

BADANIA CENTRÓW PARAMAGNETYCZNYCH MELANINY Z SEPIA OFFICINALIS METODĄ EPR

EWA CHODUREK¹, DARIA CZYŻYK², BARBARA PILAWA²,
SŁAWOMIR WILCZYŃSKI²

¹ KATEDRA I ZAKŁAD BIOFARMACJI, WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY
Z ODDZIAŁEM MEDYCYNY LABORATORYJNEJ W SOSNOWCU,
ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY W KATOWICACH,
UL. NARCYZÓW 1, 41-200 SOSNOWIEC

² KATEDRA I ZAKŁAD BIOFIZYKI, WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY
Z ODDZIAŁEM MEDYCYNY LABORATORYJNEJ W SOSNOWCU,
ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY W KATOWICACH,
UL. JEDNOŚCI 8, 41-200 SOSNOWIEC

Streszczenie

Przeprowadzono badania właściwości paramagnetycznych biopolimeru melaninowego otrzymanego z *Sepia officinalis* z zastosowaniem spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego na pasmo X (9,3 GHz). Biopolimer ten jest wykorzystywany w preparatach kosmetycznych. Analizowano kształt i parametry widm EPR centrów paramagnetycznych melaniny zarejestrowanych jako pierwsza pochodna absorpcji. Otrzymano wartości współczynnika rozszczepienia spektroskopowego g , amplitudy, intensywności integralnej i szerokości linii EPR. Wyznaczono koncentrację centrów paramagnetycznych w badanym biopolimerze melaninowym. Stwierdzono podobne widma EPR i właściwości centrów paramagnetycznych melaniny z *Sepia officinalis* oraz eumelaniny.

Zależne od mocy mikrofalowej asymetryczne widma EPR wskazują na złożony charakter układu centrów paramagnetycznych w testowanym biopolimerze. Wykazano, że w melaninie z *Sepia officinalis* występują głównie *o*-semichinonowe wolne rodniki. Wolne procesy relaksacji spin-sieć zachodzą w analizowanej melaninie.

Słowa kluczowe: biopolimer melaninowy, *Sepia officinalis*, centra paramagnetyczne, wolne rodniki, EPR

[Inżynieria Biomateriałów, 86, (2009), 28-32]

Wprowadzenie

Melaniny są biopolimerami wykazującymi właściwości paramagnetyczne [1-12]. *o*-Semichinonowe wolne rodniki z niesparowanymi elektronami zlokalizowanymi na atomie tlenu głównie odpowiadają za paramagnetyzm melanin [1-12]. Technika przydatną do badania tych naturalnych polimerów jest elektronowy rezonans paramagnetyczny. Porównanie widm EPR kompleksów melanin z jonami metali wykazało, że dia- i paramagnetyczne jony metali odpowiednio zwiększają lub zmniejszają koncentrację wolnych rodników w melaninie [1,3-4,8,11-13,25]. Badania EPR wskazują na istotną rolę melaninowych centrów paramagnetycznych w wiązaniu substancji leczniczych [13-16] oraz jonów metali [1,3-4,7-8,11-13,15] do tych polimerów. Wolne rodniki melanin mogą powodować efekty toksyczne w tkankach [18-19].

EPR STUDIES OF PARAMAGNETIC CENTERS IN MELANIN FROM SEPIA OFFICINALIS

EWA CHODUREK¹, DARIA CZYŻYK², BARBARA PILAWA²,
SŁAWOMIR WILCZYŃSKI²

¹ DEPARTMENT OF BIOPHARMACY,
SCHOOL OF PHARMACY AND LABORATORY MEDICINE,
MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA IN KATOWICE,
1 NARCYZÓW STR., 41-200 SOSNOWIEC, POLAND

² DEPARTMENT OF BIOPHYSICS,
SCHOOL OF PHARMACY AND LABORATORY MEDICINE,
MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA IN KATOWICE,
8 JEDNOŚCI STR., 41-200 SOSNOWIEC, POLAND

Abstract

Paramagnetic properties of melanin biopolymer from *Sepia officinalis* were studied by the use of electron paramagnetic resonance spectroscopy (EPR) at X-band (9.3 GHz). This biopolymer is applied in cosmetics. Lineshape and parameters of first-derivative EPR spectra of melanin paramagnetic centers were analysed. g -Factor, amplitude, integral intensity, and linewidth of EPR spectra were obtained. Concentration of paramagnetic centers in melanin biopolymer was determined. EPR spectra of melanin from *Sepia officinalis* and properties of its paramagnetic centers are similar to those of eumelanin.

Asymmetrical EPR spectra dependent on microwave power indicate that complex paramagnetic centers system is characteristic for the tested biopolymer. It was proved that mainly *o*-semiquinone free radicals exist in melanin from *Sepia officinalis*. Slow spin-lattice relaxation processes exist in the analysed melanin.

Keywords: melanin biopolymer, *Sepia officinalis*, paramagnetic centers, free radicals, EPR

[Engineering of Biomaterials, 86 (2009), 28-32]

Introduction

Melanins are paramagnetic biopolymers [1-12]. *o*-Semiquinone free radicals with unpaired electron localized on oxygen atom are mainly responsible for paramagnetism of melanins [1-12]. Electron paramagnetic resonance spectroscopy is a useful technique to examine of these natural polymers. Comparison of EPR spectra of melanin complexes with metal ions indicates that dia- and paramagnetic metal ions increase and decrease free radical concentration in melanin, respectively [1,3-4,8,11-13,25]. EPR studies indicate that melanin's paramagnetic centers play an important role in binding of drugs [13-16] and metal ions to this polymer [1,3-4,7-8,11-13,15]. Free radicals may be responsible for toxic effects in tissues [18-19].

EPR studies of melanin from *Drosophila melanogaster* (the strains: black, grey, and yellow), *Cladosporium cladosporioides* and *Cladosporium herbarum* were performed by us earlier [7,9,26]. In these works we concentrated on the role of melanin's free radicals in environmental protection, detoxification processes and type of melanin existing in the mentioned above biological objects.

Badania EPR melanin z *Drosophila melanogaster* (szczep: czarny, szary i żółty), *Cladosporium cladosporioides* i *Cladosporium herbarum* przeprowadziliśmy wcześniej [7,9,26]. W powyższych pracach koncentrowaliśmy się głównie na roli wolnych rodników melaniny w ochronie środowiska, procesach detoksyfikacji i rodzaju melaniny występującej we wspomnianych powyżej obiektach biologicznych.

W pracy [17] opisano centra paramagnetyczne występujące w całej gamma napromieniowanej *Sepia officinalis*. Widma EPR wykorzystano do identyfikacji napromieniowanej mątwy [17]. Melanina występuje także w *Sepia officinalis*, jednakże nie przeprowadzono badań spektroskopowych jej centrów paramagnetycznych. Celem naszej pracy jest wyznaczenie koncentracji i właściwości centrów paramagnetycznych biopolimeru melaniny z *Sepia officinalis*. Melanina z *Sepia officinalis* jest stosowana w kosmetykach, substancjach leczniczych w kosmetologii i medycynie estetycznej [20-21]. W niniejszej pracy spektroskopię elektronowego rezonansu paramagnetycznego zaproponowano jako metodę użyteczną w badaniach melanin w kosmetykach. Metodą EPR można badać powstawanie wolnych rodników w próbkach kosmetyków zawierających melaninę. Badania EPR melaniny z *Sepia officinalis* są ważne, ze względu na potencjalne negatywne efekty w tkankach spowodowane przez oddziaływania tkanki z wolnymi rodnikami melaniny występującej w kosmetykach.

Material i metody

Material

Biopolimer melaninowy izolowany z *Sepia officinalis* badano z zastosowaniem spektroskopii EPR. Próbkę otrzymano z Firmy Sigma. Próbkę melaninową umieszczono w cienkościennych rurkach szklanych i rejestrowano widma EPR.

Metody

Metodę elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) o częstotliwości promieniowania mikrofalowego z pasma X wynoszącej 9,3 GHz zastosowano jako technikę eksperymentalną. Widma EPR mierzono za pomocą spektrometru RADIOPAN (Poznań) w szerokim zakresie mocy mikrofalowej wynoszącym 0,7-70 mW. Widma EPR w postaci pierwszej pochodnej rejestrowano w temperaturze pokojowej. Analizowano następujące parametry kształtu linii EPR: A_1/A_2 , A_1-A_2 , B_1/B_2 i B_1-B_2 . Parametry te zdefiniowano na RYS. 1. Dla widm eksperymentalnych wyznaczono współczynnik rozszczepienia spektroskopowego g , amplitudę (A), intensywność integralną (I) oraz szerokość linii (ΔB_{pp}). Zbadano wpływ mocy mikrofalowej na parametry asymetrii linii oraz na amplitudę i szerokość linii EPR.

Współczynnik rozszczepienia spektroskopowego g obliczono z warunku rezonansu jako $h\nu/\mu_B B_r$, gdzie: h – stała Plancka, ν – częstotliwość mikrofalowa, μ_B – magneton Bohra, B_r - rezonansowa indukcja magnetyczna [22-23]. Koncentrację centrów paramagnetycznych w testowanym biopolimerze wyznaczono jako wielkość proporcjonalną do intensywności integralnej. Jako wzorce wykorzystano ultramarynę i kryształ rubinu.

Wyniki i dyskusja

W przypadku badanego biopolimeru melaninowego z *Sepia officinalis* rejestrowano silne widma EPR w całym zakresie mocy mikrofalowej (0,7-70 mW). Widma EPR testowanej melaniny stanowią pojedyncze asymetryczne linie (RYS. 1). Kształt tych widm EPR jest podobny do kształtu linii EPR modelowej eumelaniny – DOPA-melaniny.

Paramagnetic centers in whole gamma irradiated *Sepia officinalis* are described in work [17]. EPR spectra are used for identification of irradiated cuttlefish [17]. Melanin also exists in *Sepia officinalis*, but its paramagnetic centers were not analysed spectroscopically. The aim of our work is to determine concentration and properties of paramagnetic centers in melanin biopolymer isolated from *Sepia officinalis*. Melanin from *Sepia officinalis* is used in cosmetics and drugs in cosmetology and esthetical medicine [20-21]. In this work electron paramagnetic resonance spectroscopy is proposed as the useful method of study melanin in cosmetics. Free radicals formation in cosmetic samples containing melanin may be examined by EPR method. The EPR studies of melanin from *Sepia officinalis* are important, because of potential negative effects caused by their free radicals in tissues during interactions with cosmetics.

Material and methods

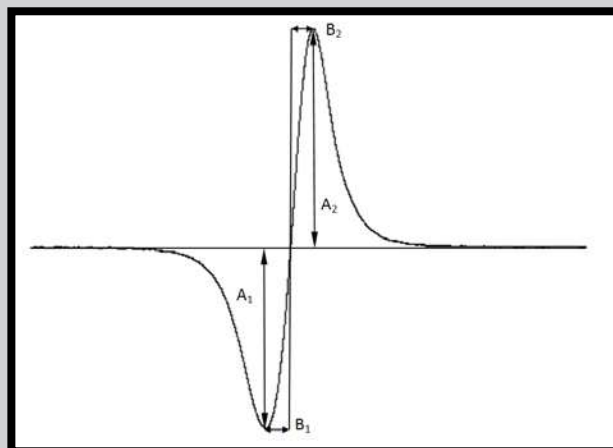
Material

Melanin biopolymer isolated from *Sepia officinalis* was studied by EPR spectroscopy. The samples were obtained from Sigma Firm. Melanin samples were put into thin walled glass tubes and EPR spectra were measured.

Methods

Electron paramagnetic resonance spectroscopy (EPR) with microwave frequency 9.3 GHz (X-band) was applied as the experimental technique. EPR spectra were measured with microwave powers of 0.7-70 mW by RADIOPAN (Poznań) spectrometer. First derivative EPR spectra were recorded at room temperature. The following shapes parameters were analysed: A_1/A_2 , A_1-A_2 , B_1/B_2 and B_1-B_2 . The parameters are defined and shown in FIG. 1. For the experimental spectra g -factor, amplitude (A), integral intensity (I), and linewidth (ΔB_{pp}) were evaluated. Influence of microwave power on asymmetry parameters, and amplitude and linewidth was examined.

g -Factor was calculated from resonance condition as $h\nu/\mu_B B_r$, where: h – Planck constant, ν – microwave frequency, μ_B - Bohr magneton, B_r - resonance magnetic field [22-23]. Concentration of paramagnetic centers in the studied biopolymer was determined as the value proportional to integral intensity (I) of its EPR spectra. Ultramarine and a ruby crystal were used as the references.



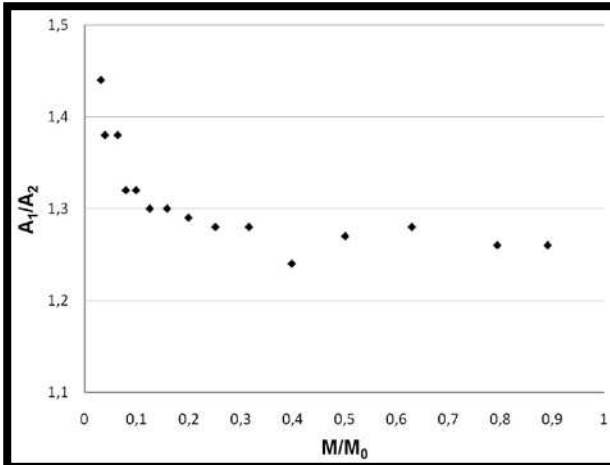
RYS. 1. Widmo EPR biopolimeru melaninowego z *Sepia officinalis* z zaznaczonymi analizowanymi parametrami kształtu linii.

FIG. 1. EPR spectrum of melanin biopolymer from *Sepia officinalis* with marked the analysed parameters of its lineshape.

Widma EPR DOPA-melaniny są również pojedynczymi liniami [1-5,12-16]. Struktura nadsubtelna charakterystyczna dla feoemelanin [2] nie była obserwowana w widmach EPR melaniny z *Sepia officinalis*. Można więc stwierdzić, że w *Sepia officinalis* występuje eumelanina.

Melaninę z *Sepia officinalis* charakteryzuje stabilny paramagnetyzm. Linie EPR tego biopolimeru nie zmieniają się z czasem przechowywania próbki. Koncentracja centrów paramagnetycznych w badanej melaninie wynosi $3,2 \times 10^{19}$ spin/g, a współczynnik rozszczepienia spektroskopowego g jest równy 2,0045. Wielkości te są podobne jak dla DOPA-melaniny [1-5,12-16].

W tej pracy wykazano złożony charakter układu centrów paramagnetycznych melaniny z *Sepia officinalis*. Złożone widma EPR wykazują zmiany asymetrii ze wzrostem mocy mikrofalowej [23]. Wpływ mocy mikrofalowej na parametry asymetrii linii: A_1/A_2 , A_1-A_2 , B_1/B_2 i B_1-B_2 zdefiniowane na RYS. 1 pokazano odpowiednio na RYS. 2-5.



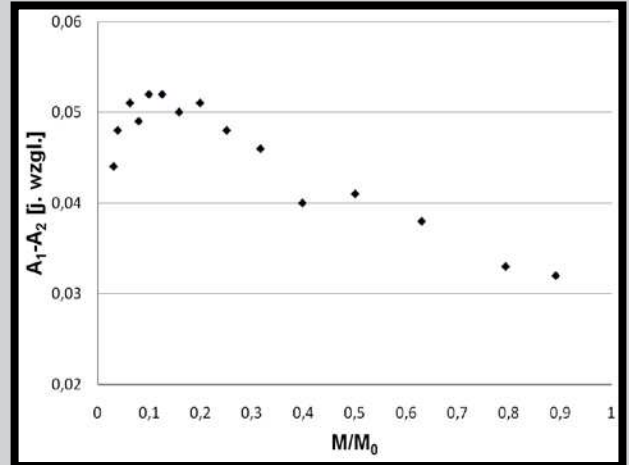
RYS. 2. Wpływ mocy mikrofalowej (M/M_0) na parametr A_1/A_2 widma EPR melaniny z *Sepia officinalis*. M – moc mikrofalowa stosowana podczas pomiaru, M_0 – całkowita moc mikrofalowa wytwarzana przez klystron (70 mW).

FIG. 2. Influence of microwave power (M/M_0) on the parameter A_1/A_2 of the melanin's EPR spectra. M – microwave power used during the measurement, M_0 – total microwave power produced by klystron (70 mW).

Results and discussions

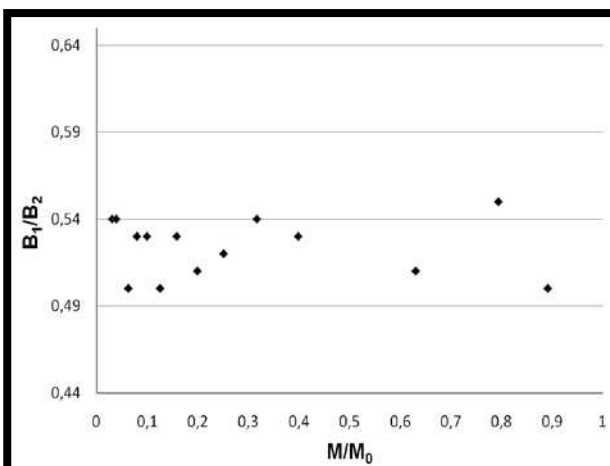
Strong EPR spectra in the whole range of microwave power (0.7-70 mW) were measured for the studied melanin biopolymer from *Sepia officinalis*. The EPR spectra are single asymmetric curves (FIG. 1). Lineshape of these EPR spectra is similar to those of model eumelanin – DOPA-melanin. EPR spectra of DOPA-melanin are single lines [1-5,12-16]. Hyperfine structure characteristic for pheomelanins [2] was not observed in the spectra of melanin from *Sepia officinalis*. As one can see, eumelanin exists in *Sepia officinalis*.

Stable paramagnetism characterizes melanin from *Sepia officinalis*. EPR lines do not change with storage time of the sample. Paramagnetic centers concentration in this melanin is 3.2×10^{19} spin/g and g -value is 2.0045. The mentioned above values correspond to those for DOPA-melanin [1-5,12-16].

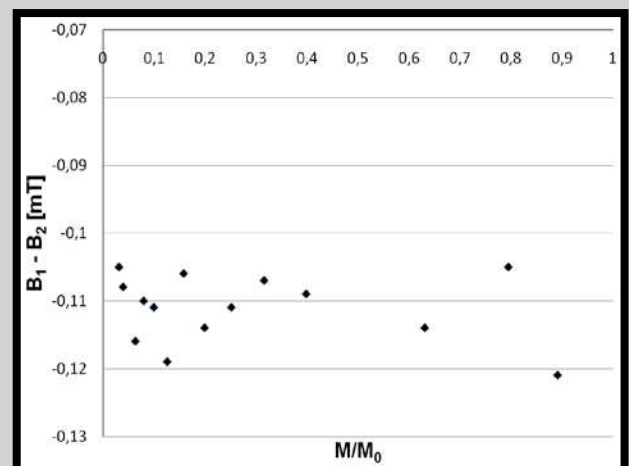


RYS. 3. Wpływ mocy mikrofalowej (M/M_0) na parametr A_1-A_2 widma EPR melaniny z *Sepia officinalis*. M – moc mikrofalowa stosowana podczas pomiaru, M_0 – całkowita moc mikrofalowa wytwarzana przez klystron (70 mW).

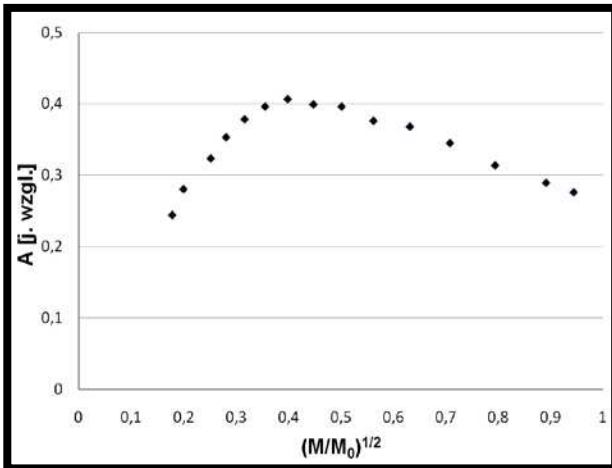
FIG. 3. Influence of microwave power (M/M_0) on the parameter A_1-A_2 of the melanin's EPR spectra. M – microwave power used during the measurement, M_0 – total microwave power produced by klystron (70 mW).



RYS. 4. Wpływ mocy mikrofalowej (M/M_0) na parametr B_1/B_2 widma EPR melaniny z *Sepia officinalis*. FIG. 4. Influence of microwave power (M/M_0) on the parameter B_1/B_2 of the melanin's EPR spectra.



RYS. 5. Wpływ mocy mikrofalowej (M/M_0) na parametr B_1-B_2 widma EPR melaniny z *Sepia officinalis*. FIG. 5. Influence of microwave power (M/M_0) on the parameter B_1-B_2 of the melanin's EPR spectra.



RYS. 6. Wpływ mocy mikrofalowej (M/M_0) na amplitudę A widma EPR melaniny z *Sepia officinalis*.

FIG. 6. Influence of microwave power (M/M_0) on amplitude A of the melanin's EPR spectra.

Parametry te znacznie zmieniają się z mocą mikrofalową. Charakter tych zmian pokazano na RYS. 2-5. Podobne zmiany nie wystąpiłyby w próbkach posiadających tylko jeden rodzaj centrów paramagnetycznych [23]. Prawdopodobnie wolne rodniki ze spinem $S = 1/2$ i dodatkowo birodniki ze spinem $S = 1$ występują w melaninie z *Sepia officinalis*. Wolne rodniki i birodniki znaleziono wcześniej w DOPA-melaninie [24-25] i w melaninie z czarnego szczepu *Drosophila melanogaster* [10,26].

Zmiany amplitudy i szerokości linii analizowanych widm EPR wraz ze wzrostem mocy mikrofalowej pokazano na RYS. 6 i 7. Amplituda linii EPR rośnie wraz ze wzrostem mocy mikrofalowej, a po osiągnięciu wartości maksymalnej maleje z dalszym wzrostem mocy mikrofalowej (RYS. 6). Linie EPR nasycają się dla niskich mocy mikrofalowych (RYS. 6), a więc wolne procesy relaksacji spin-sieć występują w badanej melaninie. Wolne procesy relaksacji spin-sieć zachodzą również w DOPA-melaninie [12-15,24-25], melaninie z *Drosophila melanogaster* [26] i melaninie z *Cladosporium cladosporioides* [8-9]. Obserwowano poszerzenie linii EPR ze wzrostem mocy mikrofalowej (RYS. 7). Korelacje przedstawione na RYS. 6 i 7 są charakterystyczne dla linii EPR poszerzonych jednorodnie [22-23]. W próbkach o liniach EPR poszerzonych jednorodnie nie występują izolowane pakiety spinowe [22-23]. Jednorodne poszerzenie linii EPR stwierdzono wcześniej dla DOPA-melaniny [12-15,24-25], melaniny z *Drosophila melanogaster* [26] i z *Cladosporium cladosporioides* [8-9].

Wnioski

Badania biopolimeru melaninowego z *Sepia officinalis* metodą EPR wykazały, że:

- 1) Silny i stabilny paramagnetyzm charakteryzuje ten polimer podobnie jak eumelaninę.
- 2) Złożony układ centrów paramagnetycznych występuję w badanym biopolimerze melaninowym wykazującym asymetryczne widma EPR o kształcie zależnym od mocy mikrofalowej.
- 3) o-Semichinonowe wolne rodniki o współczynniku rozszczepienia spektroskopowego g wynoszącym 2,0045 są głównie odpowiedzialne za widma EPR badanego polimeru.

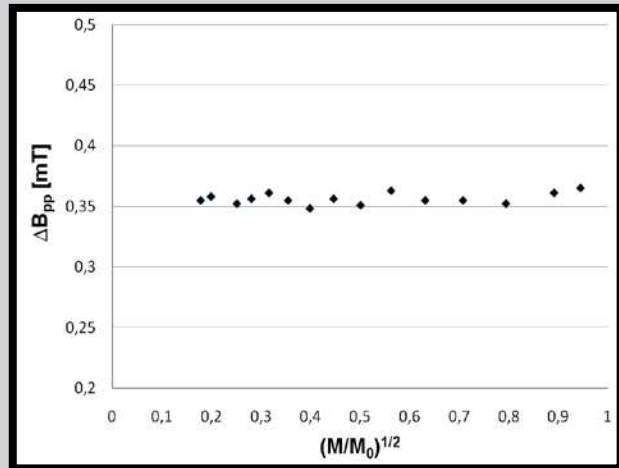


FIG. 7. Wpływ mocy mikrofalowej (M/M_0) na szerokość linii ΔB_{pp} widma EPR melaniny z *Sepia officinalis*.

FIG. 7. Influence of microwave power (M/M_0) on linewidth ΔB_{pp} of the melanin's EPR spectra.

In this study complex character of paramagnetic centers in melanin from *Sepia officinalis* is shown. Complex EPR spectra reveal changes of their asymmetry with increasing of microwave power [23]. Influence of microwave power on asymmetry parameters: A_1/A_2 , A_1-A_2 , B_1/B_2 and B_1-B_2 defined in FIG. 1 is presented in FIG. 2-5, respectively. All these parameters strongly change with microwave power. Character of these changes is presented in FIG. 2-5. Such changes are not obtained for samples with only one group of paramagnetic centers [23]. Probably free radicals with spin $S = 1/2$ and additionally biradicals with spins $S = 1$ exist in melanin from *Sepia officinalis*. Free radicals and biradicals were found in DOPA-melanin [24-25] and in melanin from black strain of *Drosophila melanogaster* [10,26].

Changes of amplitude and linewidth of the analysed EPR spectra with increasing of microwave power are shown in FIG. 6 and 7, respectively. The amplitude increases with increasing of microwave power, and after reaching the maximum decreases for higher microwave powers (FIG. 6). These EPR lines saturate at low microwave powers, so it can be concluded that slow spin-lattice relaxation processes characterize the studied melanin. Similar slow spin-lattice relaxation processes exist in DOPA-melanin [12-15,24-25], melanin from *Drosophila melanogaster* [26] and melanin from *Cladosporium cladosporioides* [8-9]. Broadening of EPR lines with increasing of microwave power we observed (FIG. 7). Correlations presented in FIG. 6 and 7 are characteristic for homogeneously broadened EPR lines [22-23]. Isolated spin packet do not exist in samples with homogeneously broadened EPR lines [22-23]. Homogeneous broadening of EPR lines was obtained for DOPA-melanin [12-15,24-25], melanin from *Drosophila melanogaster* [26] and *Cladosporium cladosporioides* [8-9].

Conclusions

EPR studies of melanin biopolymer from *Sepia officinalis* indicate that:

- 1) Strong and stable paramagnetism similar to those of eumelanin characterizes this polymer.
- 2) Complex paramagnetic centers system with asymmetrical EPR spectra, which change with microwave power, exists in the studied melanin biopolymer.
- 3) o-Semiquinone free radicals with g -factor of 2.0045 are mainly responsible for EPR spectra of the examined polymer.

- 4) Widma EPR badanej melaniny są poszerzone jedno-rodnie.
- 5) Ciągłe nasycenie mikrofalowe linii EPR wskazuje na wolne procesy relaksacji spin-sieć zachodzące w analizowanej próbce melaninowej.
- 6) Wolne rodniki melaniny izolowanej z *Sepia officinalis* stosowanej w kosmetykach mogą prawdopodobnie powodować efekty toksyczne w ludzkich tkankach.
- 7) Przypuszczalnie oddziaływania wolnych rodników melaniny z molekułami tlenu O_2 niszczą strukturę kosmetyków podczas ich przechowywania.

- 4) EPR spectra of the analysed melanin are homogeneously broadened.
- 5) Continuous microwave saturation of EPR lines points out that slow spin-lattice relaxation processes characterize the melanin sample.
- 6) It is expected that free radicals of cosmetics containing melanin isolated from *Sepia officinalis* indicate toxic effects in human tissues.
- 7) It is possible that melanin's free radicals interactions with oxygen molecules O_2 destroy cosmetics during storage.

Piśmiennictwo

- [1] Sarna T., Badanie struktury i właściwości centrów aktywnych melanin, *Zagadnienia Biofizyki Współczesnej* 1981, 6, 201-219.
- [2] 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, 545-547.
- [3] Pasenkiewicz-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.
- [4] Korytowski W., Jonowymienne właściwości melanin – oddziaływanie z jonami metali, *Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Jagiellońskiego* 1982, 9, 279-283.
- [5] Krzywda A., Petelencz E., Michalczyk D., Płonka P.M., Sclerotia of the acellular (true) slime mould *Fuligo septica* as a model to study melanization and anabiosis, *Cell Molecular Biology letters* 2008, 13, 130-143.
- [6] Okazaki M., Kuwata K., Miki Y., Shiga S., Shiga T., Electron spin relaxation of synthetic melanin and melanin – containing human tissues as studied by electron spin echo and electron spin resonance, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1985, 242, 197-2005.
- [7] 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*, *Science of the Total Environment* 2006, 363, 195-205.
- [8] Matuszczyk M., Buszman E., Pilawa B., Witoszyńska T., Wilczok T., Cd^{2+} effect on free radicals in *Cladosporium cladosporioides* – melanin tested by EPR spectroscopy, *Chemical Physics Letters* 2004, 394, 366-371.
- [9] Pilawa B., Buszman E., Gondzik A., Wilczyński S., Zdybel M., Witoszyńska T., Wilczok T. Effect of pH on paramagnetic centers in *Cladosporium cladosporioides*, *Acta Physica Polonica A* 2005, 108, 147-150.
- [10] Pilawa B., Latocha M., Krzyminiewski R., Kruczyński Z., Buszman E., Wilczok T., Effect of temperature on melanin EPR spectra, *Physica Medica* 2004, XX(Suppl. 1), 96-98.
- [11] Pilawa B., Chodurek E., Wilczok T., Types of paramagnetic centres in Cu^{2+} complexes with model neuromelanins, *Applied Magnetic Resonance* 2003, 24, 417-422.
- [12] Chodurek E., Pilawa B., Dzierżęga-Lęcznar A., Kurkiewicz S., Świątkowska 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, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 2003, 70, 43-54.

References

- [13] 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, *Chemical Physics Letters* 2005, 403, 22-28.
- [14] Buszman E., Pilawa B., Zdybel M., Wrześniok D., Grzegorzczak A., Wilczok T., Paramagnetic centers in DOPA-melanin-dihydrostreptomycin complexes, *Acta Physica Polonica A* 2005, 108, 353-356.
- [15] 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, *Applied Magnetic Resonance* 2003, 25, 105-111.
- [16] Pilawa B., Buszman E., Wrześniok D., Latocha M., Wilczok T., Application of EPR spectroscopy to examination of gentamicin and kanamycin binding to DOPA-melanin, *Applied Magnetic Resonance* 2002, 23, 181-192.
- [17] Duliu O. G., Electron paramagnetic resonance identification of irradiated cuttlefish (*Sepia officinalis* L.), *Applied Radiation and isotopes* 2000, 52, 1385-1390.
- [18] Bartosz G., *Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie*, Warszawa, PWN 2006.
- [19] Eaton G.R., Eaton S.S., Salikhov K.M. (eds), *Foundations of modern EPR*, World Scientific, Singapore, New Jersey, London, Hong Kong 1998.
- [20] Baumann L., *Cosmetic dermatology* 2002.
- [21] Gibka J., Wykorzystanie melaniny i procesu melanogenezy w kosmetyce, *Polish Journal of Cosmetology* 2000, 3, 164-176.
- [22] Stankowski J., Hilczer W., *Pierwszy krok ku spektroskopii rezonansów magnetycznych*, Ośrodek Wydawnictw Naukowych PWN 2006.
- [23] Wertz J. E., Bolton J. R., *Electron Spin Resonance. Elementary Theory and Practical Applications*, New York, London, 1986.
- [24] Kozdrowska L., Właściwości centrów paramagnetycznych kompleksów DOPA-melaniny z kanamycyną i jonami miedzi (II), Rozprawa doktorska, Uniwersytet Zielonogórski, Zielona Góra 2005.
- [25] Zdybel M., Złożony układ centrów paramagnetycznych kompleksów DOPA-melaniny z netilmicyną, jonami cynku(II) i miedzi(II), Rozprawa doktorska, Śląski Uniwersytet Medyczny, Katowice 2008.
- [26] Pilawa B., Zdybel M., Latocha M., Krzyminiewski R., Kruczyński Z., Analysis of lineshape of black *Drosophila melanogaster* EPR spectra, *Current Topics of Biophysics* 2008, 31, 5-9.