



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας
«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»**

ΖΗΣΗΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ

Μεταπτυχιακή Διατριβή

**ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ
ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΟΥΣΙΑΣ ΕΤΗΟΧΥQUIN – ΕΦΑΡΜΟΓΗ
ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΣΠΑΣΗΣ ΤΟΥ ΣΕ ΟΡΓΑΝΙΚΑ
ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ.**

ΛΑΡΙΣΑ 2015

**Σύνθεση και χρωματογραφική ανάλυση των προϊόντων μεταβολισμού
της αντιοξειδωτικής ουσίας ethoxyquin – Εφαρμογή στην
παρακολούθηση της διάσπασης του σε οργανικά υποστρώματα**

**Synthesis and chromatographic analysis of metabolic products of
the antioxidant ethoxyquin - Application on the determination of its
dissipation in organic substrates**

ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Καρπούζας Δημήτριος

Αναπληρωτής Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας,
Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Παπαδοπούλου Καλλιόπη

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, Τμήματος Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Κομιώτης Δημήτριος

Καθηγητής Οργανικής Χημείας, Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας,
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Για τη διεκπεραίωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας, που πραγματοποιήθηκε στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή μου κ. Δημήτριο Καρπούζα για την καθοδήγηση, επίβλεψη και την πολύτιμη συμβολή του στην ολοκλήρωσή της.

Επίσης ευχαριστώ τον καθηγητή κ. Δημήτριο Κομιώτη για τη συνεργασία του καθώς και το προσωπικό των εργαστηρίων Βιοτεχνολογίας Φυτών και Βιο-Οργανικής Χημείας για την άφογη συμπεριφορά τους και την προσφορά κάθε είδους βοήθειας όταν χρειάστηκε.

Θα ήθελα να κάνω ιδιαίτερη αναφορά στον υποψήφιο διδάκτορα Παναγιώτη Καρά για την αμέριστη βοήθεια, στήριξη και παροχή γνώσεων σε όλα τα στάδια της πειραματικής διαδικασίας όπως επίσης και στην ερευνήτρια Βιο-Οργανικής Χημείας Δρ. Στυλιανή Μαντά για την καθοριστική συνεισφορά της μέσω συμβουλών και παρατηρήσεων καθ' όλη τη διάρκεια της ενασχόλησής μου με αυτή την εργασία.

Τέλος ευχαριστώ την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών κ. Καλλιόπη Παπαδοπούλου για τη συμβολή της στην ολοκλήρωση της συγκεκριμένης διατριβής μέσω της συμμετοχής της στην τριμελή επιτροπή.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η διατήρηση της υψηλής ποιότητας των φρούτων κατά την διάρκεια της αποθήκευσης προϋποθέτει την εφαρμογή μυκητοκτόνων και αντιοξειδωτικών όπως το ethoxyquin (EQ). Η εφαρμογή των παραπάνω γεωργικών φαρμάκων οδηγεί στην παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων υγρών αποβλήτων που περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις γεωργικών φαρμάκων και χρήζουν επεξεργασίας πριν την ελευθέρωση τους στο περιβάλλον. Οι βιοκλίνες έχουν προκριθεί ως κατάλληλη και χαμηλού κόστους μέθοδος για την επεξεργασία των συγκεκριμένων αποβλήτων. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η αποδόμηση και μεταβολισμός του ethoxyquin (EQ) που χρησιμοποιείται σε συσκευαστήρια μήλων και αχλαδιών, σε έδαφος και βιομίγματα που χρησιμοποιούνται ως πληρωτικά υλικά των βιοκλινών. Τα βιομίγματα που δοκιμάστηκαν αποτελούνταν από άχυρο, έδαφος και εξαντλημένο υπόστρωμα μανιταριών αναμεμιγμένα σε διάφορες ογκομετρικές αναλογίες. Για την ολοκλήρωση της μελέτης αρχικά συντέθηκαν τα δύο βασικά προϊόντα μεταβολισμού του EQ που ανιχνεύθηκαν σε προκαταρκτικές μελέτες: 2,4-Dimethyl-6-ethoxyquinoline (Dimehtyl-EQ) και 2,6-Dihydro-2,2,4-trimethyl-6-quinone imine (QI). Ακολούθως αναπτύχθηκε μέθοδος εκχύλισης και χρωματογραφικού προσδιορισμού των παραπάνω ουσιών η οποία εφαρμόστηκε για την παρακολούθηση της αποδόμησης τους σε έδαφος και βιομίγματα. Το EQ ήταν ασταθές και μεταβολίστηκε ταχύτατα σε όλα τα υποστρώματα στο QI που αποτέλεσε τον κύριο μεταβολίτη στις πρώτες ημέρες μετά την εφαρμογή. Το τελευταίο αποδομήθηκε και αυτό ταχύτατα στα βιομίγματα ενώ στο έδαφος παρατηρήθηκε μια βραδύτερη αποδόμηση του που ολοκληρώθηκε στις 21 ημέρες. Παράλληλα σχηματίστηκε σε χαμηλές συγκεντρώσεις και ο έτερος μεταβολίτης Dimethyl-EQ που όμως παρουσίασε υψηλή υπολειμματικότητα σε όλα τα υποστρώματα. Συνολικά τα αποτελέσματα μας δείχνουν ότι οι βιοκλίνες που πληρούνται με κάποιο από τα βιομίγματα που δοκιμάστηκαν αναμένεται να απομακρύνουν το EQ και τους μεταβολίτες τους από τα υγρά απόβλητα.

ABSTRACT

Deterioration of fruit quality during storage could be prevented by the application of fungicides and antioxidants like ethoxyquin (EQ) at postharvest level. The application of those pesticides lead to the formation of large amounts of wastewaters which contain high pesticide residues and should be treated prior to their environmental release. Biobeds have been proposed as a useful method to detoxify those effluents. In this study, we investigated the dissipation and metabolism of EQ which is used in packaging plants of apples and pears, in soil and biomixtures which could be used for the packing of biobeds. Those biomixtures were composed of soil, straw and spent mushroom substrate mixed in various volumetric ratios. For the accomplishment of the above goals, the two main metabolic products of EQ, as identified in preliminary tests, 2,4-Dimethyl-6-ethoxyquinoline (Dimethyl-EQ) and 2,6-Dihydro-2,2,4-trimethyl-6-quinone imine (QI) were synthesized. Those products were used for the preparation of a novel chromatographic method in order to determine the dissipation and metabolism of EQ in soil and biomixtures. EQ was largely stable and it was almost immediately after its application to all substrates transformed to QI which was the main metabolite during the first few days after its application. The latter product was further dissipated rapidly and no residues of QI was detected in any of the media studied at 21 days. In parallel, the formation of Dimethyl-EQ, the other metabolite of EQ, was detected but at low amounts. However their residues persisted in all substrates tested throughout the study duration. Overall, our findings show that biobed systems packed with any of the substrates tested (instead of soil) will achieve optimum removal of EQ and its metabolites from wastewaters from the fruit packaging industry.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1 Μετασυλλεκτική μεταχείριση φρούτων	8
1.2 Επεξεργασία αποβλήτων από τα συσκευαστήρια φρούτων	10
1.3 Γεωργικά φάρμακα και μετασυλλεκτική χρήση τους	12
1.3.1 Diphenylamine (DPA).....	12
1.3.2 Thiabendazole (TBZ).....	13
1.3.3 Ortho-phenyl-phenol (OPP).....	14
1.3.4 Imazalil (IMZ).....	15
1.4 Ethoxyquin (EQ)	16
1.4.1 Χρήσεις του Ethoxyquin.....	16
1.4.2 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του EQ.....	18
1.4.3 Προϊόντα μεταβολισμού του Ethoxyquin	18
1.5 Σκοπός της εργασίας	19

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	20
2.1 Σύνθεση προϊόντων μεταβολισμού του EQ	20
2.1.1 Υλικά.....	20
2.1.2 Σύνθεση του μεταβολίτη 2,4-Dimethyl-6-ethoxyquinoline (2).....	20
2.1.3 Σύνθεση του μεταβολίτη 6 - dihydro - 2, 2, 4- trimethyl- 6- quinine imine (5).....	22
2.2 Ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού του EQ και των μεταβολιτών του σε βιομίγματα με σύστημα HPLC	23
2.2.1 Υλικά και εργαστηριακά όργανα που χρησιμοποιήθηκαν.....	23
2.2.2 Διαδικασία Εκχύλισης.....	24
2.2.3 Προσδιορισμός των υπολειμμάτων του EQ και των μεταβολιτών του σε σύστημα HPLC-UV.....	25
2.3 Υποστρώματα στα οποία εξετάστηκε η αποδόμηση του EQ	26
2.4 Μελέτη της αποδόμησης και του μεταβολισμού του EQ	27

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....29

3.1 Αποδόμηση και μεταβολισμός ΕQ.....29

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....32

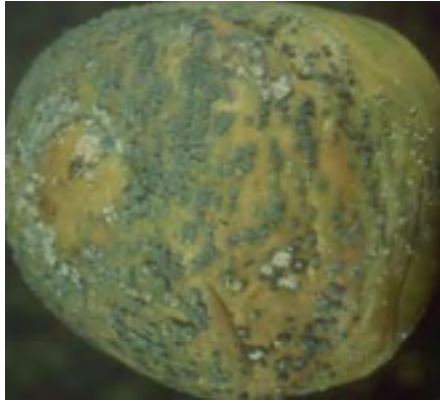
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ-ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....35

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΜΕΤΑΣΥΛΛΕΚΤΙΚΗ ΜΕΤΑΧΕΙΡΙΣΗ ΦΡΟΥΤΩΝ

Κατά το διάστημα αποθήκευσης των φρούτων και λαχανικών και μέχρι τη διάθεσή τους στην αγορά είναι αυξημένη η πιθανότητα εμφάνισης διαφόρων ασθενειών. Οι ασθένειες αυτές είτε έχουν προσβάλλει τα προϊόντα πριν αυτά συγκομιστούν και εκδηλώνονται κατά την αποθήκευση, είτε μολύνουν τα προϊόντα μετασυλλεκτικά. Και στις δύο περιπτώσεις οδηγούν σε οικονομική ζημία λόγω της μείωσης της ποιότητας αλλά και της ποσότητας των φρούτων ενώ υπάρχει ο κίνδυνος της πλήρους απώλειας των αποθηκευμένων καρπών. Σχεδόν όλες αυτές οι ασθένειες προκαλούνται από μύκητες και βακτήρια.

Για τον λόγο αυτό φρούτα και λαχανικά υπόκεινται σε διάφορους χειρισμούς στα συσκευαστήρια ή σε χώρους αποθήκευσης όπως ψυγεία, ώστε να ελαχιστοποιηθούν οι προσβολές και οι οικονομικές απώλειες λόγω υποβάθμισης της ποιότητας. Τέτοιοι χειρισμοί είναι η ακτινοβολία, η χρήση υψηλών θερμοκρασιών, ο έλεγχος του περιβάλλοντος αποθήκευσης με τροποποιημένη ατμόσφαιρα καθώς επίσης και η χρήση μυκητοκτόνων και αντιοξειδωτικών. Ειδικά η χημική αντιμετώπιση με τη χρήση των τελευταίων, συναντάται συχνά λόγω του υψηλού κόστους εφαρμογής των άλλων μεθόδων. Μυκητοκτόνα χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο παθογόνων μυκήτων όπως οι *Penicillium spp* (Εικόνα 1), *Botrytis cinerea* (Εικόνα 2), *Colletotrichum gloeosporioides* (Εικόνα 3 και 4) και *Alternaria spp* στα μηλοειδή, καθώς επίσης οι *Penicillium italicum*, *Penicillium digitatum*, *Alternaria citri* και *Phomopsis citri* στα εσπεριδοειδή.



Εικόνα 1: Μήλο με προσβολή από *Penicillium* spp



Εικόνα 2: Προσβολή αχλαδιού από *Botrytis cinerea*



Εικόνες 3,4: Εμφάνιση του μύκητα *Colletotrichum gloeosporioides* σε πορτοκάλι

1.2. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ ΑΠΟ ΤΑ ΣΥΣΚΕΥΑΣΤΗΡΙΑ ΦΡΟΥΤΩΝ

Η χρήση γεωργικών φαρμάκων αποτελεί ακόμη και σήμερα την βασική μέθοδο για την προστασία των φρούτων από μυκητιακές προσβολές και την εμφάνιση φυσιολογικών ασθενειών κατά την αποθήκευση. Η εφαρμογή των γεωργικών φαρμάκων στα συσκευαστήρια φρούτων έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων υγρών αποβλήτων εξαιτίας της αυξημένης απαίτησης σε νερό, τα οποία είναι επιβλαβή για το περιβάλλον και γι' αυτό το λόγο είναι αναγκαία η επεξεργασία τους. Αυτό έχει οδηγήσει την Ευρωπαϊκή Κοινότητα στην απαίτηση για εγκατάσταση στα συσκευαστήρια φρούτων μονάδων επεξεργασίας των αποβλήτων που παράγονται από αυτά (EC 2000). Παρόλα αυτά ελάχιστα έχουν γίνει προς αυτή την κατεύθυνση μέχρι σήμερα με αποτέλεσμα την μη ύπαρξη μεθόδων για την επεξεργασία των συγκεκριμένων υγρών αποβλήτων. Οι Omirou et al. (2012) πρώτοι πρότειναν την χρήση των βιοκλινών για την επεξεργασία των υγρών αποβλήτων από τα συσκευαστήρια φρούτων. Οι βιοκλίνες (Εικόνα 5) μέχρι το 2012 χρησιμοποιούνταν για την επεξεργασία υγρών αποβλήτων που παράγονται από μη ορθές πρακτικές χειρισμού των ψεκαστικών υγρών πριν ή μετά το ψεκασμό, δηλαδή για υγρά απόβλητα που παράγονται στον αγρό (Castillo et al. 2008). Οι βιοκλίνες στην πιο απλή τους μορφή αποτελούν ένα όρυγμα βάθους 1 m και έκταση που ποικίλει από 10 ως 35 m² που συνήθως είναι μονωμένο στο πυθμένα με κατάλληλο όμως σύστημα στράγγισης και το οποίο πληρούται με ένα βιοοργανικό μίγμα του οποίου η σύνθεση ποικίλει αλλά κατά βάση αποτελείται από έδαφος, ένα λιγνινοκυτταρινούχο υλικό (συνήθως άχυρο) και κάποιο χουμοποιημένο υλικό όπως τύρφη ή κομποστοποιημένα αγροτικά παραπροϊόντα (Εικόνα 6). Οι Karanasios et al (2010) έδειξαν ότι το εξαντλημένο υπόστρωμα μανιταριών του είδους *Pleurotus ostreatus* όταν χρησιμοποιηθεί σε μίγμα με άχυρο και έδαφος βελτίωσε σημαντικά την αποδομητική ικανότητα των βιοκλινών. Παρόλα αυτά ελάχιστα είναι γνωστά σήμερα για την αποδόμηση των συγκεκριμένων γεωργικών φαρμάκων που χρησιμοποιούνται στα συσκευαστήρια φρούτων στο περιβάλλον αλλά και πόσο τα πληρωτικά υλικά των βιοκλινών μπορούν να επιταχύνουν την αποδόμηση τους και άρα να προστατεύσουν τα φυσικά υδροφόρα συστήματα από ρύπανση.



Εικόνα 5. Σύστημα βιοκλίνης στην Σουηδία για την επεξεργασία των αποβλήτων που παράγονται στον αγρό



Εικόνα 6. Μίγμα οργανικών υλικών όπως άχυρο, έδαφος και εξαντλημένο υπόστρωμα από μανιτάρια

1.3 ΓΕΩΡΓΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ ΚΑΙ ΜΕΤΑΣΥΛΛΕΚΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥΣ

Τα κυριότερα γεωργικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται στα συσκευαστήρια φρούτων είναι τα μυκητοκτόνα imazalil (IMZ), thiabendazole (TBZ), ortho-phenylphenol (OPP) και τα αντιοξειδωτικά diphenylamine (DPA) και ethoxyquin (EQ). Παρακάτω δίνονται περισσότερες πληροφορίες για αυτά εστιάζοντας στο ethoxyquin που αποτέλεσε και το αντικείμενο της παρούσας εργασίας

1.3.1 Diphenylamine (DPA)

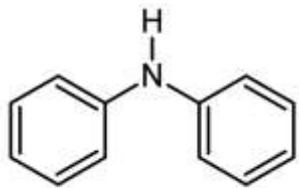
Το DPA είναι μια οργανική ένωση με χημικό τύπο $(C_6H_5)_2 NH$ και ανήκει στην κατηγορία των αρωματικών αμινών. Το μόριο της είναι «αρωματικό», λόγω της παρουσίας του δακτυλίου του βενζολίου στη δομή της και «αμίνη», λόγω ενός βασικού ατόμου N. Η χημική αυτή ένωση είναι λευκή, κυρίως στερεή σε θερμοκρασία δωματίου. Αποτελείται από λευκούς ή σχεδόν λευκούς κρυστάλλους οι οποίοι σκουραίνουν κατά την έκθεσή τους στο φως.

Η διφαινυλαμίνη διαλύεται καλά σε πολλούς κοινούς οργανικούς διαλύτες, αλλά είναι αδιάλυτη στο νερό. Ως βιομηχανικό χημικό προϊόν χρησιμοποιείται ευρέως λόγω των αντιοξειδωτικών της ιδιοτήτων στα φυτοφάρμακα, στις χρωστικές ουσίες, καθώς επίσης και στα κτηνιατρικά φάρμακα. Αποτελεί ένα βασικό παράγοντα ρύθμισης της ανάπτυξης των αποθηκευμένων φρούτων καθώς και της διατήρησής τους μετά τη συγκομιδή και ιδιαίτερος στον έλεγχο των επιφανειακών εγκαυμάτων στα μήλα. Εφαρμόζεται με εμβάπτιση, διαβροχή ή ψεκασμό. Η χρήση του DPA στην ΕΕ έχει απαγορευθεί από το 2008 ως σήμερα λόγω του σχηματισμού τοξικών μεταβολιτών του DPA στα φρούτα κατά την διάρκεια της αποθήκευσης. Παρόλα αυτά αρκετές χώρες της Ευρώπης έδωσαν κατ'εξαιρεση άδεια χρήσης 120 ημερών για το DPA από το 2012 ως σήμερα καθώς θεωρήθηκε ότι δεν υπάρχει ανάλογο γεωργικό φάρμακο με εξίσου υψηλή αποτελεσματικότητα που να μπορεί να καλύψει το κενό απόσυρσης του DPA από την αγορά.

Η Υπηρεσία Προστασίας του Περιβάλλοντος των Η.Π.Α. (EPA) δημοσίευσε, τον Απρίλιο του 1998, την έρευνα [(Prevention, Pesticides And Toxic Substances) - R.E.D. FACTS - Diphenylamine] στην οποία αναφέρεται ότι η διφαινυλαμίνη (DPA) είναι ελαφρώς τοξική (ερεθιστική) από την οδό του στόματος, του δέρματος και του αναπνευστικού συστήματος και τοποθετείται στην κατηγορία τοξικότητας III, ενώ δεν επαρκούν τα αποδεικτικά στοιχεία σχετικά με την καρκινογένεση στον άνθρωπο. Θεωρείται γενικά πως έχει χαμηλή τοξικότητα και για την περίπτωση της διατήρησης των μήλων έχει οριστεί αυστηρά η μέγιστη επιτρεπόμενη ποσότητα της εν λόγω ουσίας.

(www.epa.gov)

Όσον αφορά τα οικοτοξικολογικά χαρακτηριστικά του DPA, αυτό δεν θεωρείται τοξικό στα πουλιά και στα θηλαστικά αλλά είναι ιδιαίτερα τοξικό στους υδρόβιους οργανισμούς (EFSA 2012). Τα όρια υπολειμμάτων της ΕΕ για την DPA είναι 5 mg / kg για τα μήλα και τα 10 mg / kg για τα αχλάδια

ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ	
Όνομασία	: Diphenylamine (DPA)
Χημικός τύπος	: C ₁₂ H ₁₁ N
Μοριακό βάρος	: 169.23 g/mol
	

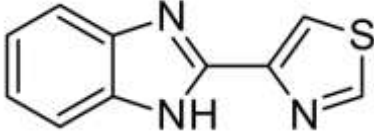
1.3.2 Thiabendazole (TBZ)

Το thiabendazole (TBZ), (2- (4-thiazolyl) benzimidazole, C₁₀H₇N₃S, είναι ένα χημικό μυκητοκτόνο, ανήκει στην ομάδα των βενζιμιδαζολικών και χρησιμοποιείται ευρέως στα λαχανικά και τα φρούτα για τη θεραπεία και πρόληψη διαφόρων ασθενειών που προκύπτουν από τη μακρά μεταφορά και

αποθήκευσή τους, όπως η μούχλα, η σήψη και η εμφάνιση επιφανειακών κηλίδων-εγκαυμάτων. Εφαρμόζεται κυρίως με εμβάπτιση και ψεκάσμο.

Σύμφωνα με τους κανονισμούς της Ευρωπαϊκής Ένωσης, το TBZ χρησιμοποιείται με μέγιστη δοσολογία της τάξης των 6 mg/ kg, στα εσπεριδοειδή όπως στα πορτοκάλια, γκρέιπφρουτ, λεμόνια, μανταρίνια (Κανονισμός ΕΚ αριθ.1333/2008Τ, Οδηγία 98/107 / ΕΟΚ). Η Αμερικανική Υπηρεσία Προστασίας Περιβάλλοντος (EPA) το κατατάσσει ως πιθανώς καρκινογόνο αν εφαρμοσθεί σε αρκετά υψηλές δόσεις, ικανό να προκαλέσει, μεταξύ άλλων, διαταραχή της ισορροπίας των ορμονών του θυρεοειδούς. (www.epa.gov)

Το TBZ εμφανίζει χαμηλή οξεία και μεσοπρόθεση τοξικότητα σε ποντίκια και πουλιά (LC50 ποντίκια = 3100 mg/kg bw; LC50 πουλιά acute >2250 mg/kg bw; LC50 short-term πουλιά >5620 mg/kg diet). Αντίθετα είναι πολύ τοξικό στους υδρόβιους οργανισμούς όπως είναι ξεκάθαρο και από τους ιδιαίτερα χαμηλούς δείκτες τοξικότητας σε οργανισμούς δείκτες (EC50 *Daphnia magna* = 0.81 mg/l, NOEC 21 days *D. magna* = 0.084 mg/l; LC50 rainbow trout = 0.55 mg/l; EC50 algae (96h) 9.0 mg/l) (EC, 2001)

ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ	
Όνομασία	: Thiabendazole (TBZ)
Χημικός τύπος	: C ₁₀ H ₇ N ₃ S
Μοριακό βάρος	: 201.249 g/mol
	

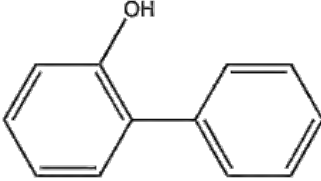
1.3.3 Ortho-phenylphenol (OPP)

Το ortho-phenylphenol (OPP) ή 2-phenylphenol C₁₂H₁₀O είναι ένα μυκητοκτόνο με εφαρμογές, μεταξύ άλλων, στον τομέα της γεωργίας για τον έλεγχο των μυκήτων και των βακτηρίων που εμφανίζονται σε αποθηκευμένες

καλλιέργειες, όπως τα φρούτα κυρίως αχλάδια, τα εσπεριδοειδή (US EPA, 2006) και τα λαχανικά. Εφαρμόζεται με εμβάπτιση και ψεκασμό.

Το OPP είναι πτητικό και έχει περιορισμένη διαλυτότητα στο νερό, ενώ αποικοδομείται μέσα σε λίγες ώρες έως εβδομάδες στο περιβάλλον (US EPA, 2006).

Θεωρείται ιδιαίτερος τοξικό για τους υδρόβιους οργανισμούς (EFSA 2008) και λόγω της εκτεταμένης χρήσης του έχουν ανιχνευθεί συχνά υπολείμματα του σε επιφανειακά υδροφόρα συστήματα (Jonkers et al. 2010).

ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ	
Όνομασία	: Ortho-phenylphenol (OPP)
Χημικός τύπος	: $C_{12}H_{10}O$
Μοριακό βάρος	: 170.21 g/mol
	

1.3.4 Imazalil (IMZ)

Το Imazalil (IMZ) με χημικό τύπο $C_{14}H_{14}Cl_2N_2O$ είναι μυκητοκτόνο μετασυσπληκτικής χρήσης και εφαρμόζεται στα εσπεριδοειδή για τον έλεγχο του μύκητα *Penicillium digitatum* ο οποίος ευθύνεται για την εμφάνιση της πράσινης μούχλας (Eckert and Eaks, 1989).

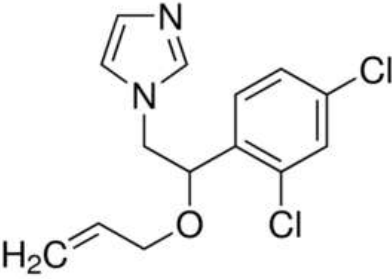
Η δράση του στηρίζεται στη αναστολή βιοσύνθεσης εργοστερόλης στους μύκητες. Εφαρμόζεται με εμβάπτιση, ψεκασμό ή ανάμειξη με κεριά σε υγρή μορφή. Σε κάποιες περιπτώσεις γίνεται συνδυασμός και των τριών μεθόδων όπου είναι δυνατή η διπλή ή και τριπλή εφαρμογή του IMZ.

Είναι διαθέσιμο σε δύο μορφές, σε θειικό άλας το οποίο είναι σε μορφή κόκκων ή σκόνης, έχει χαμηλό pH και παρουσιάζει υψηλή διαλυτότητα στο

νερό (Pelser & La Grange, 1981) και σε γαλακτωματοποιήσιμο συμπύκνωμα IMZ (EK) με ουδέτερο pH και περιορισμένη διαλυτότητα στο νερό.

Είναι πολύ σταθερό στην υδρόλυση, αποδομείται πολύ αργά στο έδαφος κάτω από αερόβιες συνθήκες, δεν είναι ιδιαίτερα κινητικό στο έδαφος λόγω της ισχυρής προσρόφησης του στα κolloειδή του εδάφους (EC 2009) .

Το Imazalil παρουσιάζει σχετικά χαμηλή τοξικότητα σε οργανισμούς σε θηλαστικά και πτηνά ενώ είναι ιδιαίτερα τοξικό στους υδρόβιους οργανισμούς (EC 2009).

ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ	
Όνομασία	: Imazalil (IMZ)
Χημικός τύπος	: C ₁₄ H ₁₄ Cl ₂ N ₂ O
Μοριακό βάρος	: 297.20 g/mol
	

1.4 ETHOXYQUIN (EQ)

1.4.1 Χρήσεις του Ethoxyquin

Το ethoxyquin (EQ), (6-Ethoxy-2,2,4-trimethyl-1,2-dihydroquinoline), με χημικό τύπο C₁₄H₁₉NO, χρησιμοποιείται ως αντιοξειδωτικό για τον έλεγχο της εμφάνισης επιφανειακών κηλίδων-εγκαυμάτων κυρίως στα αχλάδια, κατά το μετασυλλεκτικό στάδιο και την αποθήκευσή τους.

Το EQ αναπτύχθηκε από την Monsanto και έχει καταχωρηθεί από το 1965 ως γεωργικό φάρμακο με αντιοξειδωτική δράση για την αντιμετώπιση των εγκαυμάτων στα αχλάδια. Σύμφωνα με την αμερικάνικη Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων FDA έχει δοθεί η έγκριση για τη χρήση του ως

συντηρητικό σε ζωοτροφές, αφυδατωμένα καλλιέργειες και το σόργο, καθώς και ως αντιοξειδωτικό για την διατήρηση του χρώματος στην παραγωγή διαφόρων μπαχαρικών (τσίλι σε σκόνη, πάπρικα).

Εφαρμόζεται μετά τη συγκομιδή με ψεκασμό & διαβροχή, ως εμποτισμένο περιτύλιγμα, ή ακόμα και ως συνδυασμός αυτών των μεθόδων. Στην ΕΕ οι οριακές τιμές υπολειμμάτων του EQ είναι 3 mg/ kg για τα αχλάδια και 0,05 mg/ kg για τα μήλα. Από το 2012 και μετά το EQ δεν έχει έγκριση χρήσης στη ΕΕ ως αντιοξειδωτικό στα συσκευαστήρια φρούτων.

Το EQ παρουσιάζει χαμηλή έως μέτρια τοξικότητα (κατηγορία III & IV) και ελάχιστο ερεθισμό στο δέρμα που ενδέχεται να οδηγήσει σε δερματίτιδα μετά από εκτεταμένη επαφή. Σύμφωνα με έρευνες δεν υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι σχετίζεται με την εμφάνιση καρκίνου αν και διατυπώθηκε πιθανή καρκινογόνος δράση του ethoxyquin στη μελέτη του Manson et al (1987).

Το EQ μεταβολίζεται σε διάφορα προϊόντα μεταβολισμού μετά την εφαρμογή του (αναφέρονται παρακάτω). Τα προϊόντα μεταβολισμού του EQ παρουσιάζουν συνήθως εξίσου υψηλή αντιοξειδωτική δράση ενώ εμφανίζουν και παρόμοια οξεία τοξικότητα in vitro και in vivo με το EQ (Baszczyk et al. 2013) . Το EQ εμφανίζει ιδιαίτερα υψηλή οξεία τοξικότητα για τους υδρόβιους οργανισμούς (EFSA 2010) και για το λόγο αυτό θα πρέπει να αποφεύγεται η έκθεση των υδροφόρων συστημάτων στο EQ και στους μεταβολίτες του.

Η λειτουργία του EQ βασίζεται στην ικανότητά του να δεσμεύει τις ελεύθερες ρίζες που σχηματίζονται κατά την οξείδωση των λιπιδίων (Rossing et al., 1985, Thorisson et al., 1992).

Ελάχιστα είναι σήμερα γνωστά για την περιβαλλοντική συμπεριφορά και τύχη του EQ. Αυτό οφείλεται στο ότι η χρήση του κυρίως πραγματοποιείται σε κλειστούς χώρους (συσκευαστήρια φρούτων) ή σε διάφορα ζωικά προϊόντα και τροφές. Έτσι πληροφορίες για τον μεταβολισμό του και την υπολειμματικότητα του υπάρχουν μόνο σε φυτικούς και ζωικούς ιστούς ενώ καμία πληροφορία δεν είναι διαθέσιμη σήμερα για την υπολειμματικότητα και το μεταβολισμό του στο έδαφος, σε συστήματα βιοκλινών αλλά και σε συστήματα επεξεργασίας αστικών αποβλήτων όπου απορρίπτονται συνήθως σήμερα τα απόβλητα από τα συσκευαστήρια φρούτων. Στην μοναδική μελέτη που έχει γίνει μέχρι σήμερα οι Shah et al. (2005) έδειξαν ότι το EQ παρουσίασε υψηλή υπολειμματικότητα σε πιλοτικά συστήματα βιολογικής

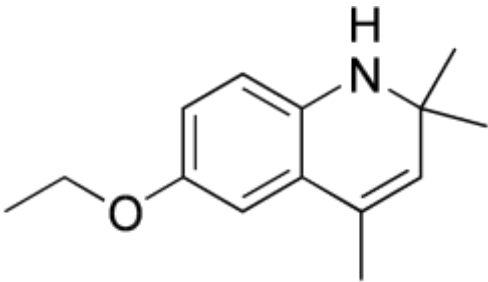
επεξεργασίας υγρών αποβλήτων τόσο υπό αερόβιες όσο και υπό αναερόβιες συνθήκες.

1.4.2. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του EQ

Το EQ είναι ένα σκούρο παχύρευστο υγρό ενώ ποικίλει στο χρώμα από κίτρινο έως σκούρο καφέ. Το χρώμα φέρεται να είναι ανεξάρτητο της αντιοξειδωτικής ή βιολογικής δραστηριότητας της χημικής ουσίας.

Χρησιμοποιείται ως αντιοξειδωτικό σε ζωοτροφές και ως μυκητοκτόνο σε φρούτα μετά τη συγκομιδή.

Πολυμερίζεται και σκουραίνει το χρώμα του κατά την έκθεση στο φως και τον αέρα ενώ είναι αδιάλυτο στο νερό. Δεν είναι συμβατό με οξειδωτικούς παράγοντες και με ισχυρά οξέα και είναι αρκετά εύφλεκτο.

ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ	
Όνομασία	: Ethoxyquin (EQ)
Χημικός τύπος	: C ₁₄ H ₁₉ NO
Μοριακό βάρος	: 217.31 g/mol
Σημείο βρασμού	: 125 ° C σε 1-2 mm Hg
Ειδικό βάρος	: 1,028 - 1,032
	

1.4.3 Προϊόντα μεταβολισμού του Ethoxyquin

Ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά του EQ που το καθιστά τόσο καλό αντιοξειδωτικό είναι ότι ορισμένα από τα προϊόντα οξείδωσης του κατέχουν επίσης κάποιες αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Κάποια από τα προϊόντα οξείδωσης του EQ είναι τα:

- 2,4-Dimethyl-6-ethoxyquinoline
- 1,2-dihydro-6-ethoxy-2,2,4-trimethylquinoline nitroxide
- 2,6-dihydro-2,2,4-trimethyl-6-quinone imine N-oxide
- 6-dihydro-2,2,4-trimethyl-6-quinone imine
- 1,8 -di(1,2-dihydro-6-ethoxy-2,2,4-trimethylquinoline)
- 1,2-dihydro-6-hydroxy-2,2,4-trimethylquinoline

1.5. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη του μεταβολισμού του ethoxyquin (EQ), στους δύο κύριους μεταβολίτες του, 2,4-Dimethyl-6-ethoxyquinoline και 6-dihydro-2,2,4-trimethyl-6-quinone imine στο έδαφος αλλά και σε βιομίγματα που χρησιμοποιούνται ως πληρωτικά υλικά σε βιοκλίνες. Για το λόγο αυτό, αρχικά συντέθηκαν στο Εργ. Βιοργανικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας τα δύο προϊόντα μεταβολισμού του EQ και στην συνέχεια, αφού ταυτοποιήθηκαν με την μέθοδο της φασματοσκοπίας NMR, χρησιμοποιήθηκαν ως πρότυπα για την ανάπτυξη μεθόδου ανάλυσης σε σύστημα HPLC ώστε να μελετηθεί ο μεταβολισμός της μητρικής ουσίας στο έδαφος και σε διάφορα βιομίγματα με προοπτική χρήσης σε συστήματα βιοκλινών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. ΣΥΝΘΕΣΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΕQ

2.1.1. Υλικά

Για την παρασκευή των 2,4-Dimethyl-6-ethoxyquinoline και 6-dihydro-2,2,4-trimethyl-6-quinone imine στο εργαστήριο χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω:

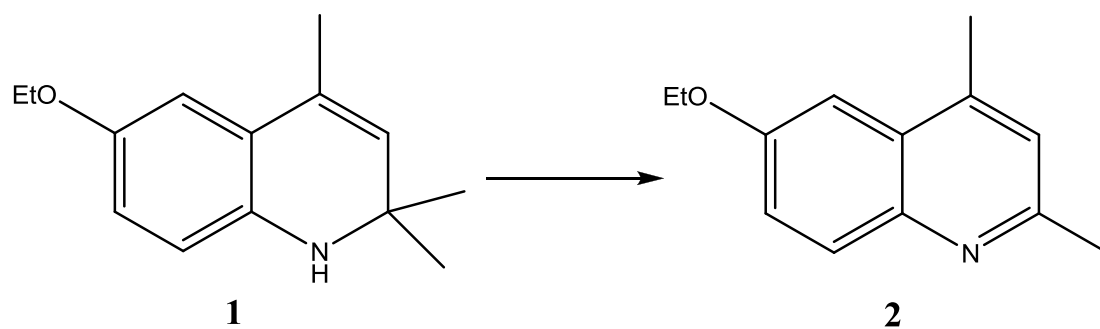
1. Ethoxyquin standard > 90%
2. Ξυλόλιο
3. Πετρελαϊκός αιθέρας
4. Αιθανόλη
5. CH₂Cl₂
6. Ισοπροπανόλη
7. HPLC
8. HCl
9. NaOH
10. Θειικό νάτριο
11. t- βουτυλοϋδροϋπεροξειδίο
12. Εξαένυδρο αμμώνιο θειικού σιδήρου

ενώ τα προϊόντα της σύνθεσης ταυτοποιήθηκαν με τη φασματοσκοπία NMR.

2.1.2. Σύνθεση του μεταβολίτη 2,4-Dimethyl-6-ethoxyquinoline (2)

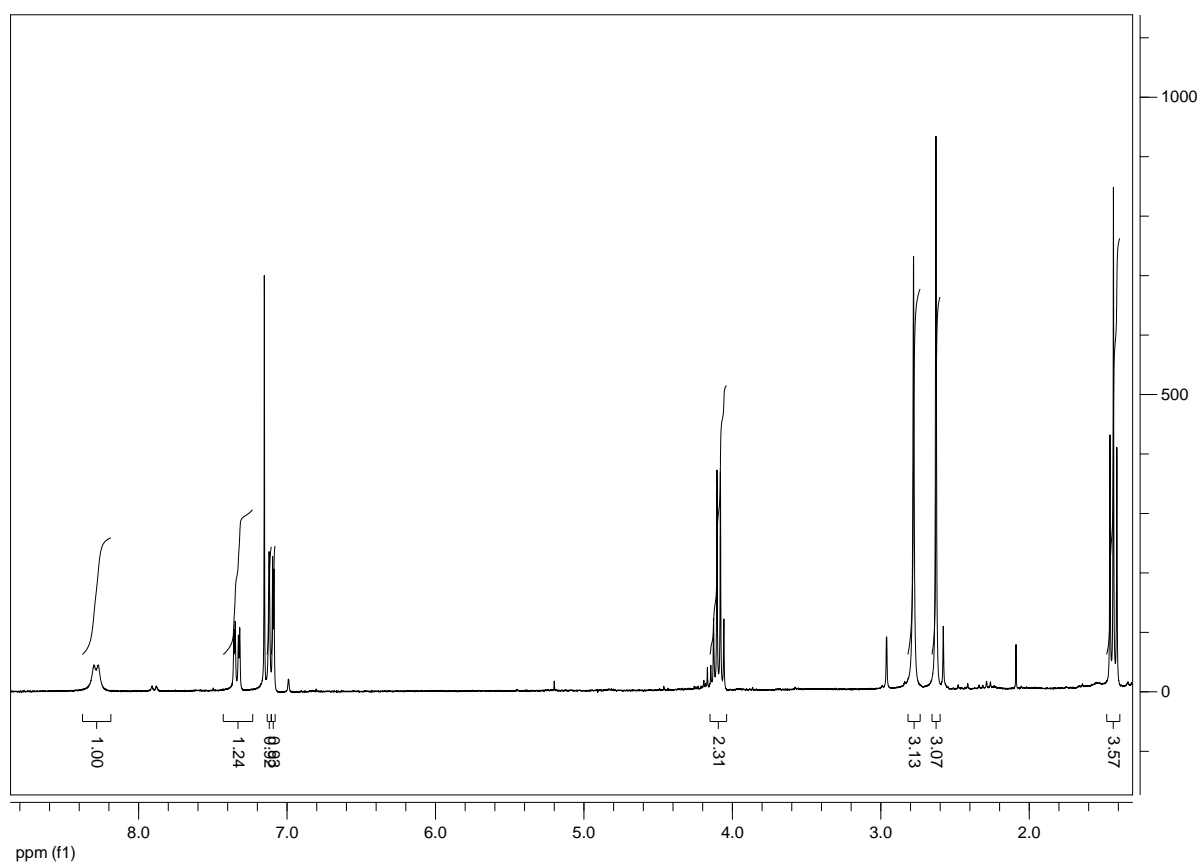
Οξυγόνο διοχετεύθηκε για 18 ώρες σε ένα θερμαινόμενο διάλυμα της εμπορικά διαθέσιμης αιθοξικινίνης (7,1 g) σε ξυλόλιο (100 ml). Το μίγμα της αντίδρασης ψύχθηκε, οξινίστηκε (HCl, 1 M, 200 ml) και εκχυλίστηκε με χλωροφόρμιο (100 ml). Το όξινο υδατικό στρώμα κατέστη αλκαλικό (NaOH) και το παράγωγο κινολίνης ανακτήθηκε με εκχύλιση με χλωροφόρμιο (2x100 ml). Καθαρίστηκε με κρυστάλλωση από πετρελαϊκό αιθέρα και έδωσε μία μόνο κηλίδα στο TLC σε απόδοση 60%.

Αντίδραση



¹H NMR spectrum: 1.38 (3H, t, J 7.5 Hz, CH₂CH₃), 2.39 (3H, s, CH₃), 2.60 (3H, s, CH₃), 4.00 (2H, q, J 7.5 Hz, -CH₂-), 6.97 (1H, s, C(3) H), 7.02 (1H, d, J 3 Hz, C(5) H), 7.35 (1H, dd, J 3 and 11 Hz, C(7)H) and 8.01 ppm (1 H, d, J 11 Hz, C(8)H)

¹H NMR ΕΝΩΣΗΣ 2,4-Dimethyl-6-ethoxyquinoline



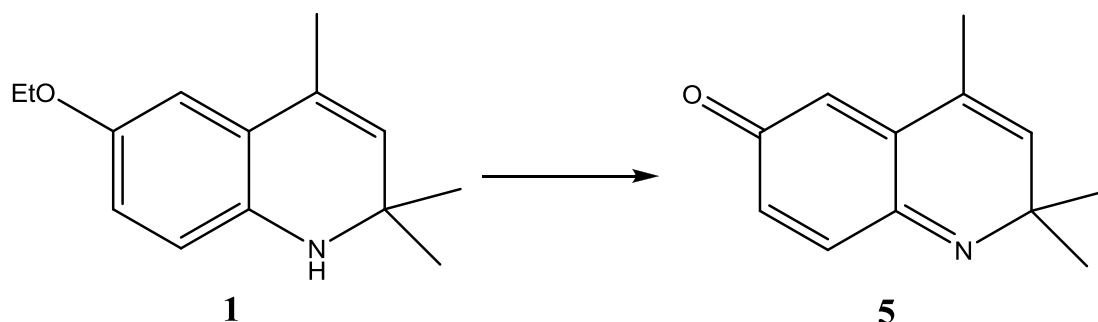
¹H NMR ΕΝΩΣΗΣ 2,4-Dimethyl-6-ethoxyquinoline

2.1.3. Σύνθεση του μεταβολίτη 6-dihydro-2,2,4-trimethyl-6-quinone imine (5)

Σε ένα διάλυμα ethoxyquin (0,49 g) σε αιθανόλη (50 ml) προστέθηκε πρώτα μια ισομοριακή ποσότητα του t-βουτυλυδροϋπεροξειδίου (t-butylhydroperoxide 70%, 0,31 ml) και ακολούθως υδατικό αμμώνιο θεικού σιδήρου (0,88 g σε 20 ml). Το μίγμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 26 ώρες, οξινίστηκε (HCl 1M, 1ml), και εκχυλίστηκε με CH₂Cl₂.

Στη συνέχεια η οργανική φάση κατέστη βασική με προσθήκη NaOH. Αφού ξηράθηκε (Na₂SO₄) και απομακρύνθηκε ο διαλύτης, το επιθυμητό προϊόν λήφθηκε ως πορτοκαλόχρουν έλαιο σε απόδοση 52%.

Αντίδραση



¹H NMR spectrum : 1.40 (6H, s, (CH₃)₂), 1.98 (3H, d, *J* 2Hz, CH₃), 6.32 (1H, m, C(3)H), 6.45 (1H, m, C(5) H), 6.62 (1H, dd, *J* 2.5 and 12.5 Hz, C(7) H) and 7.17 ppm (1H, d, *J* 12.5 Hz, C(8)H).

2.2. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΟΥ EQ ΚΑΙ ΤΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΤΟΥ ΣΕ ΒΙΟΜΙΓΜΑΤΑ ΜΕ ΣΥΣΤΗΜΑ ΗPLC

Για τη μελέτη, την παρακολούθηση και τις μετρήσεις των συγκεντρώσεων τόσο του EQ όσο και των δύο μεταβολιτών του στα βιομίγματα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος εκχύλισης QUECHERS και ακολούθως τα εκχυλίσματα εγχύθηκαν σε σύστημα HPLC (High-performance liquid chromatography) με ανιχνευτή UV.

Για την εκχύλιση του EQ και των μεταβολιτών του από τα διάφορα υποστρώματα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος QUECHERS όπως παρουσιάστηκε από τους *Anastassiades et al* (2003) με κάποιες προσαρμογές. Αυτή η διαδικασία χρησιμοποιεί μια απλή εκχύλιση σε ακετονιτρίλιο και απαιτεί μια πολύ μικρή ποσότητα του δείγματος.

2.2.1. Υλικά και εργαστηριακά όργανα που χρησιμοποιήθηκαν

- Έδαφος που συλλέχθηκε από αγρό της περιοχής Λάρισας
- Απεσταγμένο νερό
- Ακετονιτρίλιο ACN
- MgSO₄
- NaCl
- trisodium citrate dihydrate
- PSA
- Ηλεκτρονική ζυγαριά ακριβείας
- Vortex
- Συσκευή φυγοκέντρωσης
- Προχοΐδα 10 ml
- Πιπέτες 1 ml και 5 ml
- Κωνικές φιάλες 50 ml
- Ογκομετρικός κύλινδρος 500 ml

- Χωνιά διηθήσεως
- Σωλήνες φυγοκέντρησης falcon
- Σωλήνες errendorf

2.2.2. Διαδικασία Εκχύλισης

Ζυγίζουμε 5 g εδάφους, τα αναμιγνύουμε με 5 ml απεσταγμένο νερό και κάνουμε μία πολύ σύντομη ανάδευση σε vortex. Προσθέτουμε 10 ml ακετονιτρίλιο και ξανακάνουμε ανάδευση σε vortex για ένα λεπτό.

Μετά την ανάδευση προσθέτουμε μίγμα αλάτων που αποτελείται από:

4 g $MgSO_4$

1 g NaCl

1,5 g trisodium citrate dihydrate (Εικόνα 8).



Εικόνα 8: Ζύγιση αντιδραστηρίων σε ηλεκτρονικό ζυγό

Με την προσθήκη των αλάτων αναπτύσσεται υψηλή θερμοκρασία γι' αυτό χρησιμοποιούμε πάγο ώστε να ψυχθεί το δείγμα μας. Στη συνέχεια κάνουμε πάλι ανάδευση σε vortex για ένα λεπτό με ένα δείγμα κάθε φορά και φυγοκεντρούμε τα δείγματα για 5 min (Εικόνα 9).



Εικόνα 9: Τοποθέτηση σωλήνων στη συσκευή φυγοκέντρησης

Μετά τη φυγοκέντρηση παραλαμβάνουμε με πιπέτα 1 ml από το υπερκείμενο του κάθε σωλήνα φυγοκέντρησης και το μεταφέρουμε σε σωλήνα errendorf που περιέχει 150 mg $MgSO_4$ και 25 mg PSA. Ακολουθεί νέα φυγοκέντρηση για 5 min σε 3000 rpm και το υπερκείμενο διηθείται μέσω φίλτρου σύριγγας. Το φιλτραρισμένο πλέον δείγματα χρησιμοποιήθηκε για προσδιορισμό των υπολειμμάτων του EQ και των δύο προϊόντων μεταβολισμού σε σύστημα HPLC-UV όπως περιγράφεται παρακάτω.

2.2.3 Προσδιορισμός των υπολειμμάτων του EQ και των μεταβολιτών του σε σύστημα HPLC-UV

Ο προσδιορισμός του EQ και των μεταβολιτών του πραγματοποιήθηκε σε σύστημα HPLC Marathon III, με UV ανιχνευτή και στήλη C18 GraceSmart (4.6 mm x 150mm, 5 μ m). Πιο συγκεκριμένα για τον διαχωρισμό του EQ και των μεταβολιτών του χρησιμοποιήθηκε κινητή φάση ακετονιτρίλιο και H_2O σε αναλογία 60:40 και 1% αμμωνία, με ροή 1 ml/min. Ανίχνευση του EQ και των μεταβολιτών του πραγματοποιήθηκε στα 254 nm.

Δοκιμές ανάκτησης σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων 1, 10 και 50 μ g/g πραγματοποιήθηκαν τόσο σε έδαφος όσο και στα ανάλογα βιομίγματα όπως

παρουσιάζονται στον Πίνακα 1 με την μέθοδο QUECHERS και τις παραπάνω συνθήκες χρωματογραφικής ανάλυσης. Για το έδαφος τα επίπεδα ανάκτησης στο έδαφος ήταν 73, 70.3 και 71.6% για τις συγκεντρώσεις 50, 10 και 1 µg/g. Στα διάφορα βιομίγματα τα επίπεδα ανάκτησης για το EQ και τους μεταβολίτες του ήταν αντίστοιχα 80, 84 και 98%.

2.3. ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΣΤΑ ΟΠΟΙΑ ΕΞΕΤΑΣΤΗΚΕ Η ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ ΤΟΥ EQ

Τα οργανικά υποστρώματα στα οποία εφαρμόστηκε το ethoxyquin αποτελούνταν από έδαφος (soil), άχυρο (straw) και εξαντλημένο υπόστρωμα καλλιέργειας μανιταριών (sms-Spent Mushroom Substrate) και τα οποία αναμίχθηκαν σε διάφορες ογκομετρικές αναλογίες. Το SMS αποτελείται από παστεριωμένο άχυρο το οποίο εμβολιάστηκε με σπόρια του εδώδιμου μύκητα *Pleurotus ostreatus* και το οποίο είναι άχρηστο στους καλλιεργητές μανιταριών μετά τη συγκομιδή. Έτσι η χρήση του στα βιομίγματα αποτελεί μια ενδεδειγμένη λύση τόσο από άποψης αποτελεσματικότητας όπως έχουν δείξει παλαιότερες μελέτες όσο και από άποψης αξιοποίησης των αποβλήτων από μεταποιητικές αγροτικές βιομηχανίες. Τα οργανικά υποστρώματα στα οποία αξιολογήθηκε η αποδόμηση του EQ και τα φυσικοχημικά τους χαρακτηριστικά των παραπάνω υλικών και των βιομιγμάτων που προέκυψαν από την ανάμιξη τους σε διάφορες ογκομετρικές αναλογίες παρουσιάζονται στο παρακάτω Πίνακα 1

Πίνακας 1. Τα υποστρώματα στα οποία αξιολογήθηκε η αποδόμηση του EQ

Υλικά	pH	Οργανικός C (%)	Συνολικό N (%)	Λόγος C/N
Έδαφος	7.55	1.05	0.13	8.1
Άχυρο	7.15	79.2	0.81	97.8
SMS	6.83	71.0	1.2	59.2
SMS/Soil (50:50%)	7.2	36.0	0.7	33.6
SMS/Straw/Soil (50:25:25)	7.1	55.6	0.8	56.0
Straw/Soil (50:50)	7.4	40.1	0.5	52.9
Straw/SMS/Soil (50:25:25)	7.2	57.6	0.7	65.7

2.4 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΠΟΔΟΜΗΣΗΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΤΟΥ EQ

Η αποδόμηση του EQ μελετήθηκε στο έδαφος και στα παρακάτω οργανικά υποστρώματα με προοπτική χρήσης ως πληρωτικά υλικά σε συστήματα βιοκλινών. Soil+SMS (50:50), SMS+Straw+Soil (50:25:25), Straw+Soil (50:50) and Straw+SMS+Soil (50:25:25) (κατ'όγκο). Για κάθε υπόστρωμα ένα ομογενοποιημένο δείγμα των 1000 g ξ.β. διαχωρίστηκε σε 27 υποδείγματα των 30 g. Σε καθένα από αυτά πραγματοποιήθηκε εφαρμογή EQ με την μορφή υδατικού διαλύματος της συγκεκριμένης ουσίας που προετοιμάστηκε από εμπορικό σκεύασμα XEDAQUINE® 50% EC σκοπεύοντας σε τελική συγκέντρωση ίση με 35 mg/kg ξ.β. στο έδαφος και στα βιομίγματα. Η επιλογή της συγκεκριμένης δόσης υπολογίστηκε με βάση ένα ρεαλιστικό σενάριο όπου μια βιοκλίνη έκτασης 30 m³ δέχεται ετησίως απόβλητα συνολικού όγκου 22 m³ που περιέχουν συγκεντρώσεις EQ που κυμαίνονται από 10-15 mg L⁻¹. Αμέσως μετά την εφαρμογή του EQ τα δείγματα αναμίχθηκαν με το χέρι και η υγρασία προσαρμόστηκε στο 50% της υδατοχωρητικότητας με προσθήκη κατάλληλων ποσοτήτων νερού όπου απαιτούνταν. Όλα τα δείγματα στην συνέχεια επώαστηκαν στο σκοτάδι στους

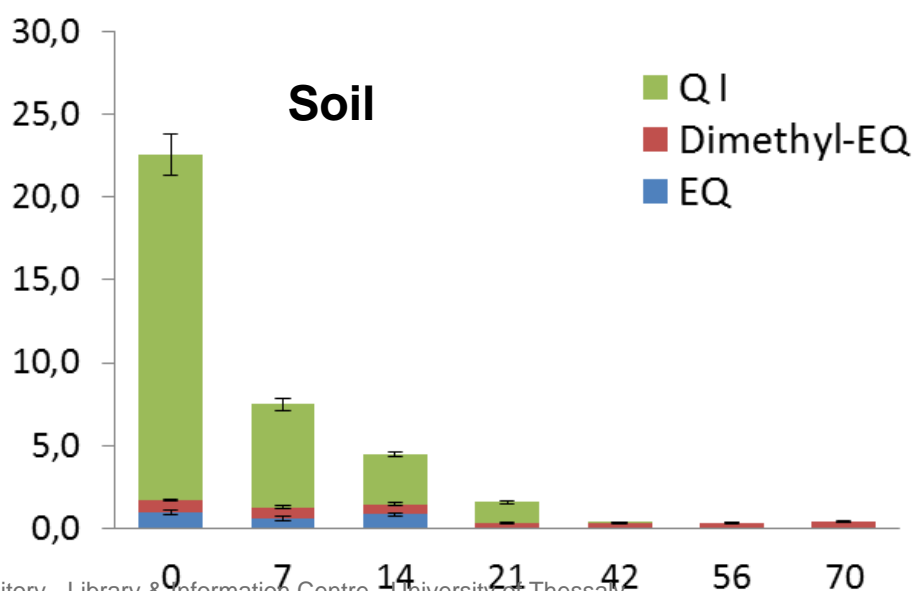
25°C για διάστημα 70 ημερών. Η υγρασία των δειγμάτων διατηρήθηκε σταθερή καθόλη την διάρκεια του πειράματος με συχνή προσθήκη νερού όπου χρειαζόταν. Αμέσως μετά την εφαρμογή του EQ και σε τακτά χρονικά διαστήματα τρία δείγματα από κάθε υπόστρωμα απομακρύνονταν από την επώαση και αποθηκεύονταν στους -20°C μέχρι να αναλυθούν για υπολείμματα EQ και των δύο μεταβολικών προϊόντων του.

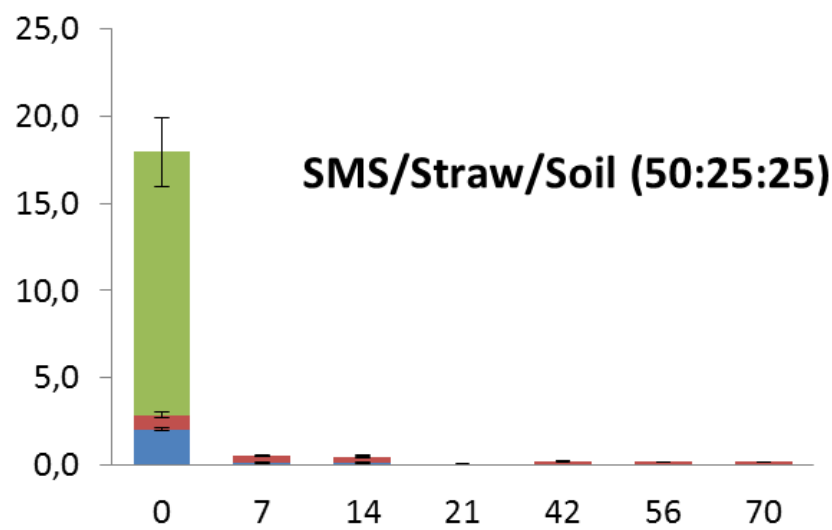
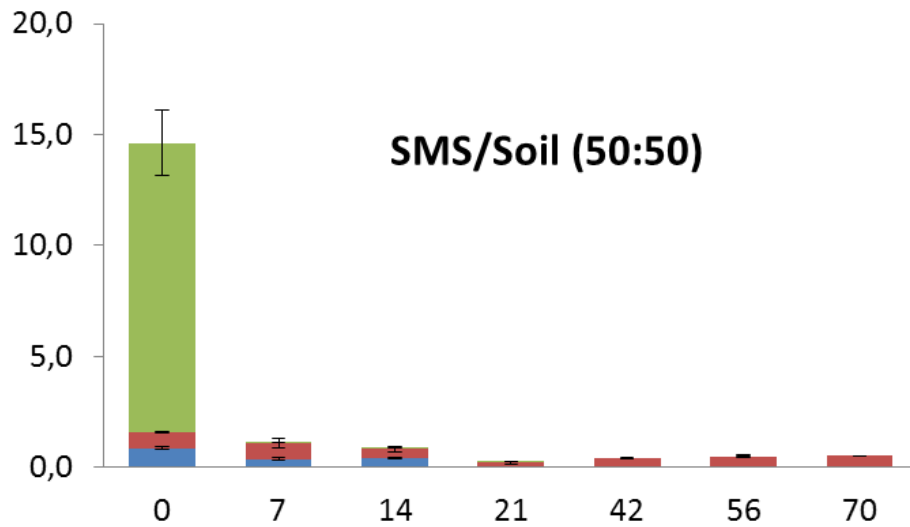
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΑ: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ EQ

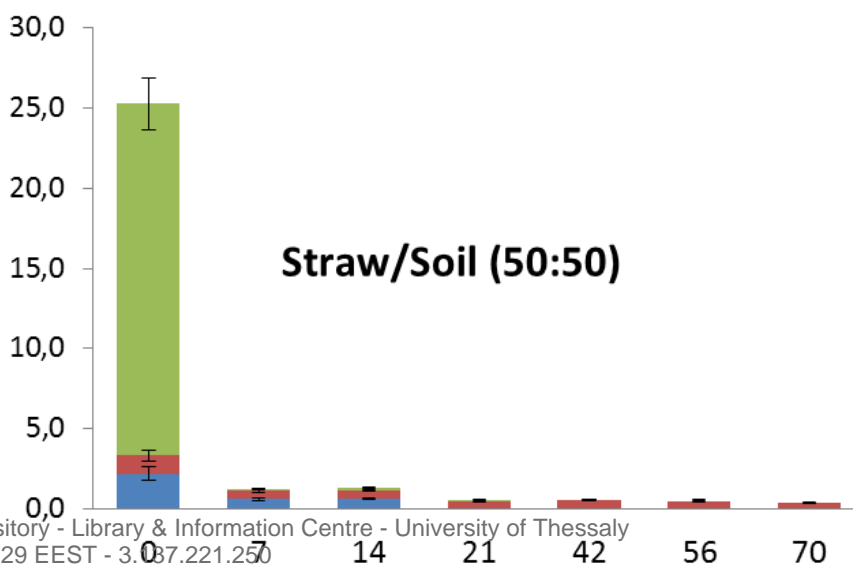
Στο Διάγραμμα 1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα αποδόμησης του EQ και σχηματισμού των δύο προϊόντων μεταβολισμού του, 6-dihydro-2,2,4-trimethyl-6-quinone imine (QI) και 2,4-Dimethyl-6-ethoxyquinoline (Dimethyl-EQ) στα διάφορα υποστρώματα στο πείραμα των 70 ημερών. Από τα παραπάνω αποτελέσματα είναι φανερό ότι η αποδόμηση του EQ προχώρησε με βραδύτερους ρυθμούς στο έδαφος από ότι στα διάφορα βιομίγματα όπου στις 7 ημέρες είχε ολοκληρωθεί η αποδόμηση >95% της αρχικής συγκέντρωσης του EQ και των μεταβολιτών (T0 ημέρες) σε αντίθεση με το έδαφος όπου οι αντίστοιχη τιμή αποδόμησης ήταν 65%. Συνολικά υπολείμματα του EQ δεν ανιχνεύθηκαν στα διάφορα υποστρώματα από τις 14 ημέρες και μετά ενώ σε κάποια από αυτά υπολείμματα του EQ δεν ήταν ανιχνεύσιμα ούτε στις 7 ημέρες (SMS/Straw/Soil και Straw/SMS/Soil).

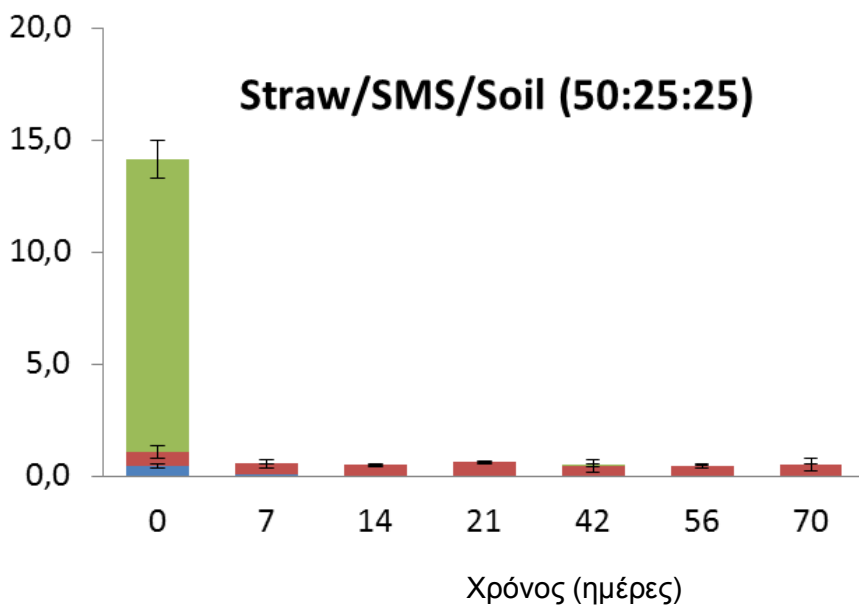
Το EQ αμέσως μετά την εφαρμογή του μετατράπηκε σε μεγάλο ποσοστό σε QI το οποίο και αποτέλεσε το κύριο μεταβολικό προϊόν στο έδαφος μέχρι τις 21 ημέρες. Η άμεση μετατροπή του EQ σε QI είναι εμφανής ακόμη και στον χρόνο 0 όπου το QI αποτελεί το >80% των συνολικών υπολειμμάτων (EQ+QI+Dimethyl-EQ). Θα πρέπει να τονιστεί ότι αυτή η παρατήρηση δεν αποτελεί έκπληξη καθώς μεταξύ της εφαρμογής του EQ και της λήψης του δείγματος χρόνου 0 μεσολάβησαν 2 ώρες το μέγιστο, χρόνος ικανός για την μετατροπή του EQ σε QI.





Συγκέντρωση ΕQ και μεταβολιτών (mg/kg)





Διάγραμμα 1. Η αποδόμηση και μεταβολισμός του EQ στο έδαφος και στα διάφορα βιομίγματα σε διάστημα 70 ημερών. Κάθε δείγμα είναι το άθροισμα 3 επαναλήψεων + την τυπική απόκλιση

Όπως φαίνεται το QI αποτέλεσε τον κύριο μεταβολίτη του EQ το οποίο όμως δεν ήταν έμμοιο στα διάφορα υποστρώματα που αξιολογήθηκαν και αποδομήθηκε ταχύτατα, ειδικότερα στα διάφορα βιομίγματα όπου δεν ανιχνεύθηκε πέραν της δειγματολήψιας σε χρόνο 0. Αντίθετα στο έδαφος το QI διασπάστηκε με βραδύτερους ρυθμούς και υπολείμματα του ήταν ανιχνεύσιμα μέχρι και τις 21 ημέρες.

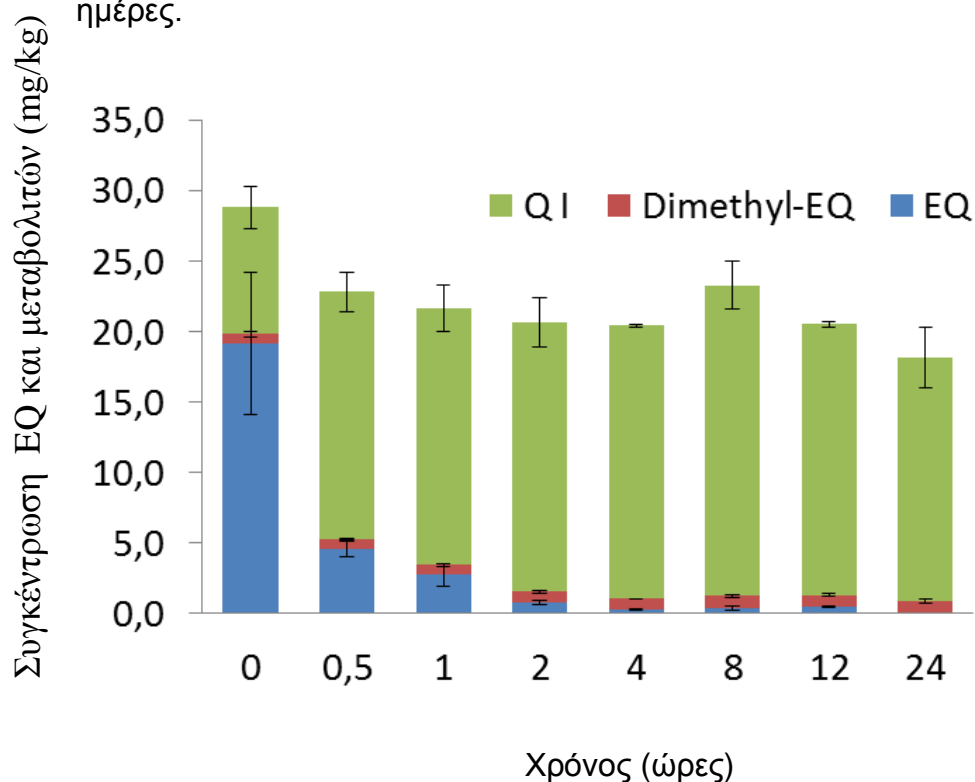
Τέλος ο έτερος μεταβολίτης, Dimethyl-EQ, σχηματίστηκε σε μικρές συγκεντρώσεις σε όλα τα υποστρώματα ακόμη και στο χρόνο 0 αλλά οι συγκεντρώσεις του παρέμεινα σταθερές σε όλα τα υποστρώματα μέχρι την ολοκλήρωση του πειράματος. Έτσι στα περισσότερα υποστρώματα που αξιολογήθηκαν το Dimethyl-EQ αποτέλεσε το μοναδικό ανιχνεύσιμο προϊόν στους τελευταίους χρόνους δειγματοληψίας (>21 ημέρες).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη αξιολογήθηκε η αποδόμηση και ο μεταβολισμός του EQ στο έδαφος, όπου σε αρκετές περιπτώσεις απορρίπτονται τα υγρά απόβλητα από τα συσκευαστήρια φρούτων, καθώς και σε διάφορα βιομίγματα που χρησιμοποιούνται ως πληρωτικά υλικά σε συστήματα βιοκλινών που δέχονται απόβλητα από τα συσκευαστήρια φρούτων με σκοπό την αποτοξικοποίηση τους. Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει καμία πληροφορία στην βιβλιογραφία για την αποδόμηση του EQ και τον μεταβολισμό του στο έδαφος αλλά και σε οργανικά υλικά όπως βιομίγματα. Στην μοναδική σχετική μελέτη παρατηρήθηκε ότι το EQ ήταν ιδιαίτερα ανθεκτικό σε συγκεντρώσεις 300 mg/L (υψηλότερες από αυτές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη) στην μικροβιακή αποδόμηση σε πιλοτικά συστήματα βιολογικής επεξεργασίας υγρών αποβλήτων τόσο υπό αερόβιες όσο και υπό αναερόβιες συνθήκες (Shah et al. 2005). Χωρίς όμως στην παραπάνω μελέτη να παρουσιάζονται αποτελέσματα από τον μεταβολισμό του EQ. Η παρούσα μελέτη παρέχει τις πρώτες πληροφορίες για την τύχη του EQ στο έδαφος αλλά και την ικανότητα διαφόρων βιομιγμάτων να διασπούν το EQ και τους μεταβολίτες τους προστατεύοντας τα φυσικά υδροφόρα συστήματα από ρύπανση και υποβάθμιση της οικολογικής τους και χημικής τους ποιότητας.

Από τα αποτελέσματα μας προέκυψε ότι το EQ είναι σχετικά ασταθές και μετατρέπεται άμεσα στο μεταβολίτη QI που σύμφωνα με την βιβλιογραφία κατέχει επίσης αντιοξειδωτική δράση (Błaszczuk et al., 2013). Η εμφάνιση του QI ως κύριου προϊόντος στα συνολικά υπολείμματα του EQ (EQ+QI+Dimethyl EQ) στο χρόνο μηδέν δείχνει ότι η μετατροπή του μητρικού προϊόντος σε QI πραγματοποιείται εντός 1-2 ωρών όσο ήταν και ο χρόνος που μεσολάβησε μεταξύ εφαρμογής του EQ και συλλογής του δείγματος για χρόνο 0. Η ταχύτατη αυτή μετατροπή αποδεικνύεται περαιτέρω από ακόλουθο πείραμα που πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο της διδακτορικής διατριβής του κ. Παναγιώτη Καρά στο εργαστήριο της Ερευνητικής Ομάδας Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος (Ενδεικτικά Διάγραμμα 2). Ο συγκεκριμένος μεταβολίτης QI έχει ανιχνευθεί τόσο σε φυτικούς όσο και ζωικούς ιστούς και

είναι η πρώτη φορά που ανιχνεύεται σε περιβαλλοντικά υποστρώματα ως κύριος μεταβολίτης του EQ (de Koning 2002). Το QI δεν παρουσίασε επίσης ιδιαίτερη υπολειμματικότητα και αποδομήθηκε ταχύτατα σε όλα τα βιομίγματα σε αντίθεση με το έδαφος όπου η αποδόμηση του ολοκληρώθηκε στις 21 ημέρες.



Διάγραμμα 2. Η αποδόμηση και μεταβολισμός του EQ στο έδαφος σε διάστημα 24 ωρών. Κάθε δείγμα είναι το άθροισμα 3 επαναλήψεων + την τυπική απόκλιση (Phd Διατριβή Παναγιώτη Καρά)

Εκτός του QI, σχηματίστηκε και ανιχνεύθηκε σε μικρές συγκεντρώσεις καθόλη την διάρκεια των πειραμάτων και σε όλα τα υποστρώματα ο μεταβολίτης Dimethyl-EQ. Ο συγκεκριμένος μεταβολίτης αποτέλεσε δευτερεύων προϊόν ο οποίος όμως παρουσίασε αξιοσημείωτη υπολειμματικότητα καθώς η συγκέντρωσή του που ανιχνεύθηκε στο χρόνο 0 στα διάφορα υποστρώματα δεν μεταβλήθηκε καθόλη την διάρκεια των 70 ημερών της επώασης. Ο συγκεκριμένος μεταβολίτης έχει επίσης ανιχνευθεί σε φυτικούς και ζωικούς ιστούς όπου έχει εφαρμοστεί EQ και παρουσιάζει επίσης αντιοξειδωτική δράση (Błaszczuk et al., 2013). Γενικότερα δεν παρατηρήθηκε ο σχηματισμός κανενός άλλου μεταβολικού προϊόντος του EQ συμπεριλαμβανομένου και

τους διμερούς του EQ που αποτελεί σημαντικό μεταβολικό προϊόν σε άλλα υποστρώματα (Błaszczuk et al. 2013).

Από τα υποστρώματα που αξιολογήθηκαν, το έδαφος παρουσίασε σημαντικά χαμηλότερη αποδομητική ικανότητα σε σχέση με τα βιομίγματα στα οποία παρατηρήθηκε μια καθολική σχεδόν αποδόμηση των συνολικών υπολειμμάτων του EQ + μεταβολίτες στις 7 ημέρες. Το αποτέλεσμα αυτό αποτελεί πρώτη απόδειξη ότι οι βιοκλίνες εμπλουτισμένες με κάποιο από τα βιομίγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη θα μπορούσαν να απομακρύνουν αποτελεσματικά το EQ και τους μεταβολίτες του από τα υγρά απόβλητα που θα διοχετευτούν σε αυτές.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ - ΑΝΑΦΟΡΕΣ

Arno Erasmusa, Cheryl L. Lennox^a, Hennie Jordaan^b, Joseph L. Smilanick^c, Keith Lesard, Paul H. Fourie^a,^D

Imazalil residue loading and green mould control in citrus packhouses

Baszczyk AB, Augustyniak A, Skolimowski J (2013) Ethoxyquin: An Antioxidant Used in Animal Feed. International Journal of Food Science, Article ID 585931, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/585931>

Castillo, M.d.P., Torstensson L., Stenstrom J., (2008) Biobeds for environmental protection from pesticides use – a review. Journal of Agricultural and Food Chemistry 56, 6206-6219

Csilla Muller, Leontin David, Vasile Chis, Simona Cinta Pinzaru
Detection of thiabendazole applied on citrus fruits and bananas using surface enhanced Raman scattering

David A. Rosenberger, Department of Plant Pathology, NY State Agric. Exp. Station, Cornell University
Fungicides, Biocides, and Sanitizers for Managing Postharvest Pathogens in Apples

De Koning, A.J. Ethoxyquin – A Note on its Refractive Index and some of its Spectral Data. Fat Science Technology, 1987, 89 ,103–106.

De Koning AJ (2002) The antioxidant ethoxyquin and its analogues. International Journal of Food Properties 5:451-461

D. R. Brannegan, Faculty of the Virginia Polytechnic, Institute and State University in Partial Fulfillment of the Requirements of the Degree of Master of Science in Chemistry, 2000. Analysis of ethoxyquin and its oxidation products using supercritical fluid extraction and high performance liquid chromatography with chemiluminescent nitrogen detection

European Commission (EC) (2000). Opinion of the scientific committee on plants regarding the evaluation of thiabendazole in the context of council directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market -The Scientific Committee on Plants, SCP/THIABEN/002-Final, p 7

European Commission (EC), 2009. Draft Assessment Report, Initial risk assessment provided by the rapporteur member state the Netherlands for the existing substance imazalil. Volume 1, pp. 1-151.

European Food Safety Authority (EFSA), (2010b). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance ethoxyquin. EFSA Journal, 8(9): 1710

European Food Safety Authority (EFSA), 2012. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance diphenylamine. EFSA J., 10 (1): 1426

European Commission (EC), 2001. Review report for the active substance thiabendazole finalised in the Standing Committee on Plant Health at its meeting on 12 December 2000 in view of the inclusion of thiabendazole in Annex I of Directive 91/414/EEC. 7603/VI/97-final.

European Food Safety Authority (EFSA), 2008. Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance 2-phenylphenol. EFSA Scientific Report, 217:1-67

Gabriela Calvo 2000. Antioxidant Use in Apple and Pear Storage,

Jonkers N., Sousa A., Galante-Oliveira S., Barroso C. M., Kohler H. P. E., Giger W., 2010. "Occurrence and sources of selected phenolic endocrine disruptors in Ria de Aveiro, Portugal". Environ. Sci. Pollut. Res., 17: 834-843

Karanasios E, Tsiropoulos N, Karpouzas D.G., Menkissoglu-Spiroudi U., (2010a) Novel biomixtures based on local Mediterranean ligninocellulosic materials: evaluation for use in biobeds. Chemosphere 80 (8): 914-921

Lindy Coates and Greg Johnson, Postharvest diseases of fruit and vegetables

Lundebye AK, Hove H, Måge A, Bohne VJ, Hamre K. Levels of synthetic antioxidants (ethoxyquin, butylated hydroxytoluene and butylated hydroxyanisole) in fish feed and commercially farmed fish.

Omirou M, Dalias P, Costa C, Papastefanou C, Dados A, Ehaliotis C and Karpouzas DG, (2012) Exploring the potential of biobeds for the depuration of pesticide-contaminated wastewaters from the citrus production chain: Laboratory, column and field studies. Environmental Pollution 166: 31-39.

Peter L. Sholberg and William S. Conway, Postharvest Pathology

Thorisson, S., Gunstone, F. D., and Hardy, R. (1992a). Some oxidation products of ethoxyquin including those found in autoxidising systems.

Ι. Παπαδογιάννης, Β. Σαμανίδου, Ενόργανη Χημική Ανάλυση, Θεσσαλονίκη (2000).

Ι.Α Στράτης, Α.Ν Βουλγαρόπουλος, Ι.Α. Ζαχαριάδης, Ποσοτική Χημική Ανάλυση, Θεσσαλονίκη 1999