

## Wnioski

- Zarówno promieniowanie gamma jak i promieniowanie termiczne powodują powstawanie wolnych rodników ( $\sim 10^{16}$ – $10^{18}$ spin/g) w streptomycynie.
- Silne oddziaływania dipolowe spin-spin poszerzające rejestrowane linie EPR wskazują na niewielkie odległości pomiędzy wolnymi rodnikami w badanych próbkach
- Zarówno sterylizacja termiczna jak i radiacyjna powodują powstawanie podobnych wolnych rodników – z niesparowanym elektronem zlokalizowanym na atomie tlenu o czym świadczy porównywalna wartość współczynnika g.

## Conclusions

- Both gamma radiation as well as thermal radiation cause formation of free radicals ( $10^{16}$ – $10^{18}$ spin/g) in streptomycin.
- Strong dipole spin-spin interactions broadening the EPR lines point at short distance between free radicals in the studied sample.
- Both thermal sterilization as well as radiation sterilization cause formation of similar free radicals – with unpaired electron localized on oxygen atoms what testify to comparable g factor values.

## Piśmiennictwo

- [1] Basly JP, Longy I, Bernard M. ESR identification of radiosterilized pharmaceuticals: latamoxef and ceftriaxone. *Int J Pharm* 1997; 158: 241 – 245.
- [2] Basly JP, Basly I, Bernard M. ESR spectroscopy applied to the study of pharmaceuticals radiosterilization: cefoperazone. *J Pharm Biomed Anal* 1998; 17: 871 – 875.
- [3] Basly JP, Basly I, Bernard M. Influence of radiation treatment on dobutamine. *Int J Pharm* 1998; 170: 265 – 269.
- [4] Gibella M, Crucq AS, Tilquin B, Stocker P, Lesgards G, Raffi J. Electron spin resonance of some irradiated pharmaceuticals. *Radiat Phys Chem* 2000; 58: 69 – 76.
- [5] Varshney L, Dodke PB. Radiation effect studies on anticancer drugs, cyclophosphamide and doxorubicin for radiation sterilization. *Radiat Phys Chem* 2004; 71: 1103 – 1111.

## References

- [6] Janiec W, red. Kompendium farmakologii. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL; 2001.
- [7] Dzierzanowska D. Antybiotykoterapia praktyczna. Warszawa: Wydawnictwo α-press; 2000.
- [8] Zejc A, Gorczyca M, red. Chemia leków. Wydawnictwo Lekarskie PZWL; 2002
- [9] PN-EN 552. Sterylizacja wyrobów medycznych. Walidacja i rutynowa kontrola sterylizacji metodą napromieniowania. Warszawa: Polski Komitet Normalizacyjny; 1999.
- [10] Farmakopea polska, wydanie VII. Warszawa 2006.

## PARAMAGNETYZM UPIGMENTOWANYCH GRZYBÓW GLEBOWYCH CLADOSPORIUM HERBARUM

MAGDALENA ZDYBEL<sup>1\*</sup>, BARBARA PILAWA<sup>1</sup>, EWA BUSZMAN<sup>2</sup>,  
TERESA WITOSZYŃSKA<sup>2</sup>, BEATA BROTON<sup>1</sup>

ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY W KATOWICACH,  
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY Z ODDZIAŁEM MEDYCZNY LABORATORYJNEJ:

<sup>1</sup>KATEDRA I ZAKŁAD BIOFIZYKI,

UL. JEDNOŚCI 8, 41-200 SOSNOWIEC, POLSKA

<sup>2</sup>KATEDRA I ZAKŁAD CHEMII I ANALIZY LEKÓW,

UL. JAGIELLOŃSKA 4, 41-200 SOSNOWIEC, POLSKA

\*MAILTO: MZDYBEL@SUM.EDU.PL

### Streszczenie

Zbadano właściwości centrów paramagnetycznych upigmentowanych grzybów glebowych *Cladosporium herbarum* metodą EPR. Stwierdzono stabilny paramagnetyzm *Cladosporium herbarum* wynikający z obecności w próbce głównie eumelaniny. W widmach EPR obserwowano dominującą linię eumelaniny oraz dodatkowo linię feomelaniny o niewielkiej amplitudzie. o-Semichinonowe wolne rodniki ( $\sim 10^{17}$ spin/g) odpowiadają za paramagnetyzm *Cladosporium herbarum*.

**Słowa kluczowe:** paramagnetyzm, wolne rodniki, melanina, *Cladosporium herbarum*, EPR

[*Inżynieria Biomateriałów*, 89-91, (2009), 173-175]

## PARAMAGNETISM OF PIGMENTED SOIL FUNGI CLADOSPORIUM HERBARUM

MAGDALENA ZDYBEL<sup>1\*</sup>, BARBARA PILAWA<sup>1</sup>, EWA BUSZMAN<sup>2</sup>,  
TERESA WITOSZYŃSKA<sup>2</sup>, BEATA BROTON<sup>1</sup>

MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA IN KATOWICE:

SCHOOL OF PHARMACY AND LABORATORY MEDICINE,

<sup>1</sup>DEPARTMENT OF BIOPHYSICS,

8 JEDNOŚCI STR., 41-200 SOSNOWIEC, POLAND

<sup>2</sup>DEPARTMENT OF PHARMACEUTICAL CHEMISTRY,

4 JAGIELLOŃSKA STR., 41-200 SOSNOWIEC, POLAND

\*MAILTO: MZDYBEL@SUM.EDU.PL

### Abstract

Properties of paramagnetic centers in pigmented soil fungi *Cladosporium herbarum* were studied by EPR method. Stable paramagnetism of *Cladosporium herbarum*, mainly resulted from existence of eumelanin in the sample, was stated. Dominant line of eumelanin and additionally line of pheomelanin with the low amplitude were observed in EPR spectra. o-Semiquinone free radicals ( $\sim 10^{17}$ spin/g) are mainly responsible for paramagnetism of *Cladosporium herbarum*.

**Keywords:** paramagnetism, free radicals, melanin, *Cladosporium herbarum*, EPR

[*Engineering of Biomaterials*, 89-91, (2009), 173-175]

Cladosporium herbarum to grzyby glebowe zawierające biopolimery melaninowe [1]. Melaniny wykorzystywane są w produktach kosmetycznych [2]. Cladosporium herbarum może więc stanowić źródło melaniny dla przemysłu kosmetycznego. Jednakże ze względu na dużą zawartość wolnych rodników [3-7] melaniny mogą powodować efekty toksyczne w tkankach [7]. Z literatury naukowej znane są właściwości paramagnetyczne melaniny pozyskiwanej z Sepia officinalis, wykorzystywanej w kosmetykach [8]. Celem niniejszej pracy jest określenie koncentracji i właściwości centrów paramagnetycznych występujących w Cladosporium herbarum.

## Materiały i metody

W pracy badaniom poddano upigmentowane grzyby glebowe Cladosporium herbarum oraz modelową eumelaninę – DOPA-melaninę. Syntetyczną DOPA-melaninę otrzymano metodą opisaną przez Binnisa i wsp. [9]. Suche próbki w postaci proszkowej umieszczono w szklanych rurkach pomiarowych. Pomiar widm wykonano z wykorzystaniem spektrometru elektronowego rezonansu paramagnetycznego na pasmo X (9.3GHz) Firmy RADIOPAN (Poznań, Polska). Widma EPR rejestrowano w zakresie mocy mikrofalowych 0.7-70 mW. Analizowano współczynnik rozszczepienia spektroskopowego g, intensywność integralną (I) oraz szerokość ( $\Delta B_{pp}$ ) linii EPR. Wyznaczono koncentrację wolnych rodników w próbkach. Jako wzorzec koncentracji wolnych rodników zastosowano ultramarynę.

## Wyniki i dyskusja

Dla Cladosporium herbarum rejestrowano silne sygnały EPR (RYS.1). Widma EPR Cladosporium herbarum stanowiły superpozycję linii eumelaniny oraz linii feomelaniny. Główną składową widma EPR Cladosporium herbarum jest linia eumelaniny. Widmo modelowej eumelaniny – DOPA-melaniny pokazano na RYSUNKU 2. Widmo EPR feomelaniny jest złożone i wykazuje nierozdzieloną strukturę nadsubtelną [6]. Występowanie linii feomelaniny w widmie EPR Cladosporium herbarum jest wyraźniej widoczne dla krzywych rejestrowanych przy mniejszym tłumieniu (RYS.1).

W Cladosporium herbarum występują o-semichinonowe wolne rodniki o charakterystycznym współczynniku rozszczepienia

spektroskopowego g wynoszącym 2.0037. Koncentracja wolnych rodników w Cladosporium herbarum wynosi  $4.7 \times 10^{17}$  spin/g. Szerokość linii EPR badanej próbki dla mocy mikrofalowej 0.7mW wynosi 0.37mT. Poszerzenie linii EPR może wynikać z oddziaływań dipolowych pomiędzy niesparowanymi elektronami wolnych rodników.

Wpływ mocy mikrofalowej na intensywność integralną i szerokość linii EPR Cladosporium herbarum przedstawiono

## Introduction

Cladosporium herbarum are soil fungi, which contain melanin biopolymers [1]. Melanins are used in cosmetics [2]. Cladosporium cladosporioides may be the source of melanin for cosmetic industry. However taking in to account high free radicals content [3-7], melanin may be responsible for toxic effects in tissues [7]. Paramagnetic properties of melanin from Sepia officinalis, which is added to cosmetics, are known from the literature [8]. The aim of this work is to determine of concentration and properties of paramagnetic centers of Cladosporium herbarum.

## Materials and methods

In the present work pigmented soil fungi Cladosporium herbarum and model eumelanin – DOPA-melanin were studied. DOPA-melanin was synthesized according to the Binn's method [9]. Dry powdered samples were put into the glass tubes and EPR spectra were recorded. Measurements of spectra were performed by the use of electron paramagnetic resonance spectrometer at X-band (9.3GHz) produced by RADIOPAN (Poznań, Poland). EPR spectra were measured with microwave in the range of 0.7-70mW. g-Factor, integral intensity (I), and linewidth ( $\Delta B_{pp}$ ) of EPR lines were analysed. Concentrations of free radicals in the samples were determined. Ultramarine was the reference for concentration.

## Results and discussion

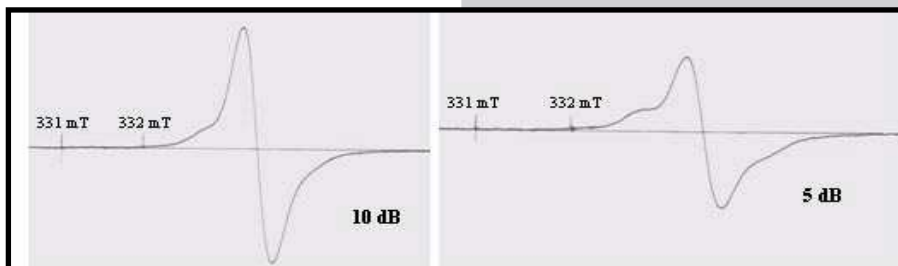
Strong EPR signals were observed in spectra of Cladosporium herbarum (FIG.1). EPR spectra of Cladosporium herbarum were superposition of eumelanin and pheomelanin. EPR line of eumelanin dominates in spectra of Cladosporium herbarum. EPR spectrum of DOPA-melanin is presented in FIGURE 2. EPR spectrum of pheomelanin has complex line with unresolved hyperfine structure [6]. Pheomelanin component became more visible in EPR spectrum recorded at lower attenuation (FIG.1).

o-Semiquinone free radicals with characteristic g-factor

of 2.0037 exist in Cladosporium herbarum. Concentration of free radicals in Cladosporium herbarum is  $4.7 \times 10^{17}$  spin/g. Linewidth of EPR lines of the studied sample for microwave power of 0.7mW is equal to 0.37mT. Broadening of EPR line may result from

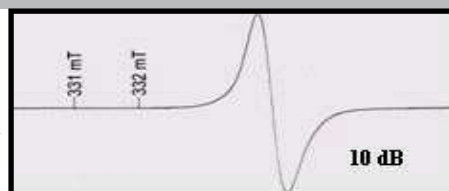
dipolar interactions between unpaired electrons of free radicals.

Influences of microwave power on integral intensity and linewidth of EPR lines of Cladosporium herbarum are presented in FIGURES 3 and 5, and corresponding correlations for DOPA-melanin show FIGURES 4, 5. EPR lines of Cladosporium herbarum saturate at low microwave power (FIG.3), similar to EPR lines of DOPA-melanin (FIG.4). It indicates that slow spin-lattice relaxation



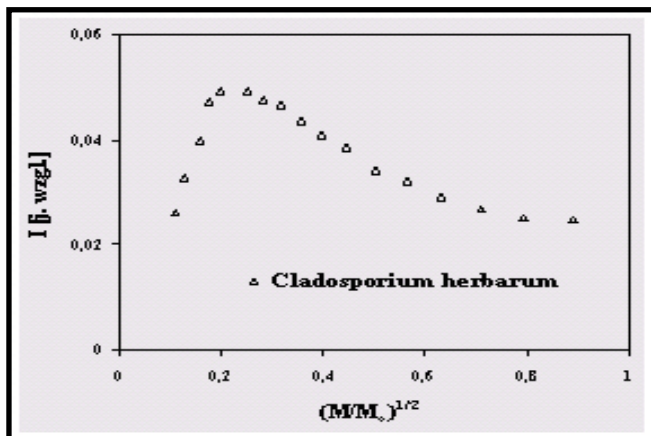
RYS.1. Widma EPR Cladosporium herbarum zarejestrowane przy tłumieniach 10dB i 5dB.

FIG.1. EPR spectra of Cladosporium herbarum recorded at attenuations of 10dB and 5 B.

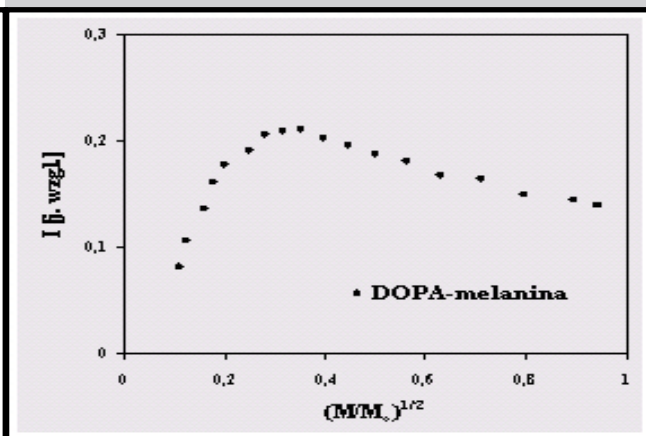


RYS.2. Widmo EPR DOPA-melaniny zarejestrowane przy tłumieniu wynoszącym 10dB.

FIG.2. EPR spectrum of DOPA-melanin recorded at attenuation of 10dB.



**RYS.3.** Wpływ mocy mikrofalowej na intensywność integralną (I) linii EPR *Cladosporium herbarum*.  
**FIG.3.** Influence of microwave power on integral intensity (I) of EPR lines of *Cladosporium herbarum*.



**RYS.4.** Wpływ mocy mikrofalowej na intensywność integralną (I) linii EPR DOPA-melaniny.  
**FIG. 4.** Influence of microwave power on integral intensity (I) of EPR lines of DOPA-melanin

na RYSUNKACH 3 i 5, a odpowiednie zależności dla DOPA-melaniny pokazują rysunki 4, 5. Linie EPR *Cladosporium herbarum* nasycają się dla niskich mocy mikrofalowych (RYS.3), podobnie jak linie EPR DOPA-melaniny (RYS. 4). Wskazuje to na wolne procesy relaksacji spin-sieć w melaninie występującej w *Cladosporium herbarum* oraz w DOPA-melaninie. Zmiany intensywności integralnej i szerokości widm EPR *Cladosporium herbarum* i DOPA-melaniny (Rys. 3-5) wraz ze wzrostem mocy mikrofalowej wskazują na jednorodne poszerzenie ich linii rezonansowych.

## Podsumowanie

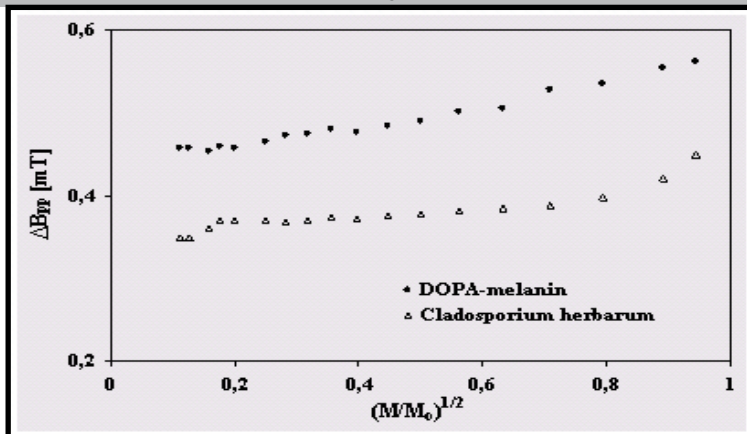
Badania *Cladosporium herbarum* z zastosowaniem spektroskopii EPR wykazały silny paramagnetyzm oraz dużą zawartość eumelaniny w grzybach glebowych. *Cladosporium herbarum* można więc zaproponować jako źródło melaniny wykorzystywane w produkcji substancji kosmetycznych.

## Podziękowania

Praca finansowana przez Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach.

## Piśmiennictwo

- [1] Martini H, Weidenböner M, Adams S, Kunz B. Increased antifungal activity of 3- and 7-hydroxyflavone against *Cladosporium herbarum* and *Penicillium glabrum* through ester formation. *Mycoll Res* 1997; 101: 920-922
- [2] Gibka J. Wykorzystanie melaniny i procesu melanogenezy w kosmetyce. *Pol J Cosmetol* 2000; 3: 164-176.
- [3] Sarna T. Badanie struktury i właściwości centrów aktywnych melanin. *Zagad Biof Współ* 1981; 6: 201-219.
- [4] Pilawa B, Buszman E, Latocha M, Wilczok T. EPR studies of melanin from *Cladosporium cladosporioides*. *Pol J Med Phys Eng* 1996; 2: 59-65.
- [5] Matuszczyk M, Buszman E, Pilawa B, Witoszyńska T, Wilczok T. Cd<sup>2+</sup> effect on free radicals in *Cladosporium cladosporioides*—melanin tested by EPR spectroscopy. *Chem Phys Letters* 2004; 394: 366-371.



**RYS.5.** Wpływ mocy mikrofalowej na szerokość ( $\Delta B_{pp}$ ) linii EPR DOPA-melaniny oraz *Cladosporium herbarum*. M—moc mikrofalowa stosowana podczas pomiaru widma EPR. M<sub>0</sub>—całkowita moc mikrofalowa wytwarzana przez klistron (70mW).  
**FIG.5.** Influence of microwave power on linewidths ( $\Delta B_{pp}$ ) of EPR lines of DOPA-melanin and *Cladosporium herbarum*. M—micro-wave power used during measurement of EPR spectra. M<sub>0</sub>—the highest microwave power produced by klystron (70mW).

processes exist in *Cladosporium herbarum* and DOPA-melanin. Changes of integral intensity and linewidth of EPR spectra of *Cladosporium herbarum* and DOPA-melanin (FIG.3-5) with increasing of microwave power point out that these resonance lines are homogeneously broadened.

## Conclusions

EPR spectroscopic studies of *Cladosporium herbarum* pointed

out strong paramagnetism and high content of eumelanin in these soil fungi. *Cladosporium herbarum* may be proposed as source of melanin for cosmetic substances.

## Acknowledgements

This study was supported by Medical University of Silesia in Katowice.

## References

- [6] Buszman E, Pilawa B, Zdybel M, et al. EPR examination of Zn<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup> binding by pigmented soil fungi *Cladosporium cladosporioides*. *Sci Total Environ* 2006; 363: 195-205.
- [7] Hegedus ZL. The probable involvement of soluble and deposited melanins, their intermediates and the reactive oxygen side-products in human diseases and aging. *Toxicology* 2000; 145: 85-101.
- [8] Chodurek E, Czyżyk D, Pilawa B, Wilczyński S. EPR studies of paramagnetic centers in melanin from *Sepia officinalis*. *Engineering of Biomaterials* 2009; 86:28-32.
- [9] Binns F, Chapman RF, Robson NC, Swan GA, Waggot A. Studies related to the chemistry of melanins. Part VIII. The pyrrole-carboxylic acids formed by oxidation or hydrolysis of melanin derived from 3,4-dihydroxyphenethylamine or 3,4-dihydroxyphenylalanine. *J Chem Soc C* 1970: 1128-1134.