,5,6,7,8]. Badania budowy chemicznej modelowej eumelaniny z wykorzystaniem metody GC-MS (*gas chromatography–mass spectrometry*) wykazały, że wśród produktów pirolizy DOPA-melaniny występują m.in.: pirol (ok. 29,2%), fenol (ok. 16,4%), kwas octowy (ok. 12,1%), benzonitryl i 4-metylofenol (po ok. 6%), 4-metoksybenzoacetonitryl (ok. 4%), 1,2-benzenodiol (ok. 3,5%), benzen (ok. 3,4%), styren (ok. 3,2%), 2-metylopirol (ok. 3%), metylobenzen (ok. 2,6%), 3-metylopirol (ok. 1,6%), indol (ok. 1,5%) i izoindolo-1,3-dion (ok. 2,3%) [6]. Badania te potwierdziły, iż eumelaniny są silnie heterogennymi polimerami składającymi się głównie z jednostek 5,6-dihydroksyindolu i kwasu 5,6-dihydroksyindolo-2-karboksylowego (ryc. 1) [9]. Produkty pirolizy melanin charakteryzuje różnorodność związków chemicznych [6,7,8], co może mieć odzwierciedlenie w złożonym układzie centrów paramagnetycznych melaniny.



Ryc. 1. Struktura chemiczna eumelanin wg [9].  
Fig. 1. Chemical structure of eumelanin according to [9].

### Centra paramagnetyczne i wpływ pola magnetycznego na paramagnetyki

Centra paramagnetyczne charakteryzuje nieparzysta liczba elektronów [10]. Centrami paramagnetycznymi są wolne rodniki, jonorodniki, jony metali przejściowych, gazy dwuatomowe: tlen w stanie podstawowym trypletowym  $O_2$  i tlenek azotu NO, gazy wieloatomowe  $NO_2$  i  $ClO_2$ , a także birodniki [10,11,12,13,14,15]. Wolne rodniki różnią się trwałością, zależącą od ich struktury chemicznej i parametrów ośrodka, w którym występują [12,13,14,15]. Trwałe są na przykład wolne rodniki aromatyczne z silnie zdelokalizowanym niesparowanym elektronem, wolne rodniki hydrazylowe, allilowe oraz benzytowe [12]. Do nietrwałych wolnych rodników zalicza się na przykład rodnik hydroksylowy  $\cdot OH$  oraz wodoronadtlenkowy  $HO_2\cdot$  [13]. Jonorodnikiem jest anionorodnik ponadtlenkowy  $O_2\cdot^-$  [13]. Do jonów paramagnetycznych należą jony  $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Cr^{3+}$  [10,11,12,13]. Zdelokalizowane elektrony  $\pi$  odpowiadają za paramagnetyzm fulerenów [16,17,18,19], nanorurek węglowych [20,21] i grafitu [18,22]. Substancje zawierające centra paramagnetyczne w polu magnetycznym magnesują się zgodnie z kierunkiem pola [10]. Przenikalność magnetyczna to wielkość wskazująca na zdolność danego materiału do zmiany indukcji magnetycznej  $B$  ze zmianą natężenia pola magnetycznego  $H$ . Przenikalność magnetyczna  $\mu$  dla paramagnetyków jest nieco większa od 1. Związek indukcji magnetycznej z natężeniem pola magnetycznego  $H$  jest wyrażony następującym równaniem [10]:

$$B = \mu H = \mu_0 \mu_r H$$

gdzie:  $\mu$  – bezwzględna przenikalność magnetyczna,  $\mu_0$  – przenikalność magnetyczna próżni,  $\mu_r$  – względna przenikalność magnetyczna ośrodka.

Namagnesowanie  $M$  (moment magnetyczny jednostki objętości substancji) paramagnetyków w polu magnetycznym o natężeniu  $H$  wyraża wzór [10]:

$$M = \chi H$$

gdzie:  $\chi$  – objętościowa podatność magnetyczna.

### Spektroskopia EPR

Ogólna charakterystyka metody – kwantowe podstawy teoretyczne i aparatura

Spektroskopia EPR to metoda badania centrów paramagnetycznych, której podstawą jest zjawisko elektronowego rezonansu paramagnetycznego [10,11,23,24,25,26,27,28]. Zjawisko to zachodzi w polu magnetycznym i polega na absorpcji promieniowania mikrofalowego przez niesparowane elektrony centrów paramagnetycznych. Zjawisko elektronowego rezonansu paramagnetycznego opisuje równanie [10,23,24,25,26,27]:

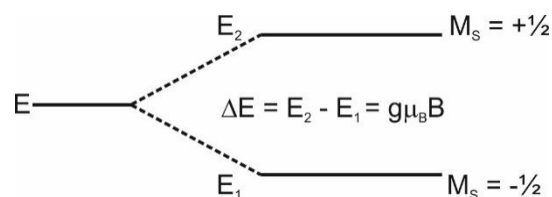
$$h\nu = g\mu_B B_r$$

gdzie:  $h$  ( $6,6256 \times 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$ ) – stała Plancka,  $\nu$  – częstotliwość promieniowania mikrofalowego,  $\mu_B$  ( $9,2732 \times 10^{-24} \text{ J/T}$ ) – magneton Bohra,  $B_r$  – rezonansowa indukcja magnetyczna.

W polu magnetycznym o indukcji  $B$  zachodzi efekt Zeemana dotyczący rozszczepienia poziomów energetycznych  $\Delta E$ , które wynosi [10,23,24,25,26,27]:

$$\Delta E = g\mu_B B$$

Moment magnetyczny elektronu wynika z jego momentu pędu [10]. Orbitalny moment pędu elektronu wynika z ruchu elektronu po orbicie, a składowa orbitalnego momentu pędu w kierunku pola magnetycznego  $m_l$  może przyjmować  $2l+1$  wartości:  $l, (l-1), \dots, 0, -(l-1), -l$ . Z ruchem elektronu wokół osi własnej związany jest moment pędu nazywany spinem. Magnetyczna liczba spinowa  $m_s$  oznaczająca rzut spinu  $s$  na kierunek pola magnetycznego może przyjmować wartości  $+1/2$  i  $-1/2$ . Moment magnetyczny elektronu o  $l = 0$  i o spinie  $S = +1/2$  w polu magnetycznym przyjmuje położenie antyrównoległe do kierunku pola. Moment magnetyczny elektronu o  $l = 0$  i o spinie  $S = -1/2$  w polu magnetycznym ustawia się równoległe do kierunku pola. Stanom tym odpowiada inna energia, a rozszczepienie poziomów energetycznych jest proporcjonalne do wartości indukcji magnetycznej pola  $B$  (ryc. 2) [10,23].



Ryc. 2. Rozszczepienie Zeemana poziomu energetycznego dwukrotnie zdegenerowanego dla elektronu o spinie  $S = +1/2$  wg [10,23].

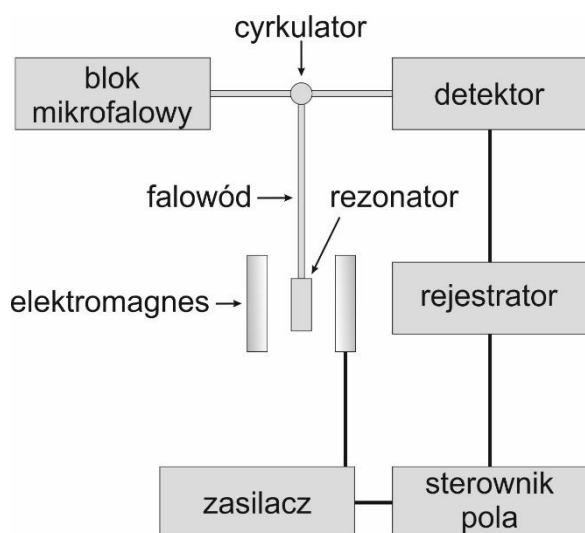
Fig. 2. Zeeman effect of doubly degenerate energy level for electron with spin  $S = +1/2$  according to [10,23].

Spektroskopia EPR wykorzystuje przejścia kwantowe elektronów pomiędzy stanami energetycznymi o energiach  $E_1$  i  $E_2$ . Elektrony w polu magnetycznym o indukcji  $B$  pochłaniają energię promieniowania mikrofalowego o częstotliwości  $\nu$  wynoszącą  $h\nu$ , a więc energię potrzebną na przejście elektronu z niższego poziomu energetycznego ( $E_1$ ) na wyższy ( $E_2$ ; ryc. 2). Energia



mikrofalowa absorbowana przez niesparowane elektrony substancji paramagnetycznej dostarcza informacji jakościowych i ilościowych o jej centrach paramagnetycznych [10,23,24,25,26].

Spektrometr elektronowego rezonansu paramagnetycznego posiada elektromagnes wytwarzający pole magnetyczne wraz z zasilaczem i sterownikiem pola, rezonator, blok mikrofalowy, cyrkulator, detektor oraz system rejestrujący (ryc. 3) [23,24]. Próbkę paramagnetyczną umieszcza się podczas badania w rezonatorze, gdzie zachodzą omówione wcześniej zjawiska kwantowe. Mikrofałe wytwarzane są w bloku mikrofalowym, a ich propagacja zachodzi w falowodach. Źródłem promieniowania mikrofalowego może być klitron. Detektor odbiera sygnał odbity od rezonatora. Rolą cyrkulatora jest izolacja źródła mikrofal nadawanych w kierunku próbki w rezonatorze i detektora, który odbiera mikrofałe odbite od rezonatora. Rejestrator zapisuje widmo EPR próbki w postaci zmiany wartości mocy mikrofalowej  $Y$  w funkcji indukcji pola magnetycznego  $B$  jako  $Y = f(B)$ .



Ryc. 3. Schemat blokowy spektrometru EPR wg [23].  
Fig. 3. Block diagram of EPR spectrometer according to [23].

Spektroskopia EPR stosuje częstotliwości promieniowania mikrofalowego z następujących pasm: X (1,1 GHz), S (3,0 GHz), X (9,4 GHz), K (24 GHz), Q (35 GHz) oraz W (94 GHz) [23].

#### Badania jakościowe

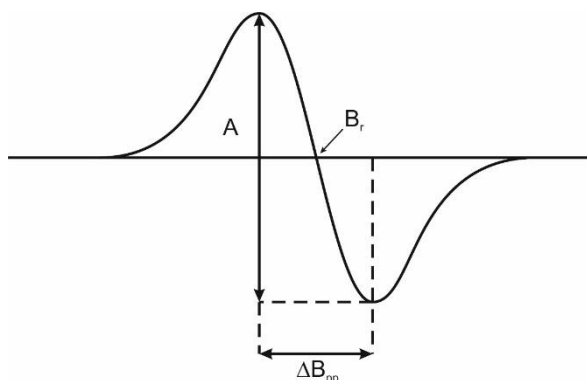
Pomiary jakościowe z wykorzystaniem spektroskopii EPR dotyczą określenia rodzajów centrów paramagnetycznych występujących w badanej substancji [10,11,23,24,25,26,29,30,31,32,33,34]. Dla próbek z jednym rodzajem centrów paramagnetycznych rejestruje się pojedynczą linię EPR. Widma wieloskładnikowe mierzone są w przypadku kilku rodzajów centrów paramagnetycznych występujących w próbkach, liczba linii składowych w widmie odpowiada liczbie centrów. Dla melanin rejestrowano zarówno pojedyncze linie EPR [35,36,37,38,39], jak i widma wieloskładnikowe [40,41,42].

Parametrem spektroskopowym charakteryzującym rodzaj centrum paramagnetycznego jest współczynnik rozszczepienia spektroskopowego  $g$  wyznaczany z warunku rezonansu jako [10,23,24,25,26,27]:

$$g = hv/\mu_B B_r$$

gdzie:  $h$  ( $6,6256 \times 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$ ) – stała Plancka,  $\nu$  – częstotliwość promieniowania mikrofalowego,  $\mu_B$  ( $9,2732 \times 10^{-24} \text{ J/T}$ ) – magneton Bohra,  $B_r$  – rezonansowa indukcja magnetyczna.

W przypadku pojedynczej linii EPR współczynnik rozszczepienia spektroskopowego  $g$  obliczany jest po wyznaczeniu wartości rezonansowej indukcji magnetycznej  $B_r$  z widma (ryc. 4).



Ryc. 4. Poglądowe widmo EPR w postaci pierwszej pochodnej absorpcji oraz parametry:  $B_r$  – rezonansowa indukcja magnetyczna,  $A$  – amplituda linii,  $\Delta B_{pp}$  – szerokość linii (opracowanie własne).

Fig. 4. Illustrative EPR spectrum in form of first absorption derivative and parameters:  $B_r$  – resonance magnetic induction,  $A$  – line amplitude,  $\Delta B_{pp}$  – linewidth (author's own study).

Gdy widmo jest złożone, współczynnik rozszczepienia spektroskopowego  $g$  dla poszczególnych rodzajów centrów paramagnetycznych uzyskuje się po wyznaczeniu rezonansowych indukcji magnetycznych  $B_r$  dla odpowiadających im linii składowych. Procedurę tę umożliwia dekonwolucja eksperymentalnego widma EPR na linie składowe poprzez dopasowanie sumy linii teoretycznych do mierzonego widma wypadkowego. Teoretycznym liniom składowym przypisuje się najczęściej kształt krzywych Gaussa lub Lorentza [25,26]. Linie EPR mogą wykazywać także kształt gaussowsko-lorentzowski.

Oddzielnym zagadnieniem badań jakościowych centrów paramagnetycznych jest identyfikacja birodników poprzez pomiary temperaturowe ich linii EPR w zakresie od niskich temperatur (np. temperatura ciekłego azotu) do temperatury pokojowej. Intensywności integralne ( $I$ ) linii EPR birodników w odróżnieniu od wolnych rodników nie spełniają prawa Curie opisanego równaniem [10,25,26]:

$$I = C/T$$

gdzie:  $C$  – stała,  $T$  – temperatura pomiaru widma EPR.

Zależność intensywności integralnej ( $I$ ) linii EPR birodników od temperatury pomiaru ( $T$ ) opisują inne funkcje matematyczne. Badania temperaturowe widm EPR wykazały występowanie w melaninach birod-



ników o sygnałach nie spełniających prawa Curie [43,44,45,46,47,48].

Jakościowe badania polegające na ocenie, czy układ centrów paramagnetycznych jest jednoskładnikowy czy wieloskładnikowy, mogą być prowadzone w formie analizy wpływu mocy mikrofalowej użytej podczas pomiaru linii na kształt widma EPR. Kształt wieloskładnikowych widm EPR zmienia się wraz z mocą mikrofalową [25,26,29]. Na zmianę kształtu widm EPR wskazuje na przykład zmiana parametrów asymetrii widma ze wzrostem mocy mikrofalowej. Zmiana kształtu widma może wynikać ze zmiany parametrów linii składowych zależnych w odmienny sposób od mocy mikrofalowej. Wyznaczenie wpływu mocy mikrofalowej na amplitudy (A), intensywności integralne (I) oraz szerokości ( $\Delta B_{pp}$ ) poszczególnych linii składowych widm EPR substancji zawierającej kilka rodzajów centrów paramagnetycznych wymaga dekonwolucji widm zarejestrowanych przy różnych mocach.

#### *Badania ilościowe*

Spektroskopia EPR służy także do badań ilościowych centrów paramagnetycznych z wykorzystaniem stabilnych wzorców paramagnetycznych [23,24,25,26,29,30,31,32,33]. Koncentracja centrów paramagnetycznych (N) w próbce jest proporcjonalna do intensywności integralnej ( $I_p$ ) jej linii EPR. Wartość koncentracji centrów paramagnetycznych w testowanej próbce uzyskuje się poprzez porównanie intensywności integralnej ( $I_p$ ) linii EPR próbki z intensywnością integralną ( $I_w$ ) linii EPR wzorca [29,30,31,32,33]. Próbką wzorcową może być na przykład ultramaryna – glinokrzemian sodowy zawierający siarkę [49,50,51,52]. Intensywność integralną linii EPR mierzonych jako pierwsza pochodna absorpcji uzyskuje się poprzez dwukrotne wykonanie całkowania krzywej eksperymentalnej [29,30,31,32,33].

### **Rodzaje centrów paramagnetycznych melanin a ich widma EPR**

#### *o-Semichinonowe wolne rodniki w melaninie*

Centra paramagnetyczne, występujące głównie w modelowej eumelaninie, to o-semichinonowe wolne rodniki dające silne sygnały EPR [1,2,35,36,37,38]. Linie EPR o-semichinonowych wolnych rodników o współczynniku rozszczepienia spektroskopowego g wynoszącym 2,0036 [53], 2,0038 [6], 2,0043 [54] i 2,0045 [55] zarejestrowano dla DOPA-melaniny. Wartość współczynnika g dla o-semichinonowych wolnych rodników w kompleksach DOPA-melanina-kanamycyna wynosi 2,0045, dla kompleksów (DOPA-melanina-Cu)-kanamycyna (stężenie kanamycyny  $1 \times 10^{-3}$  M, stężenia Cu(II):  $1 \times 10^{-5}$  M,  $5 \times 10^{-5}$  M,  $1 \times 10^{-4}$  M,  $5 \times 10^{-4}$  M,  $1 \times 10^{-3}$  M) wynosi 2,0044 lub 2,0045, a dla kompleksów (DOPA-melanina-Cu)-kanamycyna-Cu(II) jest z zakresu 2,0040–2,0045 [55]. Wartość współczynnika g dla o-semichinonowych wolnych rodników w DOPA-melaninie, kompleksach DOPA-melanina-netylmycyna, kompleksach DOPA-melaniny z netyl-

mycyną i jonami Cu(II) oraz kompleksach DOPA-melaniny z netylmycyną i jonami Zn(II) wynosiła 2,0039–2,0040 [56]. Współczynnik g dla wolnych rodników w kompleksach DOPA-melaniny z gentamycyną wynosił 2,0043 [54]. Współczynnik g dla wolnych rodników w kompleksach DOPA-melaniny z diamagnetycznymi jonami Zn(II) w stosunkach wagowych 2 : 1, 1 : 1 i 1 : 2 wynosił odpowiednio 2,0041, 2,0038 i 2,0041 [6].

Pomiary widm EPR wykazały, że o-semichinonowe wolne rodniki o wartościach współczynnika rozszczepienia spektroskopowego g wynoszących 2,0043 i 2,0045 występują w biopolimerze melaninowym siatkówki oka ludzkiego w przypadku dawców w wieku poniżej 22 oraz powyżej 45 lat [57]. Linie EPR charakterystyczne dla o-semichinonowych wolnych rodników o wartości współczynnika rozszczepienia spektroskopowego g równej 2,0045 zarejestrowano dla melaniny z *Sepia officinalis* [58]. Sygnały EPR o-semichinonowych wolnych rodników o współczynniku g wynoszącym 2,0039 obserwowano dla melaniny w upigmentowanych grzybach glebowych *Cladosporium cladosporioides* [59]. Współczynnik rozszczepienia spektroskopowego g dla melaniny w *Cladosporium cladosporioides* po kompleksowaniu diamagnetycznymi jonami Zn(II) przybierał wartości 2,0039–2,0040, a dla kompleksów z paramagnetycznymi jonami Cu(II) wartości g były z zakresu 2,0036–2,0040. Linie EPR wolnych rodników o współczynniku g wynoszącym 2,0042 rejestrowano dla melaniny wyizolowanej z grzybów *Auricularia auricula*, wykazujących działanie przeciw *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Pseudomonas fluorescens* [60].

Melanina występująca w ścianie komórkowej grzybów *Cryptococcus neoformans* zawiera, podobnie do DOPA-melaniny, wolne rodniki o współczynniku g 2,0030 [61]. Współczynnik rozszczepienia g o-semichinonowych wolnych rodników w modelowych neuromelaninach uzyskanych z adrenaliny i dopaminy wynosi odpowiednio 2,0039 [62].

Melaniny wykazują charakterystyczny silny sygnał EPR, co ma zastosowanie w identyfikowaniu melaniny w próbkach biologicznych. Wolne rodniki w melaninach charakteryzuje duża stabilność. Po 24 latach zarejestrowano – podobne do sygnałów początkowych – linie EPR wolnych rodników melaniny występującej w winogronach [5].

#### *Złożony układ centrów paramagnetycznych w melaninie*

Analizy kształtu widm EPR wykazały złożoność układu centrów paramagnetycznych niektórych melanin [55,62,63]. Widma EPR rejestrowane dla substancji czy materiału, w którym występuje kilka rodzajów centrów paramagnetycznych, są wieloskładnikowe [23,24,25,26,27]. Linie rezonansowe każdej grupy centrów paramagnetycznych znajdują się w przypadkowym widmie EPR takich próbek. Centra paramagnetyczne każdego rodzaju pochłaniają promieniowanie mikrofalowe, a częstotliwość tego promieniowania jest



skorelowana z indukcją pola magnetycznego, w którym pojawia się ich sygnał EPR. Związek pomiędzy częstotliwością promieniowania mikrofalowego ( $\nu$ ) i wartością indukcji magnetycznej ( $B$ ) określa wspomniany wcześniej warunek elektronowego rezonansu paramagnetycznego [10,23,24,25,26,27]. W pomiarach spektroskopowych centra paramagnetyczne można odróżnić m.in. na podstawie wartości indukcji pola magnetycznego  $B$ , przy której zarejestrowano ich sygnał EPR. Widmo EPR uzyskane podczas pomiaru jest superpozycją linii pochodzących od poszczególnych centrów paramagnetycznych [23,24,25,26,27]. Możliwość badania złożonego układu centrów paramagnetycznych z wykorzystaniem spektroskopii EPR jest istotna z punktu widzenia medycyny, farmacji, kosmologii, biologii oraz biotechnologii, ponieważ próbki biologiczne (np. tkanki, komórki, biopolimery) ze względu na złożoną budowę charakteryzuje różnorodność związków o momencie magnetycznym różnym od zera oraz różna lokalizacja niesparowanych elektronów w centrach paramagnetycznych [13,14,15,34]. Poprzez analizy numeryczne kształtu widm EPR złożony układ centrów paramagnetycznych znaleziono w polimerach melaninowych: DOPA-melaninie [55], DOPA-melaninie o różnym pH [63] oraz w neuromelaninie [62]. Eksperymentalne widmo EPR DOPA-melaniny w postaci ciała stałego przybliżano za pomocą funkcji teoretycznych Gaussa (G) i Lorentza (L) opisanych następującymi równaniami [55]:

$$Y_G = (-A_G)((B - B_{rG})/\Delta B_{rG})\exp(-0.5(((B - B_{rG})/\Delta B_{rG})^2))$$

(linia gaussowska)

$$Y_L = ((-2)A_L(B - B_{rL})/(\Delta B_{rL}^2(1 + (((B - B_{rL})/\Delta B_{rL})^2))))^2$$

(linia lorentzowska)

W dopasowaniach kształtu linii eksperymentalnej uwzględniono pojedynczą linię o kształcie gaussowskim (G), pojedynczą linię o kształcie lorentzowskim (L), linie dwuskładnikowe będące sumą dwóch funkcji Gaussa (G+G) i dwóch funkcji Lorentza (L+L) oraz linie będące sumą funkcji Gaussa i Lorentza (G+L) [55]. Nie uzyskano zadowalającego przybliżenia linii doświadczalnej DOPA-melaniny za pomocą pojedynczej linii o kształcie gaussowskim lub lorentzowskim, co wskazuje, że nie tylko jeden rodzaj centrów paramagnetycznych występuje w DOPA-melaninie. Widma EPR DOPA-melaniny przybliżono najlepiej linią stanowiącą superpozycję dwóch linii, o kształcie gaussowskim i lorentzowskim (G+L). Wynik przeprowadzonych analiz kształtu widma EPR wskazuje, iż w DOPA-melaninie poza o-semichinonowymi wolnymi rodnikami występują także inne centra paramagnetyczne [55].

Paulin i wsp. [63] wykonali analizy kształtu widm EPR, których celem było zbadanie natury centrów paramagnetycznych w melaninach. Dopasowanie krzywych teoretycznych do widm eksperymentalnych różnych melanin w postaci zawiesin w środowisku kwaśnym (pH = 1,6), obojętnym (pH = 6,9) i zasadowym

(pH = 12,3) wykazało występowanie w tych polimerach trzech różnych rodzajów centrów paramagnetycznych. Przeprowadzone przez autorów symulacje komputerowe wskazały, że eksperymentalne widma EPR testowanych zawiesin melanin można przybliżyć najlepiej za pomocą krzywej wieloskładnikowej będącej superpozycją trzech linii różniących się wartością współczynnika rozszczepienia spektroskopowego  $g$  i wartością szerokości linii  $\Delta B_{pp}$ . Uzyskano następujące parametry linii składowych widma EPR badanych melanin:  $g_1 = 2,0038$  i  $\Delta B_{pp1} = 0,380$  mT (linia 1),  $g_2 = 2,0026$  i  $\Delta B_{pp2} = 0,396$  mT (linia 2) oraz  $g_3 = 2,0049$  i  $\Delta B_{pp3} = 0,350$  mT (linia 3). Dwa pierwsze sygnały (linia 1 i linia 2) przypisano centrom paramagnetycznym, które powstały podczas syntezy melaniny przy udziale defektów azotowych N w mieszaninie, natomiast sygnał trzeci (linia 3) pochodzi od o-semichinonowych wolnych rodników. Autorzy sugerowali, że centra paramagnetyczne odpowiedzialne za linię 1 i linię 2 pochodzą prawdopodobnie od defektów azotowych związanych z różnymi formami redoks monomerów melaninowych. Analizy numeryczne przeprowadzone przez autorów potwierdziły występowanie kilku składowych w widmach EPR melanin, za które odpowiadają centra paramagnetyczne o różnym współczynniku rozszczepienia spektroskopowego  $g$ .

Złożony układ wolnorodnikowy zasygnalizowano dla melaniny z *Sepia officinalis* [58]. Stwierdzono zmianę parametrów kształtu  $A_1-A_2$  i  $B_1-B_2$  widma EPR rejestrowanych w temperaturze pokojowej dla tej melaniny ze wzrostem mocy mikrofalowej. Na podstawie zależności parametrów kształtu  $A_1-A_2$ ,  $A_1-A_2$ ,  $B_1/B_2$  i  $B_1-B_2$  widm EPR od mocy mikrofalowej dla pomiarów wykonanych w temperaturach 125 K i 275 K wykazano obecność więcej niż jednego rodzaju centrów paramagnetycznych w melaninie wyizolowanej ze szczepu czarnego *Drosophila melanogaster* [64]. Sugerowano występowanie w melaninie ze szczepu czarnego *Drosophila melanogaster* o-semichinonowych wolnych rodników ( $S = 1/2$ ) i stanów trypletowych ( $S = 1$ ).

Wieloskładnikowe widma EPR zarejestrowano także dla modelowej neuromelaniny [62]. Złożony układ wolnorodnikowy składający się z o-semichinonowych wolnych rodników i wolnych rodników z niesparowanym elektronem zlokalizowanym na atomie azotu wykazano w przypadku melaniny uzyskanej w procesie autooksydacji noradrenaliny. Poprzez numeryczne analizy kształtu widm wykazano, że widma EPR melaniny z noradrenaliny stanowią superpozycję dwóch linii składowych o kształcie opisanym funkcją Gaussa i Lorentza różniących się szerokością ( $\Delta B_{pp}$ ) oraz wartością współczynnika rozszczepienia spektroskopowego  $g$ . W widmach EPR melaniny z noradrenaliny występuje szeroka linia gaussowska o szerokości 0,81 mT oraz wąska linia lorentzowska o szerokości 0,45 mT. Wartość współczynnika rozszczepienia spektroskopowego  $g$  typową dla o-semichinonowych wolnych rodników wynoszącą 2,0040 uzyskano dla wąskiej linii składowej, a wartość współczynnika  $g$  wyno-



szącą 2,0030 uzyskano dla wolnych rodników azotowych odpowiedzialnych za linię szeroką. W przypadku melaniny uzyskanej z adrenaliny i dopaminy widma EPR nie wykazywały struktury wieloskładnikowej i zarejestrowano dla nich pojedyncze linie EPR pochodzące od o-semichinonowych wolnych rodników.

#### Birodniki w melaninie

Analizy spektroskopowe widm EPR melanin w szerokim zakresie temperatury pomiaru, od niskich temperatur (10 K) do temperatury pokojowej (300 K), przyczyniły się do odkrycia w melaninach centrów paramagnetycznych nie podlegających prawu Curie – birodników [43,44,45,46]. Zależności intensywności integralnej (I) linii EPR melanin od temperatury pomiaru (T) w zakresie 10–300 K wykazały wyraźnie odstępstwa od prawa Curie. Intensywność integralna (I) birodników – centrów paramagnetycznych o spinie  $S = 1$  – zmienia się ze wzrostem temperatury według funkcji o następującej postaci matematycznej [26,43,45]:

$$IT = C + B/[\exp(J/kT) + 3]$$

gdzie: I – intensywność integralna linii EPR, T – temperatura pomiaru, C i B – stałe, J – energia wzbudzenia singlet ( $S = 0$ ) – tryplet ( $S = 1$ ), k – stała Boltzmanna. Obecność birodników stwierdzono w przypadku DOPA-melaniny [43,44,45,46], kompleksów DOPA-melaniny z kanamycyną, kanamycyną i paramagnetycznymi jonami  $\text{Cu}^{2+}$  [43,45], kompleksów DOPA-melaniny z netylmycyną, netylmycyną i jonami  $\text{Cu}^{2+}$ , netylmycyną i jonami  $\text{Zn}^{2+}$  [46] oraz melaniny ze szczepu czarnego *Drosophila melanogaster* [47].

#### Paramagnetyczne jony w kompleksach melaninowych

Paramagnetyczne jony występujące w kompleksach melaninowych można zidentyfikować na podstawie położenia ich linii EPR na skali indukcji magnetycznej B. Dla paramagnetycznych jonów występujących w melaninie obserwowano linie EPR w polu magnetycznym o innych wartościach indukcji magnetycznej aniżeli linie EPR o-semichinonowych wolnych rodników [53,55,56,62,65]. Na przykład linie EPR jonów  $\text{Cu}^{2+}$  występują w polach o niższej indukcji magnetycznej B w porównaniu z o-semichinonowymi wolnymi rodnikami melaniny, a wartości ich współczynnika rozszczepienia spektroskopowego były równe 2,1 dla kompleksów DOPA-melaniny z jonami  $\text{Cu}^{2+}$  [4,56], kompleksów DOPA-melaniny z kanamycyną i jonami  $\text{Cu}^{2+}$  [55] oraz dla kompleksów DOPA-melaniny z netylmycyną i jonami  $\text{Cu}^{2+}$  [56]. Współczynnik g o wartości 2,1 uzyskano także dla paramagnetycznych jonów  $\text{Cu}^{2+}$  w kompleksach z melaniną z adrenaliny, noradrenaliny i dopaminy [62]. Linie EPR różnych paramagnetycznych jonów w melaninie mierzone są w polach o różnej indukcji magnetycznej B [53,55,56,62,65].

#### Koncentracja centrów paramagnetycznych w biopolimerach różnego pochodzenia

Badania metodą EPR wykazały, że melaniny charakteryzuje wysoka zawartość o-semichinonowych wolnych rodników. Dla przykładu koncentracje wolnych rodników w wybranych melaninach ( $\sim 10^{16}$ – $10^{22}$  spin/g) podano w tabeli I. Koncentracje wolnych rodników w przykładowych kompleksach melanin z substancjami leczniczymi i jonami metali zamieszczono w tabeli II.

**Tabela I.** Koncentracja wolnych rodników w wybranych melaninach  
**Table I.** Concentration of free radicals in selected melanins

Melanina	Koncentracja wolnych rodników (spin/g)	Cytowania
	$2,8 \times 10^{19}$	[6]
	$2,1 \times 10^{19}$	[54]
DOPA-melanina	$1,9 \times 10^{19}$	[53]
	$1,6 \times 10^{19}$	[56]
	$1,0 \times 10^{19}$	[57]
DOPA-melanina (HCl)	$1,8 \times 10^{19}$	[6]
Melanina z siatkówki oka dawców w wieku poniżej 22 lat	$6,0 \times 10^{16}$	[57]
Melanina z siatkówki oka dawców w wieku powyżej 44 lat	$2,7 \times 10^{17}$	[57]
Melanina z <i>Sepia officinalis</i>	$3,2 \times 10^{19}$	[58]
Melanina z chrząszcza <i>Alphitobius diaperinus</i>	$4,9 \times 10^{17}$	[66]
Melanina z muchy czarnej <i>Hermetia illucens</i>	$2,6 \times 10^{18}$	[67]
Melanina z <i>Cladosporium cladosporioides</i>	$6,0 \times 10^{18}$	[68]
Melanina z bakterii <i>Bacillus weihenstephanensis</i>	$1,3$ – $3,3 \times 10^{22}$	[69]
Melanina z noradrenaliny	$6,4 \times 10^{19}$	[62]
Melanina z adrenaliny	$2,0 \times 10^{18}$	[62]
Melanina z dopaminy	$1,2 \times 10^{19}$	[62]



**Tabela II.** Koncentracja wolnych rodników w wybranych kompleksach melanin z substancjami leczniczymi i jonami metali  
**Table II.** Concentration of free radicals in selected melanin complexes with medicinal substances and metal ions

Rodzaj kompleksu melaninowego	Koncentracja wolnych rodników (spin/g)	Cytowania
DOPA-melanina-Zn <sup>2+</sup> (2 : 1)	11,1 x 10 <sup>19</sup>	[6]
DOPA-melanina-Zn <sup>2+</sup> (1 : 1)	12,5 x 10 <sup>19</sup>	[6]
DOPA-melanina-Zn <sup>2+</sup> (1 : 2)	16,2 x 10 <sup>19</sup>	[6]
DOPA-melanina-Zn <sup>2+</sup> (Zn 1 x 10 <sup>-3</sup> M)	3,9 x 10 <sup>19</sup>	[53]
Dopamina-melanina-Cu <sup>2+</sup> (2 : 1)	0,1 x 10 <sup>19</sup>	[62]
Dopamina-melanina-Cu <sup>2+</sup> (1 : 1)	2,6 x 10 <sup>19</sup>	[62]
Dopamina-melanina-Cu <sup>2+</sup> (1 : 2)	4,2 x 10 <sup>19</sup>	[62]
Adrenalina-melanina-Cu <sup>2+</sup> (2 : 1)	3,0 x 10 <sup>19</sup>	[62]
Adrenalina-melanina-Cu <sup>2+</sup> (1 : 1)	1,6 x 10 <sup>19</sup>	[62]
Adrenalina-melanina-Cu <sup>2+</sup> (1 : 2)	1,8 x 10 <sup>19</sup>	[62]
Noradrenalina-melanina-Cu <sup>2+</sup> (2 : 1)	0,2 x 10 <sup>19</sup>	[62]
Noradrenalina-melanina-Cu <sup>2+</sup> (1 : 1)	0,6 x 10 <sup>19</sup>	[62]
Noradrenalina-melanina-Cu <sup>2+</sup> (1 : 2)	2,9 x 10 <sup>19</sup>	[62]
DOPA-melanina-Co <sup>2+</sup>	9 x 10 <sup>18</sup>	[53]
DOPA-melanina-chlorochina(chlorochina 1 x 10 <sup>-3</sup> M)		
dla próbki w próżni	3,6 x 10 <sup>19</sup>	[53]
dla próbki w powietrzu	0,6 x 10 <sup>19</sup>	[53]
DOPA-melanina-gentamycyna (gentamycyna 1 x 10 <sup>-3</sup> M)	2,5 x 10 <sup>19</sup>	[54]
DOPA-melanina-kanamycyna (kanamycyna 1 x 10 <sup>-3</sup> M)	1,5 x 10 <sup>19</sup>	[55]
DOPA-melanina-netylmycyna (netylmycyna 1 x 10 <sup>-3</sup> M)	1,8 x 10 <sup>19</sup>	[56]
DOPA-melanina-moksyfoksacyna (moksyfoksacyna 1 x 10 <sup>-3</sup> M)	8,9 x 10 <sup>19</sup>	[70]
Melanina z <i>Cladosporium cladosporioides</i> -Cd <sup>2+</sup> (Cd <sup>2+</sup> 1 x 10 <sup>-4</sup> M)	1,6 x 10 <sup>19</sup>	[71]
Melanina z <i>Cladosporium cladosporioides</i> -Zn <sup>2+</sup> (Zn <sup>2+</sup> 1 x 10 <sup>-3</sup> M)	9,3 x 10 <sup>18</sup>	[68]
Melanina z <i>Cladosporium cladosporioides</i> -Cu <sup>2+</sup> (Cu <sup>2+</sup> 1 x 10 <sup>-3</sup> M)	2,2 x 10 <sup>18</sup>	[68]
Melanina z ludzkich komórek czerniaka (A-375) hodowanych w obecności kwasu walproinowego	5,1 x 10 <sup>21</sup>	[72]
Melanina z ludzkich komórek czerniaka (G-361) hodowanych w obecności kwasu walproinowego	2,0 x 10 <sup>20</sup>	[72]

Koncentracja wolnych rodników w melaninie zależy od rodzaju melaniny [6,53,54,56,57,58,62,66,67,68,69] oraz od ligandów, substancji leczniczych i jonów metali, związanych z melaniną [6,53,54,55,56,62,68,70,71,72,73].

## PODSUMOWANIE

Spektroskopia EPR w badaniach jakościowych syntetycznych i naturalnych melanin jest stosowana do wyznaczenia rodzajów centrów paramagnetycznych występujących w tych polimerach. Analizy jakościowe wykonuje się z wykorzystaniem współczynnika rozszczepiania spektroskopowego  $g$ , dekonwolucji widm EPR na linie składowe odpowiadające poszczególnym centróm paramagnetycznym, parametrów asymetrii

linii, wpływu mocy mikrofalowej na kształt widma EPR oraz wpływu temperatury pomiaru na intensywność integralne linii.

W badaniach ilościowych melanin z wykorzystaniem metody EPR porównywane są widma testowanych polimerów z widmami paramagnetycznych wzorców. Spektroskopowe badania ilościowe umożliwiają wyznaczenie wpływu substancji leczniczych i jonów metali na koncentrację centrów paramagnetycznych melanin.

## Finansowanie

Praca finansowana przez Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach (umowy nr PCN-1-166-K/O/F i PCN-1-014/K/O/F).





## Author's contribution

Manuscript preparation – E. Chodurek, B. Pilawa

Literature research – E. Chodurek, B. Pilawa

Final approval of the version to be published – E. Chodurek, B. Pilawa

## PIŚMIENICTWO

- Zdybel M., Pilawa B. Application of electron paramagnetic resonance spectroscopy in ophthalmology. W: Ophthalmology – current clinical and research updates. Red. P.G. Davey. InTech. Croatia 2014, s. 65–88, doi: 10.5772/57076.
- Zdybel M., Pilawa B., Buszman E., Wrześniok D. Zastosowanie spektroskopii EPR do badania melanin oraz kompleksów melanin z jonami metali i substancjami leczniczymi. Farm. Przegl. Nauk. 2009; 6(6): 42–46.
- Ramos P., Pilawa B. Zastosowanie spektroskopii EPR do optymalizacji procesów sterylizacji termicznej w farmacji i medycynie. Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach. Katowice 2018.
- Rok J., Otręba M., Buszman E., Wrześniok D. Melanina – z melanocyty do keranocyty, czyli jak przebiega transport melaniny w skórze. Ann. Acad. Med. Siles. 2012; 66(1): 60–66.
- Venger L. Melanins are biological diamonds. Int. J. Engin. Res. Appl. 2017; 7(6 Part 1): 40–48.
- Chodurek E., Pilawa B., Dzierżęga-Lęcznar A., Kurkiewicz S., Świętkowska L., Wilczok T. Effect of  $Cu^{2+}$  and  $Zn^{2+}$  ions on DOPA-melanin structure as analyzed by pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry and EPR spectroscopy. J. Anal. Appl. Pyrol. 2003; 70(1): 43–54.
- Dzierżęga-Lęcznar A., Stępień K., Chodurek E., Kurkiewicz S., Świętkowska L., Wilczok T. Pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry of peroxynitrite-treated melanins. J. Anal. Appl. Pyrol. 2003; 70(2): 457–467.
- Latocha M., Chodurek E., Kurkiewicz S., Świętkowska L., Wilczok T. Pyrolytic GC-MS analysis of melanin from black, gray and yellow strains of *Drosophila melanogaster*. J. Anal. Appl. Pyrol. 2000; 56(1): 89–98.
- Wakamatsu K., Ito S. Advanced chemical methods in melanin determination. Pigment Cell Res. 2002; 15(3): 174–183, doi: 10.1034/j.1600-0749.2002.02017.x.
- Morrish A.H. Fizyczne podstawy magnetyzmu. Państwowe Wydawnictwo Naukowe. Warszawa 1970.
- Eaton G.R., Eaton S.S., Salikhov K.M. (red.). Foundations of modern EPR. World Scientific. Singapore 1998.
- Rozancew E.G., Szolle W.D. Chemia organiczna wolnych rodników. Wyd. Naukowe PWN. Warszawa 1985.
- Bartosz G. Druga twarz tlenu. Wyd. Naukowe PWN. Warszawa 2009.
- Jóźwiak Z., Bartosz G. (red.). Biofizyka: wybrane zagadnienia wraz z ćwiczeniami. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa 2005.
- Jaroszyk F. (red.). Biofizyka. Wyd. Lekarskie PZWL. Warszawa 2001.
- Stankowski J., Piekara-Sady L., Kempniński W. EPR of a fullerene-molecule-derived paramagnetic center as mesoscopic conducting object. Appl. Magn. Reson. 2000; 19: 539–546, doi: 10.1007/BF03162398.
- Stankowski J., Kempniński W., Byszewski P., Trybuła Z. Free radicals in K and Rb admixed fullerene  $C_{60}$ . Acta Physica Pol. A 1993; 84(6): 1117–1123.
- Stankowski J., Piekara-Sady L., Kempniński W., Huminiecki O., Szczaniecki P. B. EPR of graphite and fullerenes. Fullerene Sci. Technol. 1997; 5(6): 1203–1217, doi: 10.1080/15363839708009606.
- Hoffmann S. K., Hilczner W., Kempniński W., Stankowski J. Electron spin echo and EPR studies of paramagnetic center in polycrystalline  $C_{60}$ . Solid State Commun. 1995; 93(3): 197–202.
- Szroeder P., Rozpłoch F., Marciniak W. Two-temperature EPR measurements of multi-walled carbon nanotubes. Solid State Phenomena 2003; 94: 275–278, doi: 10.4028/www.scientific.net/SSP.94.275
- Geru I.I. Molecular photoeffect in single- and multi-wall carbon nanotubes with physisorbed oxygen molecules. Phys. Lett. A 2017; 381(48): 4019–4022, doi: 10.1016/j.physleta.2017.10.041.
- Stankowski J., Wapłak S., Bednarski W. The anisotropy and temperature dependence of g-factor in graphite. Solid State Commun. 2000; 115(9): 489–491.
- Stankowski J., Hilczner W. Wstęp do spektroskopii rezonansów magnetycznych. Wyd. Naukowe PWN. Warszawa 2005.
- Stankowski J., Graja A. Wstęp do elektroniki kwantowej. Wyd. Komunikacji i Łączności. Warszawa 1972.
- Wertz J.E., Bolton J. R. Electron spin resonance: theory and practical applications. New York, London 1986.
- Weil J.A., Bolton J.R. Electron paramagnetic resonance: elementary theory and practical applications. 2nd ed. John Wiley & Sons. New York 2007.
- Stankowski J. (red.). Radiospektroskopia ciała stałego. Państwowe Wydawnictwo Naukowe. Warszawa 1975.
- Zoleo A., Vecchia F., Brustolon M. Characterization of ancient and modern papers by CW-EPR spectroscopy. Appl. Magn. Reson. 2009; 35(2): 213–220, doi: 10.1007/s00723-008-0155-z.
- Pilawa B., Ramos P. Spektroskopia EPR: ćwiczenia dla studentów analityki medycznej i medycyny. Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach. Katowice 2017.
- Kęcki Z. Podstawy spektroskopii molekularnej. Wyd. Naukowe PWN. Warszawa 1999.
- Kirmse R., Stach J. Spektroskopia EPR: zastosowania w chemii. Uniwersytet Jagielloński. Kraków 1994.
- Sarna T. Badanie struktury i właściwości centrów aktywnych melanin. Państwowe Wydawnictwo Naukowe. Warszawa 1987.
- Hryniewicz A.Z., Rokita E. (red.). Fizyczne metody badań w biologii, medycynie i ochronie środowiska. Wyd. Naukowe PWN. Warszawa 2013.
- Zawada K. Zastosowanie spektroskopii EPR w farmacji i medycynie. Farm. Pol. 2009; 65(3): 224–228.
- Sarna T. Badanie struktury i właściwości centrów aktywnych melanin. Zagad. Biofiz. Współcz. 1981; 6: 201–219.
- Sealy R.C., Hyde J.S., Felix C.C., Menon I.A., Prota G. Eumelanins and pheomelanins: characterization by electron spin resonance spectroscopy. Science 1982; 217(4559): 545–547, doi: 10.1126/science.6283638.
- Paseniewicz-Gierula M. Badanie struktury i dynamiki paramagnetycznych układów molekularnych o spinie  $s = 1/2$  metodą elektronowego rezonansu paramagnetycznego (ERP). Rozprawa habilitacyjna. Uniwersytet Jagielloński. Kraków 1990.
- Buszman E., Pilawa B., Zdybel M., Wrześniok D., Grzegorzczak A., Wilczok T. Paramagnetic centers in DOPA-melanin-dihydrostreptomycin complexes. Acta Physica Pol. A 2005; 108(2): 353–356.
- Charlier N., Desoil M., Gosuain Y., Gillis P., Gallez B. Electron paramagnetic resonance imaging of melanin in honey bee. Cell Biochem. Biophys. 2020; 78(2): 123–126, doi: 10.1007/s12013-020-00903-8.
- Pukalski J., Marcol N., Wolan N., Plonka P.M., Ryszka P., Kowalski T., Latowski D. Detection of a pheomelanin-like pigment by EPR spectroscopy in the mycelium of *Plenodomus biglobosus*. Acta Bioch. Pol. 2020; 67(3): 295–301, doi: 10.18388/abp.2020.5405.
- Mostert A.B., Rienecker S.B., Noble C., Hanson G.R., Meredith P. The photoreactive free radical in eumelanin. Sci. Adv. 2018; 4(3): eaaq1293, doi: 10.1126/sciadv.aaq1293.
- Al Khatib M., Harir M., Costa J., Baratto M.C., Schiavo I., Trabalzini L. i wsp. Spectroscopic characterization of natural melanin from a *Streptomyces cyaneofuscatus* strain and comparison with melanin enzymatically synthesized by tyrosinase and laccase. Molecules 2018; 23(8): 1916, doi: 10.3390/molecules23081916.
- Najder-Kozdrowska L., Pilawa B., Buszman E., Więckowski A.B., Świętkowska L., Wrześniok D., Wojtowitz W. Triplet states in DOPA-melanin and in its complexes with kanamycin and copper Cu(II) ions. Acta Physica Pol. A 2010; 118(4): 613–618.
- Zdybel M., Pilawa B., Buszman E., Wrześniok D., Krzymiński R., Kruczyński Z. EPR studies of DOPA-melanin complexes with netilmicin and Cu(II) at temperatures in the range of 105–300 K. Appl. Magn. Reson. 2012; 43(3): 341–351.
- Kozdrowska L. Właściwości centrów paramagnetycznych kompleksów DOPA-melaniny z kanamycyną i jonami miedzi(II). Praca doktorska. Uniwersytet Zielonogórski. Zielona Góra 2006.
- Zdybel M. Złożony układ centrów paramagnetycznych kompleksów DOPA-melaniny z netilmicyną, jonami cynku(II) i miedzi(II). Rozprawa doktorska. Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach. Katowice 2008.
- Pilawa B., Latocha M., Krzymiński R., Kruczyński Z., Buszman E., Wilczok T. Effect of temperature on melanin EPR spectra. Phys. Med. 2004; 20(Suppl 1): 96–98.
- Zdybel M., Pilawa B., Buszman E., Wrześniok D., Krzymiński R., Kruczyński Z. Continuous microwave saturation of EPR spectra of melanin complexes at different temperatures. Pol. J. Med. Phys. Eng. 2012; 17(2): 85–94, doi: 10.2478/v10013-011-0009-0.
- Więckowski A. B. Zastosowanie elektronowego rezonansu paramagnetycznego w badaniach ultramariny. Wiad. Chem. 1972; 26(12/306): 803–822.



50. Więckowski A.B., Wojtowicz W., Śliwa-Nieściór J. Temperature dependence of the EPR linewidth of ultramarine blue. *Magn. Res. Chem.* 1999; 37(13 Special Issue): S150–S153.
51. Kowalak S., Jankowska A., Zeidler S., Więckowski A.B. Sulfur radicals embedded in various cages of ultramarine analogs prepared from zeolites. *J. Solid State Chem.* 2007; 180(3): 1119–1124, doi: 10.1016/j.jssc.2007.01.004.
52. Najder-Kozdrowska L., Więckowski A.B. Linear anamorphosis of the electron paramagnetic resonance (EPR) lineshape of ultramarine blue. W: *Ethics and humanism in European science, environment and culture*. T. 16. Red. M. Jaskuła, B. Buszewski, A. Sękowski, Z. Zagórski Z. Societas Humboldtiana Polonorum. Kraków – Lublin – Toruń 2011, s. 321–325.
53. Pilawa B., Latocha M., Buszman E., Wilczok T. Effect of oxygen on spin-spin and spin-lattice relaxation in DOPA-melanin. Complexes with chloroquine and metal ions. *Appl. Magn. Reson.* 2003; 25(1): 105–111.
54. Pilawa B., Buszman E., Wrześniok D., Latocha M., Wilczok T. Application of EPR spectroscopy to examination of gentamicin and kanamycin binding to DOPA-melanin. *Appl. Magn. Reson.* 2002; 23: 181–192.
55. Najder-Kozdrowska L., Pilawa B., Buszman E., Wrześniok D., Więckowski A.B. Electron paramagnetic resonance (EPR) study of DOPA-melanin complexes with kanamycin and copper(II) ions. *Spectroscopy* 2011; 25(3/4): 197–205.
56. Buszman E., Pilawa B., Zdybel M., Wrześniok D., Grzegorzczak A., Wilczok T. EPR examination of  $Zn^{2+}$  and  $Cu^{2+}$  effect on free radicals in DOPA-melanin-netilmicin complexes. *Chem. Phys. Lett.* 2005; 403(1–3): 22–28.
57. Bilińska B., Pilawa B., Zawada Z., Wylegała E., Wilczok T., Dontsov A.E. i wsp. Electron spin resonance investigations of human retinal pigment epithelium melanosomes from young and old donors. *Spectrochim. Acta A – Mol. Biomol. Spectroscopy* 2002; 58(10): 2257–2264.
58. Chodurek E., Czyżyk D., Pilawa B., Wilczyński S. EPR studies of paramagnetic centers in melanin from *Sepia officinalis*. *Eng. Biomater.* 2009; 12(86): 28–32.
59. Buszman E., Pilawa B., Zdybel M., Wilczyński S., Gondzik A., Witoszyńska T., Wilczok T. EPR examination of  $Zn^{2+}$  and  $Cu^{2+}$  binding by pigmented soil fungi *Cladosporium cladosporioides*. *Sci. Total Environ.* 2006; 363(1–3): 195–205, doi: 10.1016/j.scitotenv.2005.05.028.
60. Bin L., Wei L., Xiaohong C., Mei J., Mingsheng D. In vitro antibiophilic activity of the melanin from *Auricularia auricula*, an edible jelly mushroom. *Ann. Microbiol.* 2012; 62: 1523–1530.
61. Khajo A., Bryan R.A., Friedman M., Burger R.M., Levitsky Y., Casadevall A., Magliozzo R.S., Dadachova E. Protection of melanized *Cryptococcus neoformans* from lethal dose gamma irradiation involves changes in melanin's chemical structure and paramagnetism. *PLoS One* 2011; 6(9): e25092, doi: 10.1371/journal.pone.0025092.
62. Pilawa B., Chodurek E., Wilczok T. Types of paramagnetic centres in  $Cu^{2+}$  complexes with model neuromelanins. *Appl. Magn. Reson.* 2003; 24: 417–422.
63. Paulin J.V., Batagin-Neto A., Graeff C.F.O. Identification of common resonant lines in the EPR spectra of melanins. *J. Phys. Chem. B* 2019; 123(6): 1248–1255, doi: 10.1021/acs.jpcc.8b09694.
64. Pilawa B., Zdybel M., Latocha M., Krzymiński R., Kruczyński Z. Analysis of lineshape of black *Drosophila melanogaster* EPR spectra. *Curr. Top. Biophys.* 2008; 31: 5–9.
65. Zdybel M., Chodurek E., Pilawa B. EPR studies of DOPA-melanin complexes with Fe(III). *Appl. Magn. Reson.* 2011; 40(1): 113–123.
66. Ushakova N.A., Dontsov A.E., Sakina N.L., Karagodin V.P., Bastrakov A.I. Preparation and characterization of *Alphitobius diaperinus* melanin. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2018; 54(4): 425–431, doi: 10.1134/S0003683818040142.
67. Ushakova N., Dontsov A., Sakina N., Bastrakov A., Ostrovsky M. Antioxidative properties of melanins and ommochromes from black soldier fly *Hermetia illucens*. *Biomolecules* 2019; 9(9): 408, doi: 10.3390/biom9090408.
68. Buszman E., Pilawa B., Witoszyńska T., Latocha M., Wilczok T. Effect of  $Zn^{2+}$  and  $Cu^{2+}$  on free radical properties of melanin from *Cladosporium cladosporioides*. *Appl. Magn. Reson.* 2003; 24: 401–407.
69. Zdybel M., Pilawa B., Drewnowska J.M., Świącicka I. Comparative EPR studies of free radicals in melanin synthesized by *Bacillus weihenstephanensis* soil strains. *Chem. Phys. Lett.* 2017; 679: 185–192, doi: 10.1016/j.cplett.2017.05.013.
70. Beberok A., Zdybel M., Pilawa B., Buszman E., Wrześniok D. EPR characteristics of free radicals in DOPA-melanin-moxifloxacin complexes at ambient level of UVA radiation. *Chem. Phys. Lett.* 2014; 592(1): 41–46, doi: 10.1016/j.cplett.2013.12.011.
71. Matuszczyk M., Buszman E., Pilawa B., Witoszyńska T., Wilczok T.  $Cd^{2+}$  effect on free radicals in *Cladosporium cladosporioides*-melanin tested by EPR spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.* 2004; 394(4–6): 366–371.
72. Chodurek E., Zdybel M., Pilawa B. Application of EPR spectroscopy to examination of free radicals in melanins from A-375 and G-361 human melanoma malignant cells. *J. Appl. Biomed.* 2013; 11(3): 173–185.
73. Buszman E., Latocha M., Namysłowski W., Pilawa B., Wilczok T. Wpływ jonów  $Cd^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  i  $Cu^{2+}$  na proliferację i stopień melanizacji komórek melanomy mysiej. *Ann. Acad. Med. Siles.* 1998; 34–35: 11–28.