

L'OXYDE D'ÉTHYLÈNE : SYNTHÈSE DES DONNÉES DISPONIBLES



La pomme : exemple
de fruit climactérique

AU SOMMAIRE

En résumé

L'oxyde d'éthylène : qu'est-ce que c'est ?

Utilisations industrielles de l'oxyde d'éthylène

Toxicités de l'oxyde d'éthylène et du chloro-2-éthanol

Comment le dose-t-on ?

Causes possibles de la détection d'oxyde d'éthylène

Bibliographie & Annexe

L'arrivée en 2020 sur le marché européen de graines de sésame contaminées à l'oxyde d'éthylène a déclenché des campagnes d'analyses sur bon nombre de produits d'origine végétale. Nous avons rassemblé des informations sur cette substance, ses origines possibles et sur les différentes méthodes de dosage existantes.



Utilisation de l'éthéphon en viticulture



Présence d'oxyde d'éthylène dans des
graines de sésame, identifiée
depuis 2020.

EN RÉSUMÉ...

Pas de consensus sur la méthode de dosage à utiliser.

Risque de confusion analytique entre l'oxyde d'éthylène et l'acétaldéhyde.

La teneur limite en oxyde d'éthylène est obtenue par la somme de 2 substances : l'oxyde d'éthylène et le chloro-2éthanol qui n'ont pas du tout la même toxicité, en particulier, la cancérogénicité de ce dernier est remise en cause par des articles récents.

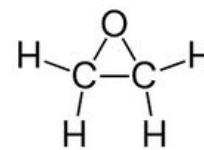
L'oxyde d'éthylène et le chloro-2éthanol sont aussi produits naturellement par les plantes.

Des résultats publiés indiquent que parfois seul le chloro-2-éthanol est présent.

Des doutes sont exprimés par les autorités elles-mêmes sur le fait que les traces d'oxyde d'éthylène et de chloro-2-éthanol soient systématiquement la preuve d'un traitement par l'oxyde d'éthylène.

L'OXYDE D'ÉTHYLÈNE : QU'EST-CE QUE C'EST ?

- L'oxyde d'éthylène est un gaz inodore de formule C_2H_4O .
- Synonymes : Oxirane / 1,2-époxyéthane / Oxyde de diméthylène / Oxacyclopropane



Molécule d'oxyde d'éthylène

UTILISATIONS INDUSTRIELLES DE L'OXYDE D'ÉTHYLÈNE

Pour la Synthèse¹

L'oxyde d'éthylène est un intermédiaire chimique très utilisé dans la synthèse de diverses substances dont en particulier l'éthylène glycol (antigel, synthèse de polymères dont le polyéthylène glycol). L'éthylène glycol est lui-même un intermédiaire important de la chimie organique, notamment pour fabriquer le polyéthylène téréphtalate (PET), et le polyéthylène glycol (PEG). Le PET est un plastique très largement utilisé pour des emballages.



Le PEG est utilisé comme épaississant ou gélifiant dans de nombreuses applications industrielles, dans des peintures, des cosmétiques, ... Il existe également différents (co)polymères d'oxyde d'éthylène (dont les poloxamères correspondant à la gamme Pluronic® de BASF) qui sont utilisés en milieu liquide comme surfactants, dans des détergents et produits nettoyants dans diverses applications industrielles : en agroalimentaire, traitement de l'eau, traitement des métaux, cosmétiques, industrie pharmaceutique....

D'après l'ECHA, l'oxyde d'éthylène peut aussi être utilisé pour l'élaboration des produits phytopharmaceutiques, produits de revêtement, encres et toners, produits chimiques de laboratoire, adhésifs, mastics et engrais.

Pour la stérilisation

- **Mode d'action :**

L'oxyde d'éthylène inactive les spores bactériennes et les virus en réagissant avec l'ADN et les protéines telles que les enzymes. En raison de sa petite taille, l'OE présente une diffusivité élevée et de fortes propriétés de pénétration. Elle est donc très efficace dans la désinfestation ou la désinfection des produits alimentaires secs².

- **Matériel médical :**

La stérilisation du matériel médical à l'oxyde d'éthylène est depuis des décennies la méthode de choix pour la production de matériaux thermolabiles stériles, en raison des propriétés microbicides et virucides de cet agent ainsi que de sa capacité de pénétration. Malgré l'utilisation croissante de nouvelles méthodes de stérilisation telles que la radiostérilisation [.../...] plus de 60 % de tous les dispositifs médicaux sont stérilisés de cette manière³.

L'ISO consacre une norme à la stérilisation des produits de santé par l'oxyde d'éthylène⁴.

- **Plantes médicinales :**

L'usage de l'oxyde d'éthylène est interdit pour la décontamination des plantes médicinales⁵.

- **Additifs alimentaires :**

Le règlement Européen 231/2012/EU stipule que l'oxyde d'éthylène ne doit pas être utilisé pour stériliser les additifs alimentaires.

- **Cosmétiques :**

L'oxyde d'éthylène est une substance interdite dans les cosmétiques dans l'UE (règlement Européen 1223/2009).

TOXICITÉS DE L'OXYDE D'ÉTHYLÈNE ET DU CHLORO-2-ÉTHANOL

Oxyde d'éthylène

L'inhalation est la principale forme d'exposition professionnelle à l'oxyde d'éthylène.

L'oxyde d'éthylène est une substance mutagène in vitro et in vivo, classée mutagène de catégorie 2, R46 par l'Union européenne.

En 1994, le CIRC a classé l'oxyde d'éthylène dans le groupe 1, c'est-à-dire parmi les agents cancérogènes pour l'homme (CIRC, 1994) sur la base de données essentiellement animales et de données épidémiologiques limitées. Le CIRC a confirmé en 2008 le classement de l'oxyde d'éthylène dans le groupe 1, compte tenu de données suffisamment probantes sur sa cancérogénicité chez l'homme (Monographie du CIRC, volume 97, 2008). En 2009, le CIRC a conclu à des **indications limitées** en termes de niveau de preuve scientifique concernant l'exposition à l'oxyde d'éthyle et les risques de cancers lymphocytaires, hématopoïétiques et de cancer du sein. Aucune localisation cancéreuse n'a été identifiée avec des indications suffisantes (CIRC, 2009).

Chloro-2-éthanol

En janvier 2022, en réponse à une demande des autorités allemandes, l'EFSA a considéré que les éléments fournis ne permettent pas de conclure sur la génotoxicité du 2-chloroéthanol et qu'il faudrait d'autres études pour pouvoir prendre une décision⁶.

En octobre 2022, une publication de Allemang *et al.* qui rassemble à la fois une compilation de la bibliographie existante et les résultats d'essais originaux conclut que le Chloro-2-éthanol n'est ni génotoxique ni cancérogène⁷.

LMR et CLP

En 2015, le règlement européen 396/2005 a été révisé pour différents pesticides, dont l'oxyde d'éthylène⁸. Cette révision va dans le sens d'un abaissement des valeurs de LMR qui correspondent aux seuils de détection. Les valeurs résultent de la somme de l'oxyde d'éthylène et du 2-chloro-éthanol exprimée en Oxyde d'éthylène.

Les principales valeurs de LMR (oxyde d'éthylène + 2-chloro-éthanol) pour notre secteur sont rassemblées dans le tableau suivant :

		LMR mg/kg (=ppm) * = seuil de détection
1-fruits à l'état frais ou congelé; noix	agrumes	0,02*
	noix	0,05*
	fruits à pépins	0,02*
	fruits à noyaux	0,02*
	baies et petits fruits	0,02*
	fruits divers	0,02*
	légumes et fines herbes à l'état frais	
	fines herbes	0,05*
4-graines et fruits oléagineux		0,05*
6-thé, café, infusions et cacao		0,1*
7-houblon		0,1*
8-épices	graines	0,1*
	fruits et baies	0,1*
	écorces	0,1*
	racines ou rhizomes	0,1*
	boutons	0,1*
	stigmates de fleurs	0,1*
	arilles	0,1*

Les USA et le Canada ont les mêmes LMR pour l'oxyde d'éthylène (7 ppm) et pour le chloro-2-éthanol (940 ppm) pour les épices, les herbes séchées, les légumes secs et les graines oléagineuses (dont le sésame)⁹.

Classement CLP harmonisé :

Oxyde d'éthylène :

Acute Tox. 3, Skin Corr. 1, Eye Dam. 1, STOT SE 3, Muta. 1B, Carc. 1B, STOT RE 1, Repr. 1B

COMMENT LE DOSE-T-ON ?

On peut distinguer plusieurs types de méthodes :

- Les méthodes directes qui dosent l'Oxyde d'éthylène et pour certaines aussi le chloro-2-éthanol tels qu'ils se trouvent dans l'échantillon ; dans ce dernier cas, l'hypothèse est que le chloro-2-éthanol présent est le témoin d'une utilisation d'oxyde d'éthylène sur l'échantillon,
- Les méthodes indirectes qui dosent l'oxyde d'éthylène sous une forme dérivée telle que le chloro-2-éthanol.

Méthodes directes :

• Pharmacopée Européenne

La Pharmacopée Européenne décrit une méthode⁹ directe de dosage de l'oxyde d'éthylène (et du dioxane) par espace de tête et chromatographie en phase gazeuse ; « *Cet essai est destiné à la détermination des résidus d'oxyde d'éthylène et de dioxane dans des échantillons solubles dans l'eau ou dans le diméthylacétamide. Pour les substances insolubles ou insuffisamment solubles dans ces solvants, la préparation de la solution mère et les conditions d'espace de tête statique sont indiquées dans les monographies spécifiques* ».

Dans la Pharmacopée Européenne, cette méthode est appliquée à des éthers et des esters de macrogol, des polysorbates, du nonoxinol et de l'otoxinol, soit environ 25 monographies.

• EURL-SRM :

Le groupement des laboratoires européens de référence pour l'analyse de résidus de pesticides (EURL-SRM)¹⁰ a publié 2 méthodes, l'une pour les matrices grasses (QuOil), l'autre applicable aux plantes sèches (QuEACHERS¹¹). Ces deux méthodes permettent de doser par GC-MS/MS individuellement l'oxyde d'éthylène et le chloro-2-éthanol tels qu'ils se trouvent dans l'échantillon.

• RIC (Research Institute for Chromatography, Kortrijk, Belgium)

Une publication d'août 2022 du RIC¹², après avoir mis en garde contre la possibilité de confusion du pic de l'oxyde d'éthylène avec celui de l'acétaldéhyde, propose une amélioration de la méthode QuEACHERS ainsi qu'une validation analytique.

Ce risque de confusion avec l'acétaldéhyde ne doit pas être négligé parce que c'est un composé organique volatil produit spontanément par la plupart des végétaux supérieurs¹³.

Méthodes indirectes :

Parmi les méthodes indirectes, certaines sont basées sur la conversion du 2-CE en EtO dans des conditions alcalines, une approche qui a ensuite été optimisée et utilisée comme méthode standard officielle en Allemagne (4). D'autres méthodes sont basées sur la conversion de l'EtO en 2-CE dans des conditions acides, suivie de l'extraction du 2-CE avec de l'acétate d'éthyle et de l'analyse par chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (GC-MS).



Quelques résultats issus de publications récentes :

- Cucu et al 2022¹²

On note dans ces échantillons l'absence d'oxyde d'éthylène et la présence de chloro-2-éthanol. Comme c'est une méthode directe, on peut être certain que le chloro-2-éthanol est bien présent dans les échantillons, que ce n'est pas le résultat de la transformation de l'oxyde d'éthylène lors du dosage.

Table 2: Amounts of EtO and 2-CE detected in commercial samples			
Matrix	EtO	2-CE	Sum EtO and 2-CE*
	µg/kg	µg/kg	µg/kg
Sesame, 1	n/d	224.7	122.9
Sesame, 2	n/d	75.7	41.4
Sesame, reference material	n/d	4581#	2505
Curcuma, 1	n/d	199.7	109.2
Curcuma, 2	n/d	12.7	6.9
Garlic powder	n/d	9.2	5.0
Ginger powder	n/d	27.7	15.2
Spice mixture	n/d	31.2	17.1
Herb mixture	n/d	29.2	16.0
Mustard	n/d	2610	1430
Lecithin	n/d	1030	566.5
Tomato powder	n/d	35	19.3
Bay leaf	n/d	7.0	3.9

*Sum EtO and 2-CE = conc EtO + (concentration 2-CE in sample × 0.55) (conversion factor based on conversion of molecular weights: 44/80 = 0.55) #~4660 µg/kg (27.3% CV) #: certified value : 4660 µg/kg (27.3%CV)

- EURL-SMR²

Les résultats présentés ont été obtenus avec une méthode de type QuEChERS dont la partie chromatographique permet de bien distinguer l'oxyde d'éthylène de l'acétaldéhyde ; sur les 20 échantillons de graines de sésame analysés, 5 ont une teneur en oxyde d'éthylène calculée (oxyde d'éthylène + chloro-2-éthanol exprimée en oxyde d'éthylène) supérieure à la LMR (0,05 ppm) mais aucun de ces 5 échantillons, ni aucun des 15 autres, ne présente de trace détectable d'oxyde d'éthylène.

- Avis de l'Anses Saisine n° 2022-SA-0059¹⁴

« Une alerte sanitaire concernant la détection de 2-chloroéthanol (2-CE) dans des mix à base de gluten vital¹⁵ a été rapportée le 23 mars 2022 par la DGCCRF ». La présence de 2-CE a été détectée par les préparateurs des mix de gluten qui sont destinés à être incorporés dans des farines utilisées pour la fabrication de différents produits finis, dont de panification comme le pain, les viennoiseries, etc. A la suite de cette détection, le fabricant du gluten mis en cause a réalisé des analyses sur son échantillonnage et a confirmé que le gluten était l'ingrédient alimentaire contaminé. Le fabricant a également analysé un ensemble conséquent de plusieurs centaines de lots récents de gluten, amidon et autres coproduits. L'oxyde d'éthylène (ETO) auquel le métabolite 2-CE est communément associé n'a été détecté dans aucun échantillon.

Selon la DGCCRF, ces résultats excluent tout lien avec une contamination ou un traitement par l'ETO, traitement interdit en Europe, et seraient ainsi concordants avec l'origine française des blés. »

Retenons de ce document que :

- Sur plusieurs centaines (580+160) de lots de gluten qui ont été analysés pour leur teneur en oxyde d'éthylène et en chloro-2-éthanol, aucun ne renfermait de trace d'oxyde d'éthylène à des niveaux détectables alors que des teneurs en chloro-2-éthanol élevées ont été mesurées dans plusieurs dizaines d'entre eux, et qu'une teneur « basale » d'environ 60 ppb a été estimée sur l'ensemble des échantillons.
- Selon la DGCCRF, ces résultats excluent tout lien avec une contamination ou un traitement par l'ETO.

CAUSES POSSIBLES DE LA DÉTECTION D'OXYDE D'ÉTHYLÈNE

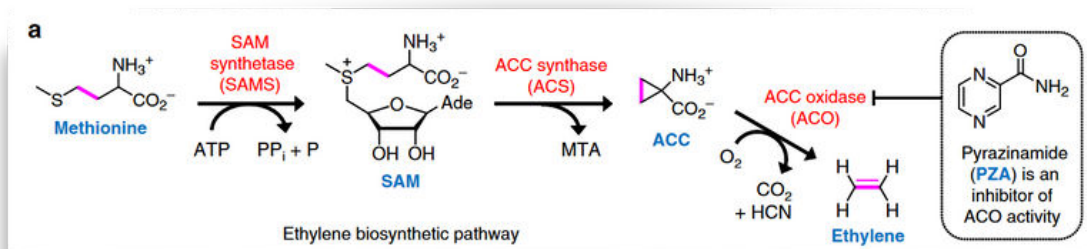
Rappelons que la teneur réglementaire en oxyde d'éthylène est définie comme étant la somme de la teneur en oxyde d'éthylène et de la teneur en chloro-2-éthanol ; il faut donc s'interroger sur les origines possibles de l'oxyde d'éthylène et du chloro-2-éthanol.

L'éthylène, une hormone végétale :

Avant de parler de l'oxyde d'éthylène, il faut rappeler ce qu'est l'éthylène et son rôle dans la physiologie des végétaux.

• Biosynthèse de l'éthylène dans les plantes

Même s'il en existe d'autres sources, l'éthylène ($\text{CH}_2=\text{CH}_2$) est un gaz produit par les végétaux ; sa voie de biosynthèse comporte trois étapes : un acide aminé, la méthionine, est converti en S-adénosyl méthionine (SAM), qui est ensuite convertie par les ACC-synthases (ACS) en ACC¹⁶, le précurseur direct de l'éthylène¹⁷.



La voie de biosynthèse de l'éthylène¹⁸

• Rôles de l'éthylène dans les plantes

L'éthylène est une hormone végétale. Il agit à l'état de traces tout au long de la vie de la plante en stimulant ou en régulant la maturation des fruits, l'éclosion des fleurs, l'abscission (ou la chute) des feuilles.

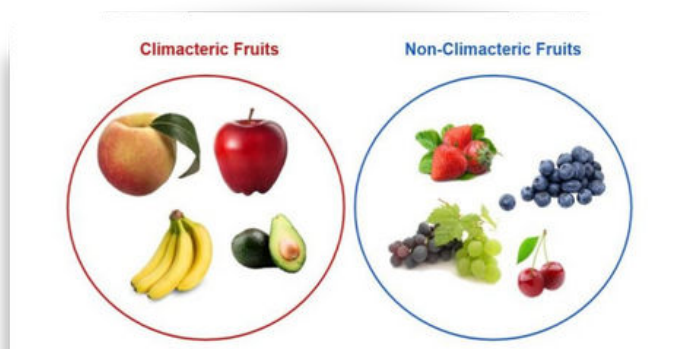
Plantes climactériques et non-climactériques :

Selon Capino¹⁰ « Les fruits climactériques peuvent mûrir après la récolte, tandis que les fruits non climactériques ne peuvent pas mûrir après la récolte.

La maturation climactérique des fruits est caractérisée par une augmentation du taux de respiration, puis une poussée de la biosynthèse de l'éthylène pendant la maturation. La production d'éthylène dans les fruits climactériques est également qualifiée d'autocatalytique, ce qui signifie .../... qu'une fois que la production d'éthylène commence, le fruit augmente naturellement la quantité de signal émis pour accélérer la maturation.

Les fruits non climactériques .../... n'ont pas de pic de production d'éthylène ou de respiration pendant la maturation ; ils doivent donc être récoltés lorsqu'ils sont complètement mûrs ».

A côté de ce rôle découvert il y a plus d'un siècle, l'éthylène intervient dans les réponses à divers stress, tels que les inondations, la teneur élevée en sel et le compactage du sol²⁰. Il est aussi cité en cas de blessure ou d'agression. On peut trouver dans l'article de Kahn *et al.*²¹ une compilation des interactions de l'éthylène avec les autres hormones végétales.



• Utilisation de l'éthylène en agriculture

L'éthylène peut être utilisée en pré-récolte ou en post-récolte. Par exemple, l'université du Maryland cite trois régulateurs de croissance en pré-récolte qui produisent ou modifient la production d'éthylène ou sa perception par les plantes, pour influencer la maturation : Etephon, ReTain®, and HarvistaTM.^{22, 23}

• L'éthéphon, une source d'éthylène²⁴

L'éthéphon, $\text{Cl-CH}_2\text{-CH}_2\text{-PO}_3\text{H}_2$, se décompose en éthylène, acide chlorhydrique et acide phosphorique (chlorures et phosphates). .../... En tant que régulateur de croissance des plantes, il est très utilisé. On peut citer quelques effets :

- il prévient la verse des céréales,
- c'est une substance de croissance du riz, du blé, du coton, du café, des bananes, du tabac, etc.,
- il favorise l'éclaircissage des pommes et favorise la formation des bourgeons floraux pour l'année suivante.

Les spécialités suivantes contiennent de l'éthéphon²⁵ :

Produits contenant la substance			
Filtrer par État	Filtrer par Mention	Filtrer par Type commercial	
✓ ATENA ETEPHON	✓ ETEPON-48	✓ JANOR	✓ SIERRA
✓ BAIA E	✓ ETHEPHON 480	✓ PHON-CHOC	✓ SIMOUN
✓ BOGOTA	✓ ETHEVERSE	✓ PRM 12 RP	✓ SONIS
✓ BOGOTA PLUS	✓ ETHIC+		✓ SUNSET
✓ COUPON	✓ EVEREST		✓ TERPAL
✓ CYBELE PRO	✓ FLORDIMEX CBW		
	✓ FLORDIMEX EXTRA		

L'oxyde d'éthylène :

- **Risque de faux positif :**

Selon le RIC, « L'**acétaldéhyde** est souvent présent dans les produits alimentaires, en particulier dans ceux qui sont riches en matière grasse. Étant donné que l'acétaldéhyde et l'EtO ont des spectres de masse et des indices de rétention très similaires », il est indispensable d'éviter leur coélution²⁶.

- **Présence naturelle dans les plantes**

Plusieurs études ont démontré que l'oxyde d'éthylène est présent dans certaines plantes, à de très faibles concentrations ; il semble jouer alors un rôle antagoniste de celui de l'éthylène (voir annexe 1).

- **Conversion enzymatique de l'éthylène en oxyde d'éthylène par l'éthylène oxydase²⁷**

Dodds *et al.* (1979), ont découvert que des préparations acellulaires de *Vicia faba* L. métabolisaient l'éthylène en oxyde d'éthylène avec un haut degré d'efficacité. Ce système avait une forte affinité pour l'éthylène et présentait un besoin moléculaire en oxygène (Blomstrom et Beyer, 1980 ; Smith *et al.*, 1985) avec un Km de $3,63 \times 10^{-3}$ M (Dodds *et al.*, 1979). La conversion de l'éthylène en oxyde d'éthylène ne se limite pas aux plantes. Il a été démontré que *Mycobacterium paraffinicum* convertit l'éthylène en oxyde d'éthylène (Abeles, 1984; Hartmans *et al.*, 1991).

Le chloro-2-éthanol

Le Chloro-2-éthanol est un liquide incolore à odeur d'éther.

Synonymes : 2-chloroethanol / Ethylene chlorohydrin / 107-07-3 / Ethanol, 2-chloro- / Glycol chlorohydrin

- **Formation à partir de l'oxyde d'éthylène :**

Dans sa fiche consacrée à l'oxyde d'éthylène²⁸, l'INERIS indique « En eau douce, l'oxyde d'éthylène est hydrolysé en éthylène glycol (demi-vie ~ 1 semaine); dans l'eau salée, il est hydrolysé en éthylène glycol et éthylène chlorhydrine [= chloro-2-ethanol] (demi-vie ~ 2 semaines) »

Cependant, le chloro-2-éthanol pourrait ne pas toujours provenir d'un traitement à l'ETO : « Il peut s'agir d'un résidu de pesticides non interdits en Europe. Certaines études montrent aussi qu'il peut se trouver naturellement dans certains ingrédients, comme le paprika. »²⁹

- **Autres origines :**

Selon le document de l'EURL-SRM², le chloro-2-éthanol est un produit de dégradation du 1,2-dichloroéthanol (largement utilisé dans la fabrication du chlorure de vinyle) ; c'est aussi un produit de dégradation du chlorure de vinyle.

Il peut se former aussi au contact de l'hypochlorite (constituant principal de l'eau de Javel) soit au cours du process (lavage des graines) soit en cas d'irrigation avec une eau chlorée.

Cas de la vigne



En viticulture, il est possible de réaliser un éclaircissage chimique avec Sierra®, seule substance de croissance actuellement homologuée sur vigne pour cet usage et s'utilisant à 2 l/ha. Le Sierra® contient 180 g/l d'éthéphon. L'application de Sierra® provoque l'augmentation de la concentration en éthylène dans la plante et accélère les phénomènes d'abscission à proximité des points d'impact de la bouillie. Pulvérisé sur grappes, autour de la nouaison, le Sierra® présente l'avantage de pouvoir réduire le nombre de grappes et/ou le nombre de baies par grappe en modifiant le niveau de nouaison des grappes³⁰.

La sénescence et la chute des feuilles sont liées à l'éthylène ; en effet, l'application d'éthéphon qui libère de l'éthylène induit les mêmes réactions métaboliques que le vieillissement naturel³¹.

Ainsi, la présence d'oxyde d'éthylène dans les feuilles de vignes pourrait être la conséquence de l'utilisation d'un produit libérant de l'éthylène.

BIBLIOGRAPHIE

¹ Institut national de l'environnement industriel et des risques, Oxyde d'éthylène, Verneuil-en-Halatte : Ineris - v1.0, 29/06/2021.

² EURL-SRM - Analytical Observations Report - Analysis of Ethylene Oxide and its Metabolite 2-Chloroethanol by the QuOil or the QuEChERS Method and GC-MS/MS ; Version 1.1 (December 2020).

³ K.D. Golden and O.J. Williams, 2014. Ethylene Oxide in Plant Biological Systems: A Review. Asian Journal of Biological Sciences, 7: 144-150.

⁴ ISO 11135:2014 - Stérilisation des produits de santé — Oxyde d'éthylène — Exigences de développement, de validation et de contrôle de routine d'un processus de stérilisation pour des dispositifs médicaux.

⁵ Pharmacopée Européenne ; Drogues végétales 07/2017 :1433

⁶ « Statement on the BfR opinion regarding the toxicity of 2-chloroethanol | EFSA ». Consulté le 20 novembre 2022. <https://www.efsa.europa.eu/fr/efsajournal/pub/7147>.

⁷ Allemang, Ashley, Cathy Lester, Thomas Roth, Stefan Pfuhler, Henrike Peuschel, Kirstin Kosemund, Catherine Mahony, Trygve Bergeland, et Lara O'Keeffe. « Assessing the Genotoxicity and Carcinogenicity of 2-Chloroethanol through Structure Activity Relationships and in Vitro Testing Approaches ». Food and Chemical Toxicology 168 (1 octobre 2022): 113290. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.113290>.

⁸ Regulation (EU) 2015/868 of 26 May 2015 amending Annexes II, III, and V to Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards maximum residue levels for .../..., **ethylene oxide**, .../... in or on certain products, Off. J. Eur. Union L 145/1-71 (2015)

⁹ Pharmacopée Européenne 11.1 ; 2.4.25. Oxyde d'éthylène et dioxane 04/2015:20425 corrigé 10.0.

¹⁰ EURL-SRM - Analytical Observations Report - Analysis of Ethylene Oxide and its Metabolite 2-Chloroethanol by the QuOil or the QuEChERS Method and GC-MS/MS ; Version 1.1 (December 2020).

¹¹ de l'anglais "Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe", ce qui signifie « rapide, facile, abordable, efficace, robuste et sûr ».

¹² Cucu, Tatiana, Frank David, et Christophe Devos. « Analysis of Ethylene Oxide and 2-Chloroethanol in Food Products: Challenges and Solutions ». Column, August 2022, 18, no 8 (4 août 2022): 10-16.

¹³ Kimmerer, Tom, et Robert MacDonald. « Acetaldehyde and Ethanol Biosynthesis in Leaves of Plants ». Plant physiology 84 (1 septembre 1987): 1204-9. <https://doi.org/10.1104/pp.84.4.1204>.

¹⁴ Anses. (2022). Avis relatif à l'évaluation des risques liés à la présence de 2-chloroéthanol (2-CE) dans du gluten incorporé dans des denrées alimentaires (saisine 2022-SA-0059).Maisons-Alfort : Anses, 98 p

¹⁵ gluten vital = qualité de gluten pour consommation humaine.

¹⁶ ACC = 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid ou acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique.

¹⁷ Dubois, Marieke, Lisa Van den Broeck, et Dirk Inzé. « The Pivotal Role of Ethylene in Plant Growth ». Trends in Plant Science 23, no 4 (1 avril 2018): 311-23.



- ¹⁸ Vong, Kenward, Shohei Eda, Yasuhiro Kadota, Igor Nasibullin, Takanori Wakatake, Satoshi Yokoshima, Ken Shirasu, et Katsunori Tanaka. « An Artificial Metalloenzyme Biosensor Can Detect Ethylene Gas in Fruits and Arabidopsis Leaves ». *Nature Communications* 10, no 1 (17 décembre 2019): 5746. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13758-2>.
- ¹⁹ Annabelle Capino ; Ethylene and the Regulation of Fruit Ripening ; vegetable and fruit news ; | University of Maryland Extension ». April 15, 2021- Volume 12, Issue 1 ; Consulté le 18 novembre 2022. <https://extension.umd.edu/resource/ethylene-and-regulation-fruit-ripening>.
- ²⁰ Binder, Brad M. « Ethylene Signaling in Plants ». *Journal of Biological Chemistry* 295, no 22 (29 mai 2020): 7710-25. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV120.010854>.
- ²¹ Iqbal, Noushina, Nafees A. Khan, Antonio Ferrante, Alice Trivellini, Alessandra Francini, et M. I. R. Khan. « Ethylene Role in Plant Growth, Development and Senescence: Interaction with Other Phytohormones ». *Frontiers in Plant Science* 8 (2017). <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2017.00475>.
- ²² « Ethylene and the Regulation of Fruit Ripening | University of Maryland Extension ». April 15, 2021- Volume 12, Issue 1 ; Consulté le 18 novembre 2022. <https://extension.umd.edu/resource/ethylene-and-regulation-fruit-ripening>.
- ²³ K.D. Golden, O.J. Williams and H.M. Dunkley, 2014. Ethylene in Postharvest Technology: A Review. *Asian Journal of Biological Sciences*, 7: 135-143. URL: <https://scialert.net/abstract/?doi=ajbs.2014.135.143>
- ²⁴ <https://www.afas.fr/les-bananes-lethylene-et-lethephon/> consulté 18/10/2022
- ²⁵ <https://ephy.anses.fr/substance/ethephon> - mis à jour le 24/05/2022 ; consulté le 29/11/2022
- ²⁶ Cucu, Tatiana, Frank David, et Christophe Devos. 2022. « Analysis of Ethylene Oxide and 2-Chloroethanol in Food Products: Challenges and Solutions ». *Column*, August 2022, 18 (8): 10-16.
- ²⁷ K.D. Golden and O.J. Williams, 2014. Ethylene Oxide in Plant Biological Systems: A Review. *Asian Journal of Biological Sciences*, 7: 144-150.
- ²⁸ Institut national de l'environnement industriel et des risques, Oxyde d'éthylène, Verneuil-en-Halatte : Ineris - v1.0, 29/06/2021.
- ²⁹ <https://www.60millions-mag.com/2022/03/01/oxyde-d-ethylene-le-mystere-des-pains-de-mie-contamines-19782>
- ³⁰ <https://www.vignevin.com/publications/fiches-pratiques/eclaircissage-chimique/>
- ³¹ Hendgen, Maximilian, Stefan Günther, Sven Schubert, et Otmar Löhnertz. 2021. « Ethephon Activates the Transcription of Senescence-Associated Genes and Nitrogen Mobilization in Grapevine Leaves (*Vitis vinifera* cv. Riesling) ». *Plants* 10 (février): 333. <https://doi.org/10.3390/plants10020333>.

CREDITS PHOTOS

Pommes, page 1 - Red Apples on a Tree - Oldiefan, Pixabay
 Verse, page 1 - Lodging plants - Ratikova, Getty Image
 Graines de sésame, page 1 - Sesame - Redphotographer, Getty Images
 Plastique, page 3 - The preform shape of PET bottle - Phuchit, Getty Images
 Cartouches d'encre, page 3 - printer toner color ink laser - sunnychicka, Getty Images
 Bouteille, page 3 - Hand holding PET plastic bottle - RecycleMan, Getty Images
 Fertilisation, page 3 - Fertilizer agriculture - fotokostic, Getty Images
 Vignes, page 10 - Merlot Grape Vines - Mike Annese, Getty Images

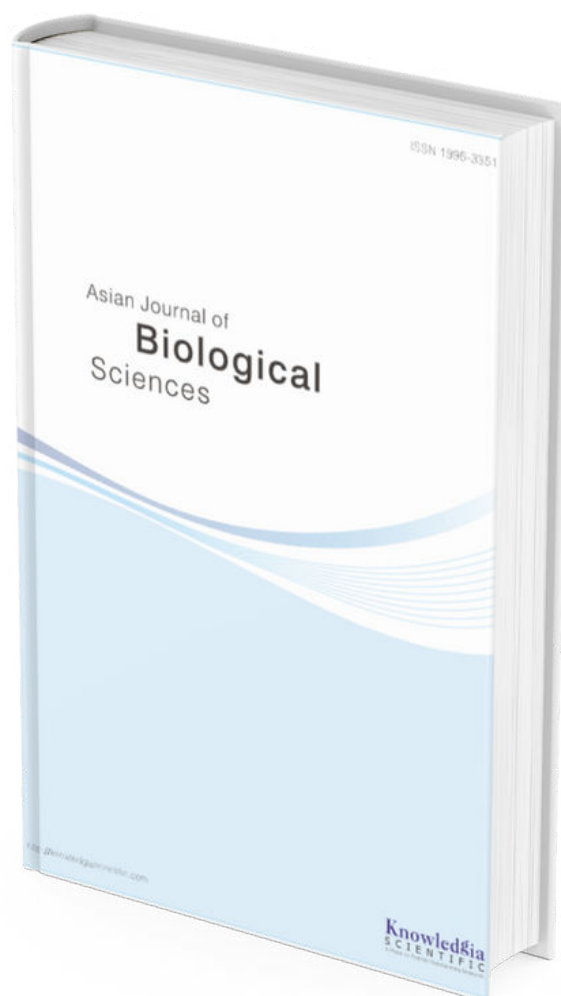


ANNEXE 1

Ethylene Oxide in Plant Biological Systems: A Review

K.D. Golden and O.J. Williams, 2014. Ethylene Oxide in Plant Biological Systems: A Review. Asian Journal of Biological Sciences, 7: 144-150.

<https://scialert.net/abstract/?doi=ajbs.2014.144.150>



Ethylene Oxide in Plant Biological Systems: A Review

¹K.D. Golden and ²O.J. Williams

¹Department of Basic Medical Sciences (Biochemistry Section), University of the West Indies, Mona Campus, Kingston 7, Jamaica, West Indies

²Stewart Postharvest Review, Meadows, Parkwood Road, Nutfield, Redill, RH1 4HD, United Kingdom

Corresponding Author: K.D. Golden, Department of Basic Medical Sciences (Biochemistry Section), University of the West Indies, Mona Campus, Kingston 7, Jamaica, West Indies

ABSTRACT

This study reviews the role of ethylene oxide in biological systems and the progress made within this study area since the earliest identification of this gas. Current study and review articles provide vast information on the toxicity of ethylene oxide and the potential health risks that are associated with its use. While a few sections in this study are dedicated to the effects of ethylene oxide, a majority of the material will be confined to the gas and its role in plant biological systems.

Key words: Ethylene oxide, sterilization, ethylene oxidase, fruit ripening

INTRODUCTION

What the world knows of Ethylene Oxide (EO) is that it is an industrial gas that is widely used to sterilize medical equipment, cosmetics, pharmaceuticals and food stuffs. Generally, the higher the EO levels, the more effective the sterilization process and the shorter the time required. Unfortunately, it is highly toxic, even a sniff can be fatal. In addition, EO is explosive in concentrations ranging from 3-100% by volume and because it carries its own oxygen supply, it can explode in anaerobic atmospheres. However, for over 4 decades now, plant biologists have encountered minute quantities of this gas in plant biological systems and believe that it plays an important role in plant tissues where it is often detected as one of the products of ethylene metabolism. Surprisingly, the levels of EO detected in plant tissues have been at low levels that almost always escape detection and require radiolabelling to be detected and adequately measured. For these reasons, widespread research into the role of EO in biological systems has been hindered. In addition the purification and characterization of the enzyme catalyzing the conversion of ethylene to EO, ethylene oxidase (ethylene monooxygenase), has been met with tremendous difficulty and lack of success because the enzyme appears to be rather delicate and is often lost before any number of purification steps can be completed.

ETHYLENE OXIDE THE INDUSTRIAL GAS

Ethylene oxide is a major industrial chemical used primarily as an intermediate in the manufacture of other chemicals such as ethylene glycol, a major component of automotive and other antifreeze products. It is also useful in the synthesis of polyesters, laundry detergent and as an industrial sterilant. The EO is predominantly synthesized from the catalytic oxidation of ethylene in air or oxygen. It is very reactive because its highly strained ring can be opened easily and as a result, it is not persistent in the environment because it may be dispersed via a combination of mechanisms of dilution, biodegradation, volatilization and hydrolysis.



The sterilization of medical equipment with EO has for decades been the method of choice for the production of sterile thermolabile materials, owing to the microbicidal and virucidal properties of this agent as well as its penetration capacity (Hucker and Kramer, 2001; Mendes *et al.*, 2007). Despite the increasing use of novel sterilization methods such as radiation sterilization and research into the potential risks of EO exposure, more than 60% of all medical devices are sterilized in this manner (Lambert *et al.*, 2011; Buchalla *et al.*, 1995). Identification of the risks associated with the widespread use of EO has sparked varied research worldwide. Ongoing study involves the creation and/or improvement of sterilizing equipment (Hucker and Kramer, 2001; Smith *et al.*, 2007; Mendes *et al.*, 2007). Occupational safety bodies such as National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) and the National Healthcare Association (NHA) in the USA have set Permissible Exposure Limits (PEL) at 0.5 ppm, however the degree to which these standards are followed on EO production plants as well as in hospital and other areas of use is difficult to ascertain with any degree of certainty.

Based on studies in animals, cancer is considered the critical endpoint for the effect of EO on human health (Liteplo *et al.*, 2001). In humans, EO has been implicated in DNA damage, reduction in reproduction potential and spontaneous abortion, skin irritation and sensitization, neurological disorders and various types of cancers (Shore *et al.*, 1993; Axelson, 2004; Valdez-Flores *et al.*, 2010). These issues have been complicated by the detection of EO residues in medical equipment and skin products, however the effects of these residues has not been measured.

BIOSYNTHESIS OF EO IN PLANT TISSUES

Ethylene is a natural plant growth regulator often produced in sufficient quantities to alter cellular and developmental processes in a characteristic hormonal manner (Abeles, 1973). Almost all phases of plant development are affected including germination, growth, flowering, dormancy, abscission, senescence and sex expression (Blomstrom and Beyer, 1980). It is well established that ethylene is derived from methionine via the ethylene pathway in a complex cycle. In the presence of ATP, methionine joins with adenosine to form S-adenosyl methionine, a process catalyzed by S-adenosyl methionine transferase. S-adenosyl methionine then undergoes a γ -elimination process cleaving into methylthioadenosine and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC). This process is catalyzed by ACC synthase. In the final step ACC is acted upon by ACC oxidase producing ethylene (Yang and Hoffman, 1984).

The earlier view that ethylene is metabolically inert (Abeles, 1972; Varner and Ho, 1976) is untenable. Low but readily detectable rates of ethylene metabolism have been observed in several plant tissues (Beyer, 1975). Studies indicate that the metabolism of ethylene does not represent a system for the removal of ethylene from the plant but instead represents the initial biochemical events in the action of ethylene in the plant (Beyer, 1977; Beyer and Sundin, 1978). Evidence of ethylene metabolism is reflected in studies which show that a portion of the ethylene is oxidized to EO (Jerie and Hall, 1978; Dodds *et al.*, 1979; Smith *et al.*, 1985), ethylene glycol (Blomstrom and Beyer, 1980) and/or carbon dioxide (Beyer, 1975; Beyer and Sundin, 1978).

Surprisingly, in spite of all the research done on various aspects of ethylene and its metabolism, little is known about its metabolic fate (Beyer, 1975). It is still not clear whether or not ethylene is incorporated into plant tissues, despite the fact that several studies (Hall *et al.*, 1961; Shimokawa and Kasai, 1968) have reported that a small but significant amount of radioactive label was incorporated by fruit and vegetable tissues. Work on the fate of $^{14}\text{C}_2\text{H}_4$ (radioactive ethylene) in pea seedlings (Beyer, 1975; Giaquinta and Beyer, 1977) and in cut carnation flowers



(Beyer, 1977), revealed a previously unrecognized ethylene metabolic system in these tissues. This system oxidizes ethylene to carbon dioxide and incorporates ethylene into water-soluble tissue metabolites (Beyer and Sundin, 1978). Efforts to determine the fate of radioactive ethylene in plant tissues have shown that little (1% maximum) or no incorporation occurs. Where incorporation does occur, radioactivity has been detected in a wide variety of compounds including benzene (Jerie and Hall, 1978), the presence of which in higher plants is unexpected. Flowers of *Ipomoea tricolor* Cav. (cv. heavenly blue) demonstrated the ability to metabolize ethylene to CO₂ (Beyer and Sundin, 1978). Like ethylene sensitivity and biosynthesis, the ability of plant tissues to metabolize ethylene changes during development. This complex metabolic pathway does not seem to serve as a detoxification or degradative system since based solely on the amount of ethylene removed, it would appear totally ineffective (Beyer, 1975).

ENZYMATIC CONVERSION OF ETHYLENE TO ETHYLENE OXIDE BY ETHYLENE OXIDASE

Although progress on the isolation of cell, free preparations of the ethylene oxidizing enzyme (ethylene oxidase) has been slow, important data has been provided using partially purified enzyme preparations (Dodds *et al.*, 1979; Smith *et al.*, 1985). Progress in the precise localization of the enzyme has been hampered by the fact that sucrose and other polyhydroxy compounds commonly used in the fractionation of subcellular components drastically inhibits enzyme activity (Smith *et al.*, 1985). Dodds *et al.* (1979), found that cell-free preparations of *Vicia faba* L. metabolized ethylene to EO with a high degree of efficiency. This system had a high affinity for ethylene and showed a molecular requirement for oxygen (Blomstrom and Beyer, 1980; Smith *et al.*, 1985) with a K_m of 3.63×10⁻³ M (Dodds *et al.*, 1979). The conversion of ethylene to ethylene oxide is not confined to plants. *Mycobacterium paraffinicum* has been shown to convert ethylene to ethylene oxide (Abeles, 1984; Hartmans *et al.*, 1991).

The incorporation of ¹⁸O (radioactive oxygen) into EO was demonstrated in *Vicia faba* L. cotyledons using *in vivo* studies (Beyer, 1975). The evidence to date then suggests that ethylene oxidase is a mono-oxygenase (Hartmans *et al.*, 1991) and this is substantiated by the fact that the apparent K_m for NADPH is within the range for K_m values reported for other plant mono-oxygenases (Beyer, 1975). The enzyme's requirement for oxygen was also demonstrated by Beyer (1975), who showed that enzyme activity was reduced by over 60% when extracts were incubated in vials that had been flushed with N₂. The K_m of this system corresponds to a concentration of 0.096 μL L⁻¹ in the gaseous phase which corresponds well with values for endogenous ethylene concentrations in the air spaces of plant tissues (Beyer and Sundin, 1978).

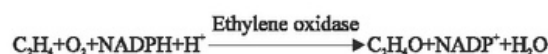
The first studies using partially purified enzyme preparation of ethylene oxidase was carried out by Dodds *et al.* (1979). The enzyme extract was prepared from *Vicia faba* L. cotyledons by centrifugation of cell, free extracts to generate 6 fractions. Each fraction was tested for its ability to metabolise ¹⁴C ethylene into ¹⁴C ethylene oxide. More than half the activity of the original homogenate was discovered in the pellet obtained from centrifuging at the lowest speeds (3000-10 000×g). The first reports of kinetic studies carried out on ethylene oxidase showed that ethylene oxidase had a K_m of 4.17×10⁻¹⁰ M and required an optimum pH of 8.5 (Dodds *et al.*, 1979).

Later, Blomstrom and Beyer (1980) reported the metabolism of ethylene to ethylene glycol in cotyledons of *Vicia faba* L. From the results, it was suggested that EO being a likely precursor of ethylene glycol, might be involved in the formation of ethylene glycol from ethylene, serving as an



intermediate. Inhibition studies carried out showed that propylene competitively inhibits ethylene oxidase where the metabolite formed is ethylene glycol. Although the conversion of ethylene glycol may be unique to this tissue, it is of interest because EO is a likely precursor of ethylene glycol. In conditions like those found in *Vicia* cotyledons, where the ethylene is rapidly metabolized, perhaps EO escapes before rapidly undergoing hydrolysis, or that this later step may be blocked in this tissue (Blomstrom and Beyer, 1980).

Some of the most intense work done on ethylene oxidase to date seems to be that from Smith *et al.* (1985) and this gave independent confirmation to the work carried out by Dodds *et al.* (1979). Smith *et al.* (1985), generated a partially pure enzyme preparation from homogenized cotyledons of *Vicia faba* L. From these experiments, Smith *et al.* (1985) showed that ethylene oxidase had a molecular requirement for oxygen and NADPH and a high affinity for ethylene. As a result of kinetic studies with partially purified enzyme preparations, a reaction path for the metabolism of ethylene to EO in the presence of ethylene oxidase (a mono-oxygenase) has been proposed (Smith *et al.*, 1985). The reaction is shown as:



Ethylene oxidase had a K_m of 4.2×10^{-10} M for the substrate ethylene (*in vivo*) and 2×10^{-8} M for desalted extracts (Dodds *et al.*, 1979), which agrees with earlier theories that only extremely small yet significant amounts of ethylene is fixed and metabolized in fruit and vegetable tissues (Beyer, 1975). The high affinity of the enzyme for ethylene makes it very likely that ethylene is the true substrate. Inhibition studies using propylene gave a K_i of the order of 5×10^{-6} M (Blomstrom and Beyer, 1980) and 1.8×10^{-6} M (Dodds *et al.*, 1979), which supports the likelihood that ethylene, is the true substrate, having a K_m of 4.17×10^{-10} M. A requirement for NADPH was also shown by ethylene oxidase (Smith *et al.*, 1985). The NADH (0.5 mM) and NADPH (0.5 mM) increased the activity of ethylene oxidase but the NADPH alone was twice as effective as NADH. At the concentration tested, there was no evidence of synergism when both co-factors were applied.

The actual role of EO in plant metabolism is unclear. It does not appear to serve as a shunt pathway for controlling endogenous ethylene concentrations because of the fact that only trace amounts of ethylene is fixed and metabolized to EO. Although the function of ethylene metabolism is unclear, the process does appear to be correlated with ontogeny since production of ethylene increases with stage of maturity (Jerie and Hall, 1978).

ETHYLENE OXIDE OPPOSES ETHYLENE ACTION

EO has been recognized in the volatiles emanating from tissue slices and homogenates of fruit. It has also been identified in very low concentrations in volatiles of intact fruit. The physiological significance of this finding was realized in the fact that EO was observed to inhibit ethylene production and ripening of intact fruit (Lieberman and Mapson, 1962). This has led to the idea that EO may play an important role in plant metabolism.

In one of the earliest experiments involving EO, green tomato fruits were exposed to an atmosphere containing 0.75% EO for 16-22 h (Lieberman and Mapson, 1962). The treated fruits ripened at 20°C after a delay of 5-21 days depending on the ripeness of the fruit at the start of the experiment. The tissues of fruits that were exposed to EO concentrations of over 2% or tissues of fruits that had 2-3 days extended exposure were irreparably damaged and did not ripen at all after



the atmosphere was removed. However, fruits that were already in the "Climacteric stage" and producing fairly large amounts of ethylene, when they were exposed to the EO, were not affected. Ethylene production and ripening are inhibited so long as EO remained in the tissues (Lieberman *et al.*, 1964). After dissipation of absorbed EO by expulsion or reaction in the tissues, the fruits resume ripening in a normal manner without any alteration in the palatability, colour or texture of the fruits. In this manner EO acts as an anti-ageing metabolite of ethylene metabolism. From this it was concluded that EO possessed an anti-ageing effect, in that it retarded the ripening process and stalled ethylene production in pre-climacteric fruits. Studies carried out on roses and carnations revealed that the mechanism of action of EO in the retardation of the ripening process and inhibition of ethylene production involved water retention. This is in contrast to the effect of ethylene in the ripening process which is alteration of the permeability of cell membranes and increasing water loss (Lieberman *et al.*, 1964).

More recent studies involving EO treatment of preclimacteric banana fruits yielded similar results (Williams *et al.*, 2003). A variation of treatments resulted in a delay of banana ripening as long as 4-6 weeks depending on the concentrations used and the number of applications applied. When a proper concentration of EO was applied to some fruits during the preclimacteric period, ethylene production was suppressed and ripening was often retarded. While residual EO remained in the tissues of exposed fruits, ripening was retarded (Lieberman *et al.*, 1964; Williams *et al.*, 2003). After dissipation of the absorbed EO, either by expulsion or reaction within the tissues, the fruit resumed production of ethylene in a normal manner. Sensitivity to EO varies considerably among different fruit tissues. The higher the rate of ethylene production at the time of treatment, the higher the concentration of EO required suppressing ripening.

The antagonistic effect of ethylene oxide on ethylene action was also demonstrated with roses and carnations (Lieberman *et al.*, 1964). Senescence in these flowers was significantly delayed after treatment with appropriate concentrations of ethylene oxide. A significant indicator of the possible role of EO in plant metabolism lies in the partial prevention of the triple response assay for ethylene when both ethylene and ethylene oxide were simultaneously applied to etiolated seedlings (Lieberman *et al.*, 1964). Although the etiolated seedlings were stunted, they did not show epinasty or swollen growing tips.

CONCLUSION

Recognition of EO as an inhibitor of ethylene production in fruits (Lieberman and Mapson, 1962; Williams *et al.*, 2003) presents new possibilities for exploring the pathway of EO biosynthesis and its mode of action. These areas of research will undoubtedly require intense work to be able to adequately assay for ethylene oxide. Because of its reactive nature, it is possible that it is easily converted to other by products and thereby evades detection. Nonetheless it should be interesting to explore these areas of research if only to shed some light on the levels of EO that accumulate in plant tissues and the effects on the tissues themselves. Perhaps the results of such study help us to better understand the use of EO in industry.

ACKNOWLEDGMENT

Thanks to the Research and Publication Committee and the New Initiative Fund (UWI Mona) for supporting this study.

REFERENCES

- Abeles, F.B., 1972. Biosynthesis and mechanism of action of ethylene. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 23: 259-292.
- Abeles, F.B., 1973. Ethylene in Plant Biology. 1st Edn., Academic Press, New York, USA.
- Abeles, F.B., 1984. Role of Ethylene Oxidation in the Mechanism of Ethylene Action. In: Ethylene: Biochemical, Physiological and Applied Aspects, Fuchs, Y. and E. Chalutz (Eds.). Springer, Netherlands, ISBN: 978-94-009-6180-7, pp: 75-85.
- Axelsson, O., 2004. Ethylene oxide and cancer. *Occup. Environ. Med.*, 61: 1-1.
- Beyer, Jr. E.M. and O. Sundin, 1978. $^{14}\text{C}_2\text{H}_4$: Metabolism in morning glory flowers. *Plant Physiol.*, 61: 896-899.
- Beyer, Jr. E.M., 1975. ^{14}C -ethylene incorporation and metabolism in pea seedlings. *Nature*, 255: 144-147.
- Beyer, Jr. E.M., 1977. $^{14}\text{C}_2\text{H}_4$: Its incorporation and oxidation to $^{14}\text{CO}_2$ by cut carnations. *Plant Physiol.*, 60: 203-206.
- Blomstrom, D.C. and E.M. Beyer Jr., 1980. Plants metabolise ethylene to ethylene glycol. *Nature*, 283: 66-68.
- Buchalla, R., C. Schuttler and K.W. Bohl, 1995. Radiation sterilization of medical devices. Effects of ionizing radiation on ultra-high molecular-weight polyethylene. *Radiat. Physics Chem.*, 46: 579-585.
- Dodds, J.H., S.K. Musa, P.H. Jerie and M.A. Hall, 1979. Metabolism of ethylene to ethylene oxide by cell-free preparations from *Vicia faba* L. *Plant Sci. Lett.*, 17: 109-114.
- Giaquinta, R. and E.M. Beyer Jr., 1977. $^{14}\text{C}_2\text{H}_4$: Distribution of ^{14}C -labeled tissue metabolites in pea seedlings. *Plant Cell Physiol.*, 18: 141-148.
- Hall, W.C., C.S. Miller and F.A. Herrero, 1961. Studies with ^{14}C labelled ethylene. Proceedings of the 4th International Conference on Plant Growth Substances, August 10-14, 1959, New York, pp: 751-778.
- Hartmans, S., F.J. Weber, D.P.M. Somhorst and J.A.M. de Bont, 1991. Alkene monooxygenase from mycobacterium: A multicomponent enzyme. *J. Gen. Microbiol.*, 137: 2555-2560.
- Hucker, G. and A. Kramer, 2001. Validation of ethylene oxide-sterilization using a new measuring system. *Biomed. Tech. (Berl)*, 46: 150-153.
- Jerie, P.H. and M.A. Hall, 1978. The identification of ethylene oxide as a major metabolite of ethylene in *Vicia faba* L. *Proc. R. Soc. London Ser. B. Biol. Sci.*, 200: 87-94.
- Lambert, B.J., T.A. Mendelson and M.D. Craven, 2011. Radiation and ethylene oxide terminal sterilization experiences with drug eluting stent products. *AAPS PharmSciTech.*, 12: 1116-1126.
- Lieberman, M. and L.W. Mapson, 1962. Inhibition of the evolution of ethylene and the ripening of fruit by ethylene oxide. *Nature*, 196: 660-661.
- Lieberman, M., S. Asen and L.W. Mapson, 1964. Ethylene oxide an antagonist of ethylene in metabolism. *Nature*, 204: 756-758.
- Liteplo, R.G., M.E. Meek and W. Bruce, 2001. Ethylene oxide: Hazards characterization and exposure-response analysis. *J. Environ. Sci. Health*, 19: 219-265.
- Mendes, G.C.C., T.R.S. Brandao and C.L.M. Silva, 2007. Ethylene oxide sterilization of medical devices: A review. *Am. J. Infect. Control*, 35: 574-581.
- Shimokawa, K. and Z. Kasai, 1968. A possible incorporation of ethylene in RNA in Japanese morning glory seedlings. *J. Agric. Biol. Chem.*, 32: 680-682.



- Shore, R.E., M.J. Gardner and B. Pannett, 1993. Ethylene oxide: An assessment of the epidemiological evidence on carcinogenicity. *Br. J. Ind. Med.*, 50: 971-997.
- Smith, A.J., J. Bagg, D. Hurrell and S. McHugh, 2007. Sterilisation of re-usable instruments in general dental practice. *Br. Dental J.*, (In Press). 10.1038/bdj.2007.912
- Smith, P.G., M.A. Venis and M.A. Hall, 1985. Oxidation of ethylene by cotyledon extracts from *Vicia faba* L. *Planta*, 163: 97-104.
- Valdez-Flores, C., R.L. Sielken Jr. and M.J. Teta, 2010. Quantitative cancer risk assessment based on NIOSH and UCC epidemiological data for workers exposed to ethylene oxide. *Regulatory Toxicol. Pharmacol.*, 56: 312-320.
- Varner, J.E. and D.T. Ho, 1976. *Plant Biochemistry*. 3rd Edn., Academic Press, New York, USA.
- Williams, O.J., G.S.V. Raghavan, K.D. Golden and Y. Gariepy, 2003. Postharvest storage of giant Cavendish bananas using ethylene oxide and sulphur dioxide. *J. Sci. Food Agric.*, 83: 180-186.
- Yang, S.F. and N.E. Hoffman, 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 35: 155-189.

