

Anna Izydorczyk, Katarzyna Tomaszewska

e-mail: 244533@edu.p.lodz.pl; 244596@edu.p.lodz.pl

Instytut Chemii Ogólnej i Ekologicznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Łódzka

Fungicydy na skórkach owoców.

Cz. I. Źródła i analityka

Wprowadzenie

Na półkach sklepowych możemy dostrzec owoce cytrusowe oraz banany, wyglądające niezwykle pięknie, świeżo i błyszcząco pomimo faktu, że zanim znalazły się w sprzedaży w danym punkcie sklepowym musiały przebyć długą podróż, pokonać tysiące kilometrów leżąc zapewne nawet kilka tygodni w ładowniach statków, a następnie kolejne dni lub tygodnie spędziły w różnych magazynach dystrybutorów oraz hurtowniach. Najczęściej pochodzą one z upraw konwencjonalnych, czyli takich, na których możliwe jest stosowanie pestycydów i herbicydów. Kontrastem dla nich są owoce pochodzące z certyfikowanych upraw ekologicznych, które swoim wyglądem często nie dorównują owocom sklepowym, nie są ani tak ładne, ani się tak nie błyszczą, mimo że w smaku są równie znakomite. Cytrusy nie rosną w naszym klimacie i są transportowane z daleka. W związku z powyższym większość owoców cytrusowych trafiających na nasz rynek i do marketów jest zabezpieczana przed zepsuciem za pomocą substancji, które mogą być szkodliwe dla zdrowia. W naszej pracy przedmiotem rozważań będą jedne z owych substancji konserwujących – fungicydy.

Dlaczego zabezpieczamy owoce i warzywa fungicydami i konserwantami?

Czy skórka cytrusów jest niejadalna? Każdy pokarm, w tym owoce i warzywa, po pewnym czasie się psują, ponieważ różne drobnoustroje, takie jak bakterie i grzyby atakują je stwarzając sobie w nich wygodne „lokum”. W związku z tym zabezpieczamy żywność przed szybkim rozkładem. Można tego dokonać na kilka różnych sposobów – wykorzystujemy tutaj m.in. mrożenie, pasteryzację, liofilizację, suszenie, dodawanie różnych konserwantów i wiele innych metod. Jeżeli natomiast zawężamy zakres do świeżych owoców, których skórek nie spożywamy, takich jak np. banany, pomarańcze, mandarynki, cytryny, czy grejpfruty, możemy zaobserwować, że ich skórkę bardzo często pokrywa się woskami (które jednakże mogą wywołać w pewnych przypadkach reakcje alergiczne), w tym wosk pszczeli biały i żółty (E 901), wosk carnauba (E 903) oraz szelak (E 904), które

uszczelniają ją i zapobiegają odparowywaniu wody. Dodatkowo stosuje się także substancje zapobiegające rozwijaniu się grzybów, czyli fungicydy. W przypadku wymienionych powyżej owoców najpowszechniej używanymi fungicydami są imazalil i tiabendazol [1, 2].

Co to są fungicydy?

Zgodnie z definicją podawaną w *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* fungicydem nazywamy każdą substancję, preparat lub organizm, który jest przeznaczony do niszczenia lub kontrolowania wzrostu wszelkich grzybów podczas produkcji, przechowywania lub dystrybucji towaru rolnego bądź żywności, w sytuacjach zagrażających zdrowiu zwierząt bądź ludzi. Istnieje wiele chemicznych i biologicznych środków grzybobójczych, które hamują lub zabijają część ze znanych grzybowych patogenów roślin [3].

Źródła fungicydów

Istnieje kilka klasyfikacji fungicydów, m. in. w zależności od ich miejsca zastosowania, według ich składu chemicznego, czy mechanizmu molekularnego w celu informowania o optymalnym zastosowaniu i zapobieganiu oporności grzybów. W zależności od miejsca ich zastosowania wyróżnia się:

- fungicydy glebowe, które działają jako fumiganty glebowe lub wprowadzane są do systemu korzeni rośliny;
- fungicydy „dolistne” stosowane są na zielone części roślin, gdzie tworzą barierę ochronną;
- fungicydy stosowane na zebrane plony spożywcze lub nasiona.

Ze względu na skład chemiczny wyróżnia się następujące grupy fungicydów:

- fungicydy nieorganiczne na bazie siarki, miedzi i potasu. Najczęściej stosuje się je jako fungicydy na liście oraz w uprawach ekologicznych;
- fungicydy organiczne. Większość z nich ma niską toksyczność, ale kilka z nich zostało zakazanych i wycofanych;
- biofungicydy. Należą do nich naturalnie wytwarzane biochemikalia, np. ekstrahowane oleje i antybiotyki wytwarzane w procesie fermentacji. Są mało toksyczne



dla kręgowców, ale niekoniecznie bezpieczniejsze od fungicydów organicznych lub nieorganicznych [4-6].

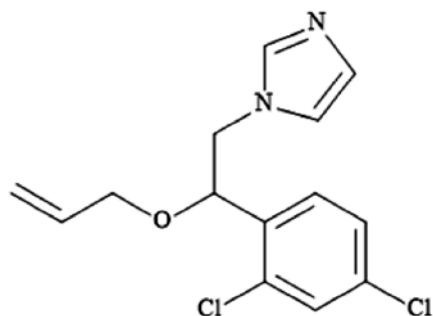
Fungicydy występujące na skórkach owoców

Zostały one dopuszczone do użytku wyłącznie na skórkach owoców, których skórki zazwyczaj nie zjadamy. Z drugiej strony, skórki cytrusów znajdują zastosowania jako dodatki do wypieków, do herbat czy lemoniady. Wszakże wymienione fungicydy obecne na powierzchni owoców są toksyczne dla człowieka i skórka każdego z nich potraktowana tymi fungicydami nie nadaje się zasadniczo do spożycia.

Fungicydy stosowane na cytrusach: imazalil i tiabendazol

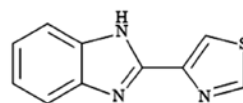
Cytrusy, takie jak pomarańcze, mandarynki, cytryny czy limonki są transportowane z daleka. W związku z tym, na ich skórkę nanoszone są różne konserwanty, takie jak fungicydy, które zapobiegają psuciu się cytrusów. Spośród nich najbardziej popularny jest imazalil. Zdecydowanie rzadziej stosuje się tiabendazol.

Imazalil (1-[2-alliloksy-2-(2,4-dichlorofenyl)etylo]imidazol) – o wzorze półstrukturalnym przedstawionym na rys. 1 – jest określany również jako enikonazol lub chloramizol. Stosuje się go szeroko w rolnictwie, szczególnie w uprawie owoców cytrusowych. Związek ten można również wykorzystywać w weterynarii jako miejscowy środek przeciwgrzybiczy [7, 8].



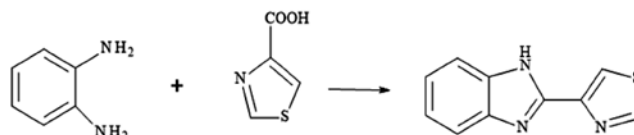
Rys. 1. Wzór półstrukturalny imazalilu
(1-[2-alliloksy-2-(2,4-dichlorofenyl)etylo]imidazolu)

Tiabendazol (4-(1H-benzimidazol-2-ilo)tiazol) – o wzorze półstrukturalnym przedstawionym na rys. 2 – jest związkiem organicznym będącym pochodną benzimidazolu i tiazolu. Stosuje się go jedynie powierzchniowo. Dopuszczalna dobową dawką dla człowieka wynosi 0,1 mg na kilogram masy ciała. Jeśli się jej nie przekracza to tiabendazol nie wykazuje szkodliwego wpływu na organizm, ponieważ ulega hydrolizie w wątrobie i jest wydalany przez nerki [6, 9, 10].



Rys. 2. Wzór półstrukturalny tiabendazolu
(4-(1H-benzimidazol-2-ilo)tiazolu)

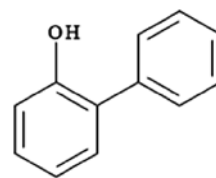
Tiabendazol, można wytworzyć na drodze heterocykliczacji. Zachodzi ona w reakcji o-fenilenodiaminy z kwasem 1,3-tiazol-4-karboksylowym przedstawionej na rys. 3 [11].



Rys. 3. Reakcja syntezy tiabendazolu
(4-(1H-benzimidazol-2-ilo)tiazolu)

Oprócz wymienionych przez nas najczęściej spotykanych fungicydów, można również znaleźć na skórkach owoców takie związki jak o-fenylfenol, pirymetanil czy prochloraz.

Pierwszy z nich przedstawiony na rys. 4, czyli **o-fenylfenol (2-fenylfenol)** pod względem budowy należy do monohydroksylowanych izomerów bifenylu. Jest to biocyd stosowany jako konserwant o numerze E231. Głównym zastosowaniem 2-fenylfenolu – rolniczego środka grzybobójczego – jest woskowanie owoców cytrusowych. Fungicyd ten nie jest dozwolonym dodatkiem do żywności w Unii Europejskiej, chociaż w 4 krajach członkowskich nadal jest dopuszczony do stosowania po zbiorach. O-fenylfenol otrzymuje się przez kondensację cykloheksanonu z utworzeniem cykloheksenylocykloheksanonu, który ulega odwodornieniu. W wyniku tej reakcji otrzymuje się 2-fenylfenol [12, 13].



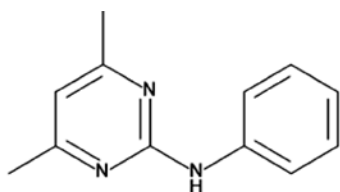
Rys. 4. Wzór półstrukturalny 2-fenylfenolu

Również sól sodowa 2-fenylfenolu znajduje zastosowanie jako fungicyd i środek przeciwbakteryjny do celów komercyjnych i konsumenckich. Przykładowo stosowany jest jako środek konserwujący i grzybobójczy w opakowaniach do żywności [14-16].

Pirymetanil (4,6-dimetylo-N-fenyl-pirymidyno-2-amina) przedstawiony na rys. 5 jest związkiem z grupy fungicydów, który należy do klasy aminopirymidyn, czyli pochodnych N-fenylpirymidyno-2-aminy. Stosuje się go do zwalczania

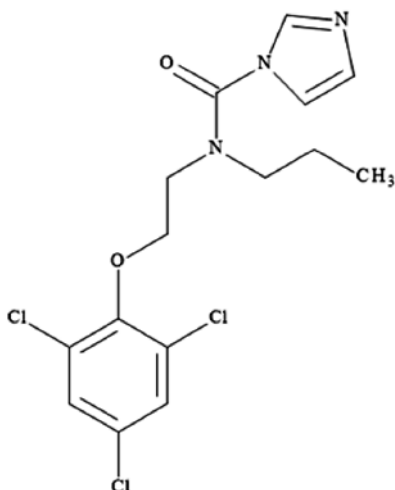
szarej pleśni na owocach, warzywach i roślinach ozdobnych, a także parcha liściowego na owocach ziarnkowych. Pełni rolę antagonisty receptora węglowodorów arylowych, zanieczyszczenia środowiska, ksenobiotyku i przeciwwgrzybiczego agrochemicznego środka chemicznego. Ma szerokie spektrum działania. Hamuje biosyntezę metioniny, przez co wpływa na tworzenie białek i późniejszy podział komórek [17, 18].

Same anilinopirymidyny są wysokoaktywnymi fungicydami przeciwko szerokiej gamie grzybów. Charakteryzują się one niską toksycznością. Zostały wprowadzone w latach 90. XX wieku po rozwinięciu się oporności grzybów na dikarboksimidy [19].



Rys. 5. Wzór półstrukturalny pirymetanolu
(4,6-dimetylo-N-fenyl-pirymidyno-2-aminy)

Prochloraz (N-propylo-N-[2-(2,4,6-trichlorofenoksy)etylo]imidazolo-1-karboksyamid) przedstawiony na rys. 6 – należy do fungicydów imidazolowych. Jest on szeroko stosowany w Europie, Australii, Azji i Ameryce Południowej w ogrodnictwie i rolnictwie do kontrolowania wzrostu grzybów [20, 21]. Jest inhibitorem enzymu niezbędnego do produkcji ergosterolu. Działa również jako antagonist receptorów androgenowych i estrogenowych, jako agonista receptora węglowodorów arylowych oraz jako inhibitor enzymów w szlaku steroidogenezy. Prochloraz jest środkiem grzybobójczym o szerokim spektrum ochronnym i leczniczym, który nie jest szczególnie selektywny w swoim działaniu [20, 22].



Rys. 6. Wzór półstrukturalny prochlorazu
(N-propylo-N-[2-(2,4,6-trichlorofenoksy)etylo]imidazolo-1-karboksyamidu)

Enancjoselektywność

Fungicydy używane w sektorze rolniczym, tak jak wiele innych substancji, są produkowane i sprzedawane bez różnicowania zawartości konkretnych enancjomerów. Może to prowadzić do nadużywania jednego lub drugiego enancjomeru i utrudniać ocenę ryzyka stosowania.

Badanie chińskich botaników z 2019 roku wzięło pod lupę aktywność biologiczną dwóch enancjomerów imazalilu: S-(+)-imazalilu i R-(-)-imazalilu, a także odpowiadającym im głównym metabolitom, oznaczonym jako S-(+)-imazalil-M i R-(-)-imazalil-M. Badanie to wykazało zwiększoną aktywność biologiczną S-(+)-imazalilu wobec siedmiu typowych patogenów roślinnych od 3,00 do 6,59 razy, niż przeciwny enancjomer. Badania molekularne wskazują na jego silniejsze oddziaływanie hydrofobowe i niskoenergetyczną konformację w centrach wiązania z CYP51 – enzymem grzybnym, niż R-(-)-imazalil. Natomiast ostra toksyczność konformeru S była 1,23-2,25 razy silniejsza wśród badanych patogenów. Analiza składu gleby ze szklarni, w której rosły pomidory i ogórki traktowane tym konformerem nie wykazała degradacji enancjoselektywnej w glebie. Oznacza to, że zastąpienie mieszaniny enancjomerów preparatem zawierającym wyłącznie konformer S może zmniejszyć ilość pestycydów i ryzyko związane z narażeniem na imazalil wśród organizmów wodnych [23].

Analityka

Czy da się zmyć fungicydy z owoców?

Trzeba być świadomym, że pewne ilości związków toksycznych mogą przedostać się do środka owoców, aczkolwiek największe ich stężenia występują bezpośrednio na skórce lub tuż pod jej warstwą, dlatego tak bardzo ryzykowne dla zdrowia może być obieranie cytrusów gołymi dłońmi, ponieważ w taki sposób pozwalamy niebezpiecznej toksynie przedostać się do wnętrza naszego organizmu poprzez transmisję poziomą. Jeżeli nawet umyjemy owoce lub wyszorujemy je płynem do mycia naczyń, a ponad to dodatkowo wyparzemy wciąż około połowa początkowej ilości imazalilu pozostanie na skórce. W sytuacji, kiedy kroimy nieumyte owoce choćby nawet tylko na dwie połówki, wraz z nożem będą przedostawały się do wnętrza produktów duże stężenia toksyn ze skórki i jej okolic. Gdy obieramy ze skórki pomarańcze, mandarynki czy banany najczęściej od razu je zjadamy, nie myjąc wprawdzie dłoni po ich obraniu. W taki sposób wprowadzamy do organizmu toksyczne substancje, które na tej skórce się znajdują. Dlatego najlepiej najpierw obrać owoc ze skórki i przed jego zjedzeniem dokładnie umyć dłonie, a do herbaty czy lemoniady lepiej wrzucić plasterkę bez skórki lub tylko wycisnąć sok z owocu.



Tabela 1. Rozmieszczenie pestycydów w owocach. Interpretacja własna na podstawie publikacji [24]

Przedmiot badań	Tiabendazol [mg/kg]	Imazalil [mg/kg]
skórka	0,29	0,64
miąższ	0,00	0,04
cały owoc	0,07	0,20

Estońscy naukowcy badali występowanie pozostałości pestycydów na dostępnych na rynku pomarańczach i ocenili potencjalne metody ich mycia. Wyniki ich badań zostały przedstawione w *Estonian Academy of Sciences. Chemistry* [24]. W celu określenia lokalizacji pestycydów wykorzystano cztery pomarańcze. Dwie z nich zostały zhomogenizowane w całości. Dla dwóch kolejnych pomarańczy skórki i miąższ zhomogenizowano oddzielnie. Otrzymane ekstrakty przeanalizowano za pomocą chromatografii gazowej. W tabeli 1 przedstawiamy wyniki tych badań [24, 25].

Spośród analizowanych związków wykryto najczęściej występujące dwa fungicydy, czyli tiabendazol i imazalil. Przedstawione wyniki pokazują, że najwięcej tych związków znajduje się na skórcie pomarańczy. W miąższu stężenie tiabendazolu było poniżej limitu detekcji. Natomiast badania wykazały, że niewielkie stężenie imazalilu znajduje się w miąższu owocu. Może to być związane z tendencją do dyfuzji trans-egzokarpialnej (egzokarp – zewnętrzna część skórki) tego związku, wynikającą z wysokiej polaryzacji imazalilu.

Przebadano pięć różnych metod mycia owoców w celu oceny skuteczności usuwania fungicydów z powierzchni ich skórki. Analizy wykonano jedynie dla skórek pomarańczy w celu poprawy poziomu detekcji tych związków i ich ilościowego oznaczania. Do przebadanych metod mycia należą [24, 25]:

- zimna woda (temp. ok. 15°C);
- gorąca woda (60 – 70°C);
- mydło;
- płyn do mycia naczyń (Fairy);
- kąpiel ultradźwiękowa (10 min w temp. pokojowej).

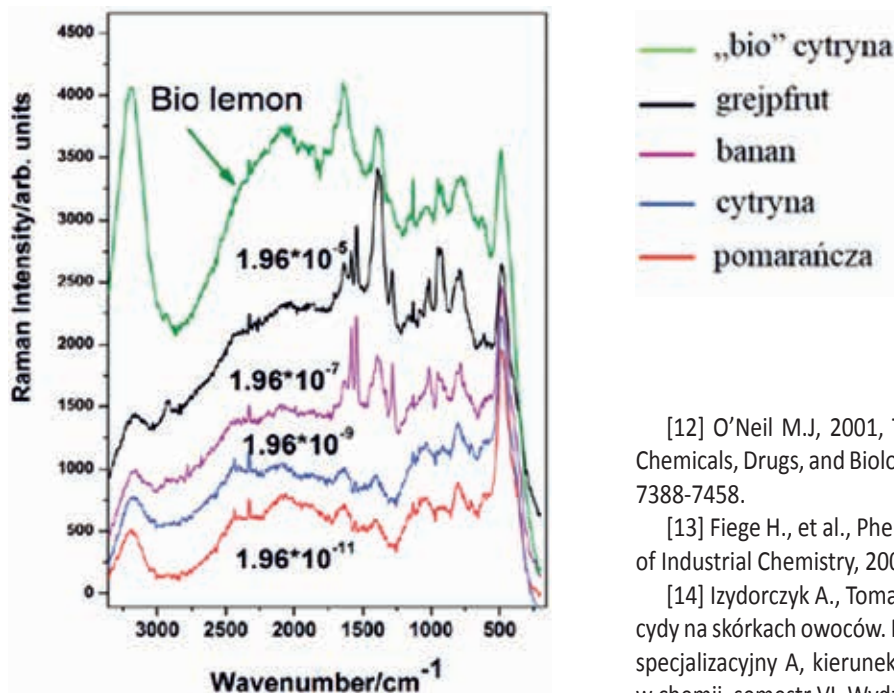
W przypadku związku, jakim jest tiabendazol można zaobserwować, że można go wyeliminować poprzez umycie skórki gorącą wodą lub z wykorzystaniem płynu do mycia naczyń. Dla pozostałych metod można jedynie zaobserwować zmniejszenie stężenia tiabendazolu. W przypadku imazalilu żadna z przedstawionych metod nie powoduje całkowitego wymycia tego związku ze skórki owoców. Najmniejsze stężenie tego związku obserwuje się po potraktowaniu pomarańczy kąpielą ultradźwiękową [24, 25].

Spektroskopia ramanowska wzmocniona powierzchniowo (SERS) jest jedną z najszybciej rozwijających się technik. Łączy w sobie specyfikę analizy typu „fingerprint” i wzmocnienie sygnału, co daje zdecydowanie lepsze wyniki od standardowej spektroskopii Ramana. Dzięki tej metodzie można wykrywać ślady związków organicznych, zanieczyszczenia, pestycydy i wiele innych chemikaliów. Spektroskopia ramanowska wzmocniona powierzchniowo została wykorzystana do wykrycia tiabendazolu w „bio” cytrynach dostępnych na rynku rumuńskim. Wyniki przeprowadzonych badań przedstawiono na wykresie rys. 7, który ukazuje widma zależności stężenia tiabendazolu od mikromola do pikomola [26].

Widma SERS tiabendazolu rozpuszczonego w wodzie o stężeniach w zakresie od $1,96 \times 10^{-5}$ mol/L do 10^{-11} mol/L pokazują zakres spektralny osiągnięty za pomocą przenośnego spektrometru. Sygnał pochodzący od tiabendazolu przy pH równym 7 został zidentyfikowany w próbce wody powstałej po zanurzeniu „bio” cytryny. Przed zanurzeniem, owoce zostały umyte wodą z kranu. Po 15 minutach od zanurzenia owoców, tiabendazol zaczął być wykrywalny w wodzie [26].

Tabela 2. Wpływ rodzaju mycia pomarańczy na stężenie tiabendazolu i imazalilu. Interpretacja własna na podstawie publikacji [24]

Sposób mycia	Tiabendazol [mg/kg]	Imazalil [mg/kg]
bez mycia	0,28	0,93
zimna woda	0,24	0,58
gorąca woda	0,00	0,57
mydło	0,13	0,92
płyn do mycia naczyń	0,00	0,67
kąpiel ultradźwiękowa	0,13	0,44



Rys. 7. Widma zależności stężenia tiabendazolu od mikromola do pikomola dla wybranych próbek owoców: pomarańcza, cytryna, banan, grejpfrut i „bio” cytryna. Górne widmo pokazuje sygnał zebrany z 10 μ l wody, które powstało po zanurzeniu „bio” cytryny na okres 24 godzin. Interpretacja własna na podstawie publikacji [26].

Literatura:

[1] Portal OdkrywamyZakryte, Imazalil, Tiabendazol i spółka to trucizny! – Dlaczego trzeba myć cytrusy? <https://www.odkrywamyzakryte.com/trzeba-myc-cytrusy/>, 15.06.2022.

[2] Portal Zdrowepasje, Cytrusy które mogą Cię zabić – Dowiedz się, na co warto uważać przy zakupie cytrusów! <https://zdrowepasje.pl/zdrowie/szkodliwe-produkty/cytrusy-kt%C3%B3re-mog%C4%85-ci%C4%99-zabi%C4%87>, 15.06.2022.

[3] Reference Work, 2003, Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition, Second Edition, 2832-2842.

[4] Jepson P.C., 2001, Encyclopedia of Biodiversity (Second Edition), Elsevier, 692-702.

[5] Iyer P., Makris S., 2010, Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology (Third Edition), 381-440.

[6] Gupta R.C., Crissman J.W., 2013, Haschek and Rousseau's Handbook of Toxicologic Pathology (Third Edition), 1349-1372.

[7] Vardanyan R. S., Hruby V. J., 2006, Synthesis of Essential Drugs, 583-593.

[8] Portal zneutralizujchemie.pl, Imazalil – efekt przyjmowania z pokarmem, <http://www.zneutralizujchemie.pl/imazalil-efekt-przyjmowania-z-pokarmem/>, 15.05.2022.

[9] Dumancas G.G., Hikkaduwa Koralege R.S., Mojica E.-R.E., Murdianti B.S., 2014, Thiabendazole, Encyclopedia of Toxicology (Third Edition), 533-536.

[10] Reference Work, 2006, Meyler's Side Effects of Drugs: The International Encyclopedia of Adverse Drug Reactions and Interactions (Fifteenth Edition), 3416-3418.

[11] Portal Drugbank online, Thiabendazole, <https://go.drugbank.com/drugs/DB00730>, 15.06.2022.

[12] O'Neil M.J., 2001, The Merck Index : An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals, Whitehouse Station, N.J., Merck, 7388-7458.

[13] Fiege H., et al., Phenol derivatives, Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 2000.

[14] Izydorczyk A., Tomaszewska K., A. Witkowska, 2021, Fungicydy na skórkach owoców. Projekt zaliczający przedmiot pt. Projekt specjalizacyjny A, kierunek Chemia, specjalność Kontrola jakości w chemii, semestr VI, Wydział Chemiczny Politechniki Łódzkiej.

[15] Coelhan M. et al., 2006, Determination and levels of the biocide ortho-phenylphenol in canned beers from different countries, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54(16), 5731-5735.

[16] Appel K.E., 2000, The carcinogenicity of the biocide ortho-phenylphenol, Archives of Toxicology, 74(2), 61-71.

[17] Pirymentanil w bazie danych o właściwościach pestycydów (PPDB) <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/573.htm>, 15.06.2022.

[18] Rewcastle G.W., 2008, Pyrimidines and their benzo derivatives, 8, 117-272.

[19] Gupta P.K., 2018, Toxicity of fungicides, in Veterinary Toxicology, Basic and Clinical Principles, Third Edition, Academic Press, 569-580.

[20] Vinggaard A.M., et al., 2006, Prochloraz: an imidazole fungicide with multiple mechanisms of action, International Journal of Andrology, 29(1), 186-192.

[21] Kalyani Paranjape, Vasant Gowariker, V N Krishnamurthy, Sugha Gowariker, 2014, The Pesticide Encyclopedia, CABI, 406.

[22] Darbre P.D., 2015, Endocrine Disruption and Human Health, Elsevier Science, 86.

[23] Li Runan, et al., 2019, Systematic evaluation of chiral fungicide imazalil and its major metabolite R14821 (Imazalil-M): stability of enantiomers, enantioselective bioactivity, aquatic toxicity, and dissipation in greenhouse vegetables and soil, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 67(41), 11331-11339.

[24] Krue A., Lamos A., Kirillova J., Herodes K., 2007, Pesticide residues in commercially available oranges and evaluation of potential washing methods. In Proceedings of the Estonian Academy of Sciences, Chemistry, 56(3), 134-141.

[25] Portal StackExchange, <https://cooking.stackexchange.com/questions/63105/lemons-and-oranges-coated-with-imazalil>, 15.06.2022.

[26] Müller C., David L., Pînzaru S.C., 2013, Detection of thiabendazole applied to organic fruit by near infrared surface-enhanced Raman spectroscopy, Spectroscopy Europe, 24, 6-11.

