



Università degli Studi dell'Insubria
Corso di Dottorato di Ricerca in Scienze
Ambientali – XXIII Ciclo

**Predisposizione e Valutazione critica di
scenari di esposizione in ambito REACh:
sostanze ad attività disendocrina (*Ftalati*)**

Dottoranda: Tiziana Sforza

Tutor: Prof. Domenico Maria Cavallo

Co-Tutor: Prof. Angelo Moretto – Dott.ssa Francesca Metruccio

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	3
1.1 REACh ed aspetti legislativi.....	3
1.2 Sostanze ad attività disendocrina.....	8
1.3 Sostanze ad attività disendocrina (alcuni esempi):	13
1.3.1 Ftalati.....	23
1.4 Scopo dello studio	36
2 Materiali e Metodi.....	38
2.1 Approccio modellistico: ConsExpo	38
2.2 Scenari di esposizione predisposti.....	43
3. Risultati.....	50
3.1 Valutazione dell' Esposizione.....	50
3.2 Valutazione del Rischio	57
4. Discussione.....	63
5. Conclusioni	65
6. Appendice.....	68
6.1 Cos'è la valutazione del rischio?	68
6.2 Definizioni secondo regolamento REACh:	70
7. Bibliografia	72

1. INTRODUZIONE

1.1 REACh ed aspetti legislativi

Il REACh (acronimo di Registration, Evaluation and Authorization of Chemical) è un regolamento comunitario in vigore dal 1° giugno 2007 che mira a disciplinare la maggior parte degli aspetti della produzione, dell'importazione e della commercializzazione dei prodotti chimici.

Prima del REACh, l'impalcatura normativa comunitaria che regolava il mondo delle sostanze e dei preparati pericolosi era basata su alcuni pilastri, rappresentati dalla Direttiva 67/548/CEE, concernente le sostanze pericolose, dalla Direttiva 1999/45/CE, concernente i preparati pericolosi, dal Regolamento 850/2004, concernente i POPs¹, e dalla Direttiva 76/769/CEE, riguardante le restrizioni all'immissione in commercio. Numerosi, erano tuttavia i problemi, quali il numero limitato delle sostanze ufficialmente censite, l'eccessiva macchinosità delle procedure e la carenza di informazioni, soprattutto in merito alle sostanze esistenti da tempo sul mercato europeo.

- Le fasi del sistema REACh:

- **Registration (Registrazione)** – Si tratta del primo stadio del sistema. Non si potrà fabbricare, importare o utilizzare un agente chimico, in quantitativi superiori ad una tonnellata per anno, se esso non sarà registrato (secondo il principio "*no data, no market*").

¹ POP: inquinanti organici persistenti

- **Evaluation (Valutazione)** – Stadio successivo alla registrazione è la valutazione dei dati ricevuti e registrati. Essa sarà condotta in stretta sinergia tra le autorità nazionali e quelle comunitarie.

- **Authorisation (Autorizzazione)** – Tale processo di Autorizzazione è previsto per le sostanze particolarmente pericolose sia per l'ambiente che per la salute umana, ovvero le sostanze definite C/M/R² di cat. 1 e 2, i PBT³, i vPvB⁴ ed i distruttori endocrini. Tali sostanze dovranno essere indicate in appositi elenchi (Allegato XIV).

- **Restrictions (Restrizioni)** – Tale strumento verrà utilizzato prescindendo dai livelli quantitativi e vedrà una applicazione più radicale rispetto alla autorizzazione.

Tutta la responsabilità ricadrà sul sistema industriale, che dovrà fornire i dati e dovrà valutare i rischi connessi all'uso della sostanza. Le aziende utilizzatrici saranno tenute a fornire informazioni sull'uso e sui possibili rischi delle sostanze impiegate. Saranno i produttori (e gli importatori da Paesi extra UE) di sostanze chimiche, gli attori principalmente coinvolti.

- I principi del sistema REACH:

1) la responsabilità delle imprese in merito alle sostanze ed ai prodotti immessi sul mercato (all'informazione sulle loro caratteristiche ed i rischi loro associati, alle modalità della loro utilizzazione etc.);

² C,M,R: Cancerogene, Mutagene, Tossiche per la Riproduzione

³ PBT: Persistenti, Bioaccumulanti e Tossiche

⁴ vPvB: molto persistenti e molto Bioaccumulanti

- 2) procedure facilitate per la registrazione delle sostanze prodotte o importate in piccoli tonnellaggi (da una a dieci tonnellate);
- 3) per le categorie di tonnellaggi medio e bassi (da 10 a 100 tonnellate per anno), gli obblighi di registrazione sono modulati in funzione della capacità dell'industria di provare che essa controlla adeguatamente le proprie sostanze (con sviluppo di test e scenari di esposizione sicuri);
- 4) le imprese che registrano una stessa sostanza sono incoraggiate a presentare un dossier comune di registrazione; ciò implica un sistema di condivisione dei dati e genera una riduzione dei costi particolarmente a favore delle piccole e medie imprese;
- 5) maggiore flessibilità per le sostanze usate nelle attività di ricerca e di sviluppo. La ricerca deve essere incoraggiata poiché essa favorisce il principio di sostituzione offrendo così delle alternative più sicure rispetto a prodotti pericolosi;
- 6) il principio di sostituzione è rinforzato: le imprese devono essere spinte a rimpiazzare i prodotti pericolosi con degli altri prodotti meno pericolosi, quando esistono delle alternative;
- 7) le procedure di autorizzazione delle sostanze più pericolose sono rese più severe: l'autorizzazione data ad una sostanza chimica ha una durata di cinque anni, in seguito bisogna ripresentare una domanda all'Agenzia europea. Ciò dovrebbe stimolare, da parte delle industrie, la ricerca di alternative più sicure e dunque la sostituzione;
- 8) indicazioni per ridurre al minimo i test sugli animali;

9) l'informazione degli utilizzatori di prodotti chimici e di consumatori è rinforzata.

- Il sistema REACh e gli Scenari di esposizione:

Il regolamento (Titolo 1, Capo 2, Art. 3 n.37) introduce formalmente l'utilizzo degli Scenari di Esposizione: *“l'insieme delle condizioni, comprese le condizioni operative e le misure di gestione dei rischi, che descrivono il modo in cui la sostanza è fabbricata o utilizzata durante il suo ciclo di vita e il modo in cui il fabbricante o l'importatore controlla o raccomanda agli utilizzatori a valle di controllare l'esposizione delle persone e dell'ambiente. Questi scenari d'esposizione possono coprire un processo o un uso specifico o più processi o usi specifici, se del caso”*.

Specifici scenari d'esposizione legati ad un determinato uso, saranno allegati ai rapporti di Valutazione della Sicurezza Chimica (Chemical Safety Reports, CSR) per quelle sostanze che sono fabbricate o importate in quantità uguale o superiore ad 1 tonnellata annua o che soddisfano i criteri di classificazione come “problematiche” (Allegato XIV: Elenco delle sostanze soggette ad Autorizzazione) (1). Per le suddette sostanze, l'industria è obbligata a presentare uno scenario di esposizione, con i relativi risultati, per ogni destinazione d'uso (della sostanza stessa) che l'industria vuole proporre.

Strumenti del regolamento REACh

Con la nuova normativa REACh, comincia una nuova era in cui le industrie chimiche e le autorità Europee cooperano al fine di migliorare la sicurezza ed il controllo della produzione, importazione ed uso di sostanze chimiche in Europa. Se una industria omette di presentare un dossier di registrazione su una sostanza, entro i termini prestabiliti dal regolamento REACh, la sostanza non può essere prodotta, importata od immessa sul mercato europeo. Senza un appropriato strumento informatico, potrebbe essere estremamente difficile per le industrie, specialmente per le piccole e medie imprese, conformarsi alle richieste di dati imposte dal regolamento.

IUCLID: (International Uniform Chemical Information Database) è un software per registrare, immagazzinare, mantenere e scambiare dati sulle proprietà intrinseche di pericolo delle sostanze chimiche. IUCLID ha lo scopo di assistere le industrie chimiche in tutte le procedure di presentazione dei dati all'agenzia responsabile.

Il software facilita la realizzazione di dossier di registrazione (REACh richiede la presentazione dei dati secondo il formato IUCLID).

SIEF: Forum per lo scambio di informazioni sulle sostanze

Per ogni sostanza pre-registrata con la stessa identità, sarà creato un forum per lo scambio di informazioni sulle sostanze. Ai SIEF parteciperanno tutti coloro che abbiano eseguito una pre-registrazione (ossia potenziali dichiaranti e titolari di dati) (50).

I SIEF sono dunque strumenti indispensabili per i “registratori” sia per risparmiare tempo e denaro per la registrazione di sostanze già pre-registrate, sia per snellire i processi di registrazione secondo il regolamento REACH.

1.2 Sostanze ad attività disendocrina

Nel corso del ventesimo secolo il mondo ha sviluppato importanti progressi tecnologici ed industriali. Tali sviluppi però, hanno avuto diverse conseguenze negative, tra cui un rischio sempre crescente derivante dagli effetti dei prodotti, dei sottoprodotti e dagli scarti derivanti dall’attività industriale.

Tra i diversi rischi vi è anche quello di poter esercitare indesiderati effetti tossici, anche sull’apparato riproduttore. Fu solo a metà degli anni ’90 che si iniziò a concretizzare il concetto della “tossicologia riproduttiva” con l’avvento di maggiori e sempre più dettagliate conoscenze nel campo degli interferenti endocrini.

La Commissione Europea ed altri organismi internazionali (OECD⁵, WHO⁶) indicano, come esigenza prioritaria, l’incremento delle conoscenze sugli “Endocrine Disrupting Chemicals” (EDC). Gli EDC sono un eterogeneo gruppo di sostanze caratterizzate dalla capacità potenziale di interferire, attraverso svariati meccanismi d’azione, con il funzionamento del sistema endocrino e della tiroide, in particolare con l’omeostasi degli ormoni sessuali. La riproduzione e lo sviluppo pre- e postnatale sono le fasi biologiche più sensibili agli effetti tossici dovuti all’esposizione di sostanze esogene, come gli EDC. Studi epidemiologici suggeriscono che vi sia una correlazione fra esposizione a specifici gruppi di EDC

⁵ OECD: Organization for Economic Co-operation and Development

⁶ WHO: World Health Organization

ed alterazioni dell'apparato riproduttivo, quali ad esempio malformazioni, infertilità, aumentato rischio di seminomi e di endometriosi. Lo spettro di patologie correlabili a questi composti è comunque molto ampio e comprende anche l'aumento del numero di aborti precoci associato all'esposizione professionale, effetti a lungo termine sulla funzionalità tiroidea o riproduttiva, in seguito a danni indotti in utero o durante l'infanzia, patologie metaboliche correlabili con un'alterata omeostasi di estrogeni e androgeni.

Numerosi punti restano tuttavia ancora da chiarire, tra questi, i meccanismi biologici alla base di tale correlazione e gli eventuali fattori di suscettibilità e/o di rischio concomitanti. Manca in particolare una conoscenza approfondita dell'intero spettro di patologie potenzialmente associabili all'esposizione a EDC.

Gli Interferenti endocrini sono sostanze che mimano gli ormoni endogeni o che interferiscono con la farmacocinetica o ancora che operano secondo entrambi i suddetti meccanismi. La definizione classica di EDC è ormai unanimemente accettata: *“Una sostanza esogena che interferisce con la produzione, il rilascio, il trasporto, il metabolismo, il legame, l'azione o l'eliminazione degli ormoni naturali dell'organismo, responsabili del mantenimento dell'omeostasi e della regolazione dei processi di sviluppo”*.

I loro effetti finora osservati, mediante studi *in vivo* e *in vitro*, sono la compromissione della capacità riproduttiva, la presenza di difetti morfologici o funzionali alla nascita, lo sviluppo del cancro o alcune alterazioni del sistema immunitario.

Le ricerche finora condotte portano alle seguenti cinque conclusioni principali:

- 1) I livelli di esposizione sufficienti a causare profondi e significativi effetti a livello fisiologico in esperimenti di laboratorio non sono molto elevati.

2) I distruttori endocrini sono un gruppo eterogeneo di contaminanti persistenti e bioaccumulanti che si ritrovano all'interno di numerose classi di sostanze chimiche, dei quali, fino a poco tempo fa, si ignoravano gli effetti sul sistema endocrino.

3) L'esposizione dell'uomo a queste sostanze è ubiquitaria.

4) Tutti i sistemi ormonali finora esaminati sono risultati sensibili all'interferenza endocrina.

5) L'esposizione in utero ad un numero crescente di sostanze chimiche ha avuto un grosso impatto sullo sviluppo, producendo risultati visibili precocemente alla nascita o tardivamente in età adulta.

Molti composti sospettati di essere EDC, sono sostanze di ampio impiego ed economicamente importanti che quindi richiedono delle adeguate soluzioni per un loro utilizzo consapevole.

Gli EDC hanno carattere lipofilo e questo permette loro di diffondersi attraverso la membrana cellulare, di legare eventualmente i recettori per gli ormoni steroidei e di accumularsi nel tessuto adiposo. Il loro bio-accumulo ha sicuramente una notevole importanza dal punto di vista tossicologico, così come la biomagnificazione dalla base al vertice della catena alimentare.

Classificazione degli EDC

➤ In via generale è possibile raggruppare questi composti in cinque categorie principali:

1) Farmaci o estrogeni sintetici (come ad esempio il 17-estradiolo o l'estrogeno sintetico dietilstilbestrolo, DES).

2) Fitoestrogeni, tra cui:

- isoflavonoidi (genistein e daidzein della soia);
- cumestani (coumestrol);
- lignani (secoisolariciresinolo e matairesinolo);
- stilbeni (resveratrolo dell'uva).

3) Alcuni Pesticidi (es. DDT),

4) Plastificanti (in particolare, gli **ftalati**) e prodotti derivanti dalla combustione del PVC (ma anche della carta e delle sostanze putrescibili).

5) Sostanze di origine industriale come:

- fenoli;
- ritardanti di fiamma;
- acido perfluorooctanico e suoi sali;
- diossine;
- alcuni metalli pesanti (piombo, cadmio e mercurio).

➤ Un altro modo di classificare queste sostanze è secondo la loro origine:

1) Naturale (fitoestrogeni ed estrogeni).

2) Sintetica, ulteriormente suddivisibili in:

- estrogeni sintetici, a loro volta distinti in:

o farmaceutici (dietilstilbestrolo);

o industriali tra cui: pesticidi, conservanti, solventi e plasticizzanti;

- antiestrogeni sintetici, a loro volta suddivisi in:

o farmaceutici (tamoxifen);

o industriali (diossine).

Effetti generali: aumento delle anomalie dell'apparato riproduttivo

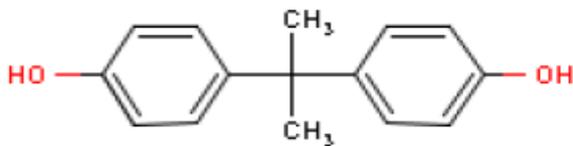
Negli ultimi decenni si è assistito, in alcuni paesi, ad un aumento dell'incidenza di tumori testicolari e ad un probabile aumento dell'incidenza di alcune anomalie del tratto genitale maschile, quali il criptorchidismo e l'ipospadia. Parallelamente, esisterebbero prove di un declino nella qualità dello sperma ed un decremento del numero medio di spermatozoi per eiaculato.

È stata avanzata l'ipotesi che questi cambiamenti possano essere stati causati da un aumento del livello di EDC, ad azione estrogeno-simile, nell'ambiente. L'esperienza clinica dimostra che può esservi un'eziologia comune alla base di tutte le anomalie osservate: il *seminoma* e il *criptorchidismo*, così come l'*ipospadia*, sono spesso associate a un quadro istologico di alterazioni della spermatogenesi. Le basi biologiche per la suscettibilità del testicolo agli effetti negativi, dovuti ad un incremento degli estrogeni, risiedono negli effetti di questi ormoni sullo sviluppo e la funzione delle cellule del Sertoli nel testicolo fetale. La proliferazione e la funzione delle cellule del Sertoli sono entrambi fenomeni controllati dall'ormone FSH (follicolo-stimolante), il quale regola probabilmente anche la secrezione dell'ormone antimulleriano, responsabile, nei maschi, della regressione dei dotti mulleriani (primordio embrionale dell'apparato genitale femminile). Una diminuzione nella secrezione di FSH causata da un aumento degli estrogeni nel circolo materno-fetale può avere pertanto un effetto negativo sulla proliferazione delle cellule del Sertoli e sulla secrezione dell'ormone antimulleriano. Un'alterata secrezione di tale ormone sembra portare a differenti tipi di condizioni intersessuali o al criptorchidismo. Gli eventi critici nello sviluppo testicolare accadono in un periodo molto precoce dello sviluppo fetale, quando l'incremento nei livelli di estrogeni circolanti nel sangue materno non ha ancora

avuto luogo. Un aumento nei livelli basali di estrogeni in questa fase dello sviluppo può avere un effetto deleterio sullo sviluppo degli organi riproduttivi. Gli estrogeni endogeni sono legati, per mezzo di un legame ad alta affinità, alla SHBG (“Sex Hormone Binding Globulin”), quindi più biodisponibili, mentre gli estrogeni sintetici non lo sono, per questo gli estrogeni sintetici potrebbero produrre effetti biologici rilevanti anche se presenti a basse concentrazioni (2).

1.3 Sostanze ad attività disendocrina (alcuni esempi):

- Bisfenolo A:



Il Bisfenolo A, comunemente abbreviato con BPA, è un composto organico con due gruppi funzionali fenolici (8). Dal punto di vista chimico-fisico, il BPA ha l'aspetto di cristalli bianchi (o marrone chiaro), peso molecolare di 228 g/mol, densità relativa pari a 1,2 (acqua=1), coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua pari a 3.32, solubilità in acqua pari a 120-301 mg/L a 20-25°C ed una tensione di vapore pari a 5.3×10^{-6} Pa a 25°C.

- Uso ed esposizione

Il BPA è utilizzato nella fabbricazione di materiali polimerici che trovano impiego in un'ampia varietà di prodotti di consumo. Tali polimeri includono resine epossidiche, poliesteri-stirenici e plastiche policarbonate.

Le resine epossidiche vengono specificatamente impiegate nella rifinitura di contenitori metallici, di coperchi di barattoli per uso alimentare e di parti di automobili, o come adesivi e stabilizzanti per il PVC.

Le plastiche policarbonate sono utilizzate per bottiglie di plastica, biberon, CD, DVD ed imballaggi per alimenti. Ulteriori applicazioni del BPA sono la produzione di ritardanti di fiamma, di rivestimenti protettivi e materiali composti impiegati nel settore odontoiatrico (11,12,13).

Il loro uso è veramente ubiquitario ed a causa del crescente utilizzo di prodotti a base di resine e materiali in policarbonato, nell'ultimo decennio l'esposizione della popolazione generale a BPA è aumentata.

Contributo dell'Acqua: Per le caratteristiche chimico-fisiche, il BPA non viene eliminato dall'acqua per volatilizzazione o idrolisi ma tramite un processo di fotolisi. E' stato dimostrato che la fotolisi dipende dal pH, dal grado di torpidità, dalla turbolenza e dalla luce solare. In acqua, l'emivita di foto-ossidazione del BPA è stimata da 66 ore a 160 giorni, quella di biodegradazione tra 2,5 e 4 giorni (16,14).

I trattamenti di depurazione della acque di scarico di industrie produttrici di BPA possono essere fonti di contaminazione per l'ambiente acquatico.

Inoltre in vari studi si evidenzia che il BPA è maggiormente persistente in acque salate rispetto alle acque dolci, in quanto non subisce alcuna degradazione da parte dei microrganismi aerobici presenti nei fiumi. Per tale motivo i prodotti ittici di origine marina possono presentare valori più elevati di BPA rispetto a quelli fluviali. (12).

Contributo della dieta

Il BPA è presente in bevande, verdure, prodotti di origine animale e per l'infanzia. Si ritiene però che la principale fonte di BPA associata alla dieta siano i contenitori per alimenti.

I principali fattori che influenzano il passaggio di BPA negli alimenti sono la durata e la temperatura di riscaldamento durante la fase di inscatolamento. Anche il contatto con composti acidi o basici, la presenza di elevati livelli di cloruro di sodio o di oli vegetali, è in grado di provocare un incremento del rilascio di BPA dai materiali polimerici.

Ulteriori ricerche sul rilascio del BPA dalle plastiche policarbonate hanno confermato la presenza di livelli crescenti di questo inquinante dopo lavaggi e sterilizzazione con soluzioni alcaline ed acqua calda.

In una review del 2006 (12) è riportato il contenuto di BPA in alimenti in scatola (carne, pesce, verdura e frutta, bevande e latticini). In tre differenti studi condotti su un numero limitato di campioni di carne -da 5 ad 8-, la concentrazione media di BPA variava da 21 ng/g a 139 ng/g. Nelle ricerche condotte da Imanaka (17) e da Goodson (18), studi citati nella review, il livello massimo di BPA è risultato sensibilmente più elevato, pari rispettivamente a 602 ng/g e 380 ng/g. Viceversa, l'analisi di campioni di pesce ha evidenziato concentrazioni di BPA sensibilmente inferiori, con un valore medio compreso tra 22 ng/g e 30 ng/g (19). In cinque differenti studi su vegetali e frutta in scatola, la concentrazione media variava da 6 ng/g a 42 ng/g. Relativamente alle bevande, la stessa sostanza non è risultata quantificabile negli studi di Goodson (18) e di Thomson e Ground (20).

L'EFSA (European Food Safety Authority) ha valutato l'esposizione umana al bisfenolo A tramite biomonitoraggio dell'escrezione urinaria dei suoi metaboliti nella popolazione generale, arrivando ad un valore complessivo medio dell'esposizione giornaliera al BPA di non oltre 7 microg BPA/adulto/die ed esposizioni nella fascia superiore di non oltre 10 microg BPA/adulto/die negli USA e di 0,04 e fino a 0,08 microg/kg di peso corporeo/die in Giappone. La discrepanza che si osserva tra i livelli di esposizione calcolati tramite i biomarcatori urinari ed i livelli di esposizione calcolati associando i dati sul consumo con le concentrazioni di BPA presenti nella dieta è molto probabilmente dovuta ai presupposti conservativi adottati (8).

Effetti sulla salute

Il Bisfenolo A presenta bassa tossicità acuta, con un LD50 orale di 3250 mg/kg nei ratti. Basse dosi di bisfenolo A possono mimare la normale attività degli ormoni endogeni all'interno del corpo umano, determinando possibili effetti avversi sulla salute umana. Per questo motivo, è possibile che un'esposizione prolungata a basse dosi di bisfenolo A possa indurre tossicità cronica nell'uomo. La prima evidenza di estrogenicità del bisfenolo A deriva da esperimenti condotti su ratti nel 1930, ma non prima del 1997 si sono riportati gli effetti avversi che l'esposizione a basse dosi provoca su animali da laboratorio (Tab.1).

Tab. 1 Studi di esposizione a bassa dose di BPA in animali

Dose di effetto (µg/kg/day)	Effetti (su ratti e topi)	Anno dello studio
0.025	Cambiamenti permanenti al tratto genitale	2005 (51)
0.025	Cambiamenti al tessuto mammario che predispone le cellule a cancerogenesi e variazioni ormonali	2005 (52)
1	Effetti avversi a lungo termine al sistema. riproduttivo ed effetti cancerogeni	2009 (53)
2	Incremento peso prostata 30%	1997(54)
2	Diminuzione del peso corporeo, incremento delle distanza ano-genitale in entrambi i sessi , segni di pubertà anticipata e un più lungo estrus.	2002 (55)
2.4	Declino di testosterone a livello dei testicoli	2004 (56)
2.5	Predisposizione cancro alla mammella	2007 (57)
10	Prostate più sensibile alle variazioni ormonali ed al cancro	2006 (58)
10	Diminuzione comportamento materno	2002 (59)
30	Inversione delle normali differenze di struttura e comportamento tra i sessi	2003 (60)
50	Effetti avversi neurologici	2008 (61)
50	Annichilimento dello sviluppo delle ovaie	2009 (62)
50	U.S. Limite di esposizione umana (non un risultato da studi su animali, ma una linea-guida fornita da EPA)	1998 (63)

- *Studi condotti sull'animale*

Il BPA è uno degli estrogeni ambientali maggiormente studiati. Possiede una struttura analoga a quella del dietilstilbestrolo (DES), un potente estrogeno di sintesi la cui esposizione in fase prenatale può essere causa di anomalie genitali e tumori dell'utero (26).

Negli anni '90 erano già noti gli effetti estrogenici del BPA, sia *in vitro* sia *in vivo*. In vitro il BPA è attivo a concentrazioni molto contenute (6 ppb) (27) ed induce l'espressione dei geni controllati dagli estrogeni e promuove la proliferazione della linea cellulare di tumore mammario MCF-7 a concentrazioni notevolmente più elevate rispetto a quelle dell'estradiolo (25).

Inoltre dalla letteratura sono emerse evidenze in merito ad un'attività antagonista del BPA sul recettore degli androgeni (34,35). Ricerche sul modello murino (36) hanno inoltre proposto un coinvolgimento del BPA nel meccanismo di regolazione degli ormoni tiroidei. Il composto, interagendo con i recettori degli ormoni tiroidei (TRs) (37), da una parte inibisce l'azione della triiodotiroidina (T3) (38,39), dall'altra stimola la proliferazione di linee cellulari che rispondono all'azione dell'ormone tiroideo (40).

Studi effettuati da Alonso-Magdalena nel 2005 (29) hanno mostrato che l'esposizione a dosi relativamente basse (10 µg/Kg/giorno) e corrispondenti al *Tolerance Daily Intake* (TDI) stabilito da *Scientific Committee on Food* sembra essere correlata all'insorgenza di un quadro di insulino-resistenza, aspetto caratteristico del diabete di tipo II.

- *Studi condotti sull'uomo*

In letteratura, solo un ristretto numero di studi ha valutato l'associazione tra esposizione a BPA e l'insorgenza di alterazioni a carico del processo riproduttivo e dello sviluppo nella specie umana.

Alcuni autori (42,43,44,45,46) affermano che livelli elevati di BPA in urina o in campioni ematici sono correlati con

- 1) aumento del testosterone in entrambi i sessi (42,43)
- 2) diminuzione dell'ormone follicolo stimolante (FSH) in soggetti professionalmente esposti (44)
- 3) sindrome dell'ovaio policistico (42,43)
- 4) aborti ricorrenti (45)
- 5) anomalie cromosomiche in età fetale (46).

Tuttavia, è necessario tener presente che i dati sopra elencati, essendo stati ottenuti da una casistica limitata, non permettono di trarre conclusioni certe riguardo gli effetti del BPA sulla riproduzione e sullo sviluppo nell'uomo.

- Polibromurati:

I ritardanti di fiamma bromurati sono composti usati per evitare o ritardare l'estendersi di fiamme in caso di incendio. Questi composti sono comunemente utilizzati in molti settori industriali tra cui quello tessile, elettronico e per la produzione degli imballaggi di plastica (65). Nonostante il termine indichi un

gruppo molto vasto di composti (65,66), le sostanze comunemente usate nel passato e/o tuttora in uso sono i polibifenili bromurati (PBB), parenti stretti dei PCB, i difenileteri polibromurati (PBDE, o difenilossidi polibromurati PBDO), l'esabrociclododecano (HBCD), ed il tetrabromobisfenol-A (TBBP-A) (65,67,68).

I rischi ambientali e sanitari di PBB, PBDE e HBCD hanno portato ad una netta riduzione del loro uso a livello europeo (69), mentre per il TBBP-A le produzioni sono tuttora in aumento.

I ritardanti di fiamma bromurati sono composti estremamente stabili e tendono a legarsi alla materia grassa e, nonostante molti di questi siano molecole "ingombranti", troppo grandi per accumularsi negli organi, esistono chiare dimostrazioni scientifiche che indicano che gli organismi che le assumono sono comunque in grado di assimilarli.

I ritardanti di fiamma possono essere presenti in percentuali comprese tra il 10 ed il 30% della massa di molte delle plastiche comunemente usate (65,66). Il TBBP-A viene usato sia come additivo che come reagente soprattutto nei componenti interni di computer ed altri apparecchi elettronici (65). Anche nel caso di utilizzo di questi composti come reagenti, una percentuale rimane non fissata nel prodotto ed è quindi soggetta ad essere immessa in ambiente a seguito dell'usura del manufatto. Il gran numero di applicazioni, l'elevata quantità usata e la facilità di rilascio in fase produttiva, di utilizzo e di smaltimento hanno reso i composti polibromurati i più diffusi tra gli inquinanti ubiquitari immessi sia da fonti puntiformi che estese.

Distribuzione ambientale

La maggior parte dei dati riguarda la presenza di PBB e solo di recente sono state raccolte informazioni sulla presenza di PBDE in matrici ambientali (70). Agli inizi degli anni '90 è stato riscontrato un aumento delle concentrazioni di composti con 4 e 5 atomi di bromo (tetra e penta bromobifenili) in sedimenti del Mar Baltico (71, 72, 73, 74).

La presenza di questi inquinanti è stata anche individuata nei tessuti di foche del Baltico e loro ubiquitarità è stata associata con la contaminazione ambientale in Svezia. Del resto, la presenza di PBDE era già stata notata alla fine degli anni '80 nel fegato di merluzzi del Mare del Nord e lo studio di campioni prelevati nel 1977 (75) ha permesso ai ricercatori di predire uno spostamento della contaminazione che, a partire dalla regione settentrionale del Mare del Nord, si è progressivamente portata al centro e poi nella parte meridionale del bacino.

I composti con pochi atomi di bromo, in particolare i tetra ed i penta-BDE manifestano alta tendenza all'accumulo negli organismi marini con capacità di concentrarsi nei tessuti degli organismi viventi anche superiori a quelle mostrate dai PCB. Secondo alcuni ricercatori, alcuni composti bromurati vengono trasformati dall'organismo in molecole che tendono ad accumularsi ancor più facilmente (76). Questo porta ad una crescita nelle concentrazioni di PBDE lungo la catena alimentare come dimostrato dal fatto che i mammiferi marini presentano concentrazioni dalle 10 alle 30 volte più alte che quelle riscontrate nei tessuti dei pesci (77).

Presenza nei tessuti umani

I PBDE ed altri composti organici bromurati sono stati individuati anche in tessuti umani a partire dalla fine degli anni '90 quando sono stati individuati in tessuti adiposi della popolazione generale svedese (78). Successivi studi condotti in Spagna, Finlandia e Nord America hanno dimostrato la presenza di tetra, penta ed esa-BDE in latte materno con concentrazioni che sono raddoppiate ogni cinque anni a partire dagli inizi degli anni '70 tanto da indurre i ricercatori a proporre l'adozione di un piano di monitoraggio globale sulla qualità di questo insostituibile alimento e di prevenire ogni ulteriore contaminazione (79, 80, 81, 82, 83, 84).

Le fonti principali di assunzione di questi inquinanti non sono ancora certe e, nonostante sia indubbio il contributo fornito dall'alimentazione, esposizioni dirette in ambienti chiusi per il rilascio dei ritardanti di fiamma dagli oggetti che li contengono sono tutt'altro che secondarie (85).

A questo riguardo, alcune ricerche hanno mostrato la presenza di PBDE e TBBP-A nel particolato atmosferico di uffici che ospitavano computer e attorno ad impianti di riciclaggio di componenti elettroniche (86).

Effetti sulla salute

Generalmente i ritardanti di fiamma polibromurati presentano tossicità acuta piuttosto bassa (67,89). Nonostante ciò, è stato dimostrato che l'esposizione prolungata a basse concentrazioni di PBDE, HBCD e TBBP-A può interferire con il corretto sviluppo cerebrale in ratti in caso di esposizione prenatale (90). Alterazioni nel corretto sviluppo fetale sono state riscontrate dopo esposizioni a basse concentrazioni di miscele commerciali contenenti esa, epta ed octa-BDE (89),

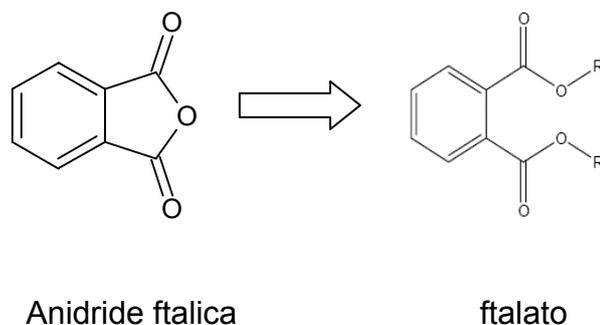
mentre i composti di degradazione dei PBDE e TBBP-A hanno mostrato capacità antagonista con ormoni tiroidei riducendone la concentrazione ematica (91,92).

Più recentemente, alcuni ricercatori hanno dimostrato la capacità di HBCD e PBDE con pochi atomi di bromo di indurre ricombinazioni cromosomiche in cellule di mammifero, una possibile indicazione di cancerogenicità (93), mentre altre ricerche hanno dimostrato notevole affinità tra composti a base di bromo come i PBB ed i PBDE ed i PCB ed pesticidi organici clorurati (67).

1.3.1 Ftalati

Gli ftalati (derivati dell'anidride ftalica, vd. Figura 1) sono liquidi organici che impartiscono flessibilità e resistenza quando aggiunti a materiali plastici (es. PVC). Sono utilizzati da 50 anni nell'industria dei polimeri, nel settore automobilistico ed edilizio (isolante elettrico, pavimentazione) nonché sanitario (per la produzione di sacche ematiche, cateteri,..), ma anche per la produzione di cosmetici, profumi, articoli e giocattoli per l'infanzia.

Fig. 1 anidride ftalica e ftalati



In Tabella 2 sono riassunti i principali esponenti della famiglia degli ftalati, la classificazione Europea ed i prodotti/articoli in cui trovano applicazione.

Tab. 2: Principali ftalati, classificazione Europea ed usi (5):

Acronimo (quota di produzione ⁷)	Nome comune Ftalato di	Classificazione (Dir 67/548/CE)	Presenza in articoli/prodotti
DEHP (51%)	di etil esile	Repr.Cat.2; R60-61	Profumi, Prodotti flessibili in PVC (contenitori per cibo, pellicola trasparente per alimenti, guanti, tende da doccia, pompe per annaffiare, pannolini, sacche ematiche, cateteri ed altri dispositivi medici)
DIDP (21%)	di isodecile	Non classificato	Pareti in Vinile e rivestimento di pavimenti, guanti, carta per avvolgere gli alimenti
DINP (11%)	di isononile	Non classificato	Giocattoli, rivestimento di pavimenti in vinile, guanti, carta per avvolgere gli alimenti, cannuccia, pompe per annaffiare.
DBP (2%)	di butile	Repr.Cat.2; R61 Repr.Cat.3; R62 N;R50	[PVC], profumi, deodoranti, spray per capelli, smalto per unghie, inchiostro di stampa, insetticidi.
DEP (<1%)	di etile	Non classificato	Profumi, deodoranti, gel e mousses per capelli, shampoo, saponi, spray per capelli, smalto per unghie, lozioni per il corpo.

⁷ Una **quota di produzione** rappresenta un limite posto al numero dei produttori presenti sul mercato oppure all'ammontare che ogni produttore può vendere. Solitamente la quota ha lo scopo di limitare la *quantità* che i produttori possono offrire

BBP(<1%)	butilbenzile	Repr.Cat.2, R61 - Repr.Cat.3, R62 -N R50-53	Profumi, spray per capelli, adesivi e colla, prodotti per automobili, rivestimento di pavimenti in vinile.
DCHP(<1%)	dicicloesile	Non classificato	Laboratori di ricerca
DOP(<1%)	diottile	Non classificato	Prodotti composti da plastica flessibile
DMP(<1%)	dimetile	Non classificato	Deodoranti

Non essendo legati alla plastica con legami covalenti possono facilmente essere rilasciati nell'aria o nell'acqua (soprattutto quando l'articolo di plastica viene esposto ad alte temperature), contribuendo all'esposizione ubiquitaria per l'ambiente e per l'uomo (4). In base a sospetti sulla potenziale alterazione dei meccanismi di produzione degli ormoni, effetti sulla riproduzione ed effetti cancerogeni, sono classificate come sostanze pericolose tre ftalati: **DEHP**, **DBP** e **BBP** (6), rientrando "formalmente" nel processo di autorizzazione previsto dalla riforma REACH.

Esposizione umana

La principale via di esposizione è inalatoria, ma anche l'ingestione e la via cutanea giocano un ruolo importante.

L'esposizione per via inalatoria è possibile per tutta la popolazione generale (negli spazi confinati o in associazione a determinate attività), e in maggior misura per il lavoratore (per esempio di una industria di materie plastiche), in quanto esso è altamente esposto ad emissioni di ftalati durante le normali attività industriali, come le operazioni di mescolamento, carico/scarico di materiale plastico, ecc.

L'ingestione invece è molto importante se, come “attore” viene considerato il bambino, in quanto tende a portare qualsiasi oggetto (articolo) alla bocca. Tale via di esposizione porta a considerare i bambini come la popolazione più esposta, oltre che la più suscettibile. Dati forniti dal *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES), dimostrano che la concentrazione di metaboliti nelle urine di bambini compresi tra 6-11 anni è più alta rispetto a quella degli adolescenti e degli adulti (107). In particolare il Centers for Disease Control and Prevention's rileva che i bambini hanno una più alta concentrazione, rispetto agli adulti, di DBP, BBP e DEHP (108,109,110).

L'esposizione cutanea, in generale, gioca un ruolo minore, in quanto l'assorbimento di ftalati attraverso l'epidermide è molto lento.

Secondo un recente studio scientifico (7), gli ftalati sono stati riconosciuti come i principali “indoor pollutants” derivanti dalla lenta emissione da prodotti presenti all'interno di una stanza verso l'atmosfera o verso altri intermedi (polvere di casa). Per questo scenario la principale via di esposizione è l' ingestione (in particolare per gli infanti), poi vi è l'esposizione cutanea (dovuta all'alto coefficiente di ripartizione pelle/aria) e infine quella inalatoria (per le sostanze più volatili e con un più basso peso molecolare).

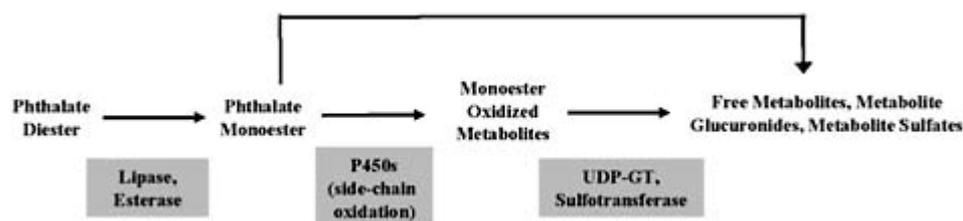
Una ulteriore categoria di soggetti esposti a ftalati è rappresentata dai pazienti sottoposti a dialisi o a frequenti trasfusioni di sangue. Il momento espositivo maggiore deriva dalla diretta immissione degli ftalati nel circolo sanguigno (anche se in piccolissime concentrazioni), dopo il loro rilascio dalle sacche ematiche, dai componenti in plastica delle macchine per dialisi o dai deflussori delle fleboclisi. I neonati ricoverati nelle strutture ospedaliere per trattamenti medici, come le

trasfusioni (111,112) ed i neonati ricoverati nelle terapie intensive, hanno una altissima esposizione a causa dei tanti strumenti medicali fabbricati con PVC contenente ftalati (112,113).

Cenni sul Metabolismo

Nei mammiferi l'assorbimento ed il metabolismo degli ftalati (vedi Fig. 2) è rapido. Una iniziale de-esterificazione di un legame alchilico occorre nella saliva dopo l'ingestione.

Fig. 2 UDP-GT, uridine 5'-diphosphate-glucuronosyltransferase.



I monoesteri che si vengono a formare hanno un acido carbossilico ed un estere sostituito da una catena di uno o più atomi di carbonio. I monoesteri di basso peso molecolare (come il DEP e DBP) sono i metaboliti più ricercati per l'analisi dell'esposizione (114,115) – la principale via di escrezione è l'urina (106,107,116,117,118).

La figura 3 mostra un esempio di via metabolica per il principale ftalato in uso (DEHP).

contenenti concentrazioni oltre questo limite, non possono essere immessi sul mercato;

- **DINP, DIDP e DNOP** non devono essere usati a concentrazioni > 0.1% per la produzione di giocattoli ed altri articoli per l'infanzia destinati ad essere introdotti nella bocca (che possono essere masticati o succhiati); i prodotti contenenti concentrazioni oltre il limite, non possono essere immessi sul mercato.

Effetti sulla salute (riproduzione)

- Effetti nel maschio

Il testicolo è stato identificato come l'organo bersaglio in alcuni degli studi su animali (120). Le prime esperienze hanno indicato che esiste una sensibilità di età: gli animali in età puberale hanno mostrato effetti a dosi inferiori rispetto agli effetti evidenziati nei corrispondenti studi in animali adulti. Le indagini sulle relazioni struttura-attività nel modello puberale-ratto hanno mostrato che la lunghezza della catena laterale legata alla struttura di base dello ftalato doveva essere 4-6 atomi di carbonio per causare tossicità testicolare (121). Gli ftalati di 1-3 atomi di carbonio (metile, etile, e n-propile) non hanno causato tossicità testicolare quando somministrati ad una dose equimolare di DBP a 2 g / kg-d. Allo stesso modo, ftalati con catene di sette o otto atomi di carbonio non hanno causato effetti avversi.

Tuttavia, il DEHP, che ha otto atomi di carbonio ed una struttura ramificata, aveva un'attività più simile a quella dello ftalato di di-n-esil che al suo isomero lineare di-n-ottile ftalato. Una spiegazione è stata data da una indagine degli isomeri, indicando che è necessaria una particolare configurazione della struttura

molecolare (122,123) per poter interagire con ormoni endogeni e produrre così tossicità testicolare.

Un esame morfologico dettagliato degli ftalati che inducono lesioni testicolari nei ratti in età puberale (124,125) e nei ratti adulti (126) ha indicato che la cellula del Sertoli è il bersaglio iniziale nel testicolo e che la perdita di sostegno delle cellule germinali ha portato alla loro desquamazione rapida nel lume seminifero tubolare. Esperimenti *in vitro* con le cellule del Sertoli hanno anche fornito alcune informazioni su un potenziale meccanismo di azione per il modello puberale basato sulla reattività dell'ormone follicolo-stimolante (127,128).

Alcuni autori (129) hanno valutato le differenze di specie nell'induzione di tossicità testicolare di DBP e DEHP in ratti, topi, cavie e criceti: il ratto è risultato il più sensibile tra le specie animali, la cavia sembra avere lo stesso grado di sensibilità, il topo era molto meno sensibile ed il criceto era resistente. Le differenze nella tossicità testicolare sembrano sia dovute in gran parte a differenze di farmacocinetica.

La capacità specifica degli ftalati di modificare lo sviluppo riproduttivo in utero è stata dimostrata per la prima volta, dal National Toxicology Program (130,131), in uno studio su più generazioni nel ratto. In questo studio (vedi Tabella 3), la più alta dose di DBP (1% nella dieta) ha prodotto pochi effetti funzionali sulla generazione dei genitori; si è riscontrato solo una diminuzione in termini di dimensioni della cucciolata. Tuttavia, solo uno dei 20 maschi della seconda generazione (F1) ha prodotto una cucciolata, e questo indica l'importanza di esposizione durante la vita in utero e la prima infanzia. Inoltre si è notato un elevato numero di epididimi sottosviluppati in maschi F1 e la presenza di altre malformazioni rare dell'apparato riproduttivo. Successivamente si è scoperto che il periodo di esposizione, negli

studi standard effettuati sul ratto, è dal 6° al 15° giorno di gestazione (GD 6-15) che non copre la finestra critica di sviluppo.

Esistono infatti indicazioni che per gli ftalati il periodo critico di esposizione è GD 15-17 (132).

Tab. 3 Effetti del DBP sulla riproduzione e sullo sviluppo

Effetti notati	F ₀ Generazione	F ₁ Generazione
Diminuzione della fertilità	-	+
Diminuzione dimensioni dei piccoli	+	+
Diminuzione peso testicoli	-	+
Diminuzione peso dei piccoli	+	+
Diminuzione nella conta spermatica	-	+
Criptorchidismo	Non applicabile	+
Malformazioni del tratto riproduttivo maschile (epididimo, genitali esterni)	Non applicabile	+
Malformazioni del tratto riproduttivo femminile	-	-
Ciclo mestruale	-	-

Note: +, risposta positiva; -, risposta negativa

Dal momento in cui si è scoperta l'importanza del periodo di esposizione (GD 15-17), sono stati condotti molti studi per determinare l'intera gamma di effetti che possono derivare dall'esposizione agli ftalati in utero. Gli studi hanno dimostrato che i topi maschi che venivano esposti a ftalati, durante il periodo della differenziazione sessuale, presentavano una serie di anomalie dell'apparato riproduttivo (organi riproduttivi sottosviluppati o assenti, malformazioni dei genitali esterni (ipospadia), testicoli repressi (criptorchidismo), diminuzione della distanza ano-genitale, conservazione dei capezzoli e ridotta produzione di spermatozoi (106,104,103).

- Effetti nelle femmine

Gli effetti, a livello del sistema riproduttivo femminile, hanno ricevuto molta meno attenzione rispetto agli effetti nel maschio. Una serie di studi ha indagato gli effetti degli ftalati sulle cellule granulose dell'ovaio: in particolare il DEHP ad alte dosi sembra incrementare la produzione di steroidi (102,101,100,99) nell'ovaio portando ad una inibizione dell'ovulazione. Un recente studio (98) ha indicato che l'esposizione a lungo termine per DBP a 500 mg / kg-D può causare incapacità di portare a termine la gravidanza a causa di una diminuzione della produzione ovarica di progesterone.

Ipotesi di meccanismo d'azione:

I primi studi per cercare di capire quale fosse il meccanismo d'azione degli ftalati hanno portato alla conclusione che tali sostanze hanno la capacità di ridurre i livelli ormonali.

L'insufficienza degli androgeni nei momenti critici di sviluppo del sistema riproduttivo maschile provoca la riduzione di sviluppo del sistema di canalizzazione nel vaso deferente, il non corretto sviluppo dell'epididimo e delle vescicole seminali (97).

Abbassare le concentrazioni di testosterone può anche influire sulla produzione di diidrotestosterone (DHT), ormone che induce lo sviluppo della prostata e dei genitali esterni.

L'azione simil-estrogenica degli ftalati può essere ricondotta a meccanismi di competizione recettoriale con l'ormone endogeno. Tale ipotesi deve essere ancora confermata e più ampiamente giustificata dato che, non esiste analogia strutturale tra gli ftalati e l'ormone estrogeno naturale che ha un'affinità recettoriale molto più

alta rispetto all'affinità degli ftalati per lo stesso recettore. L'effetto biologico degli ftalati potrebbe essere spiegato dalla presenza sul recettore per gli estrogeni di due o più siti recettoriali diversi in grado quindi di legare anche molecole con struttura chimica differente. Inoltre, gli ftalati sembrano avere una minor tendenza a legarsi alle proteine plasmatiche di trasporto rispetto agli estrogeni, essendo quindi maggiormente disponibili in circolazione in forma libera, che è quella che si lega al recettore.

Molti degli ftalati studiati mostrano di poter ridurre l'affinità di legame del 17- β -estradiolo al suo recettore. Tra questi ritroviamo il BBP ("Butyl-Benzyl-Phtalate"), il DBP ("Di-n-Butyl-Phtalate"), il DEHP ("Bis(2-Ethylhexyl)Phtalate"), il DEHA ("Bis-(2-Ethylhexyl)Adipate"), il benzofenone, l'n-butilbenzene, il 4-nitrotoluene, il BHA ("Butylated Hydroxyanisole") e il 2,4-diclorofenolo.

Il BBP, il DBP e il BHA sono molto potenti anche nell'induzione della proliferazione in cellule dotate di recettore estrogenico e sono in grado di attivarne, in vitro, l'attività trascrizionale.

Un recente studio del 2009 (96) ha riportato che gli ftalati hanno effetti avversi sullo sviluppo del testicolo fetale con un meccanismo d'azione non steroidogenico ma attraverso l'alterazione del numero di cellule germinali. In questo studio gli autori, utilizzando le culture d'organo dei testicoli del feto a diversi stadi di sviluppo, hanno analizzato gli effetti diretti degli ftalati considerando entrambi i meccanismi d'azione. Inoltre il loro scopo era anche quello di determinare se gli effetti del MEHP (principale metabolita del DEHP) si possono evidenziare non solo nel ratto ma anche ad altre specie di mammiferi. Lo studio quindi è stato condotto utilizzando il feto di un topo. Sono stati definiti specifici periodi di sensibilità del feto del topo per il MEHP ed è stato dimostrato che gli effetti degli ftalati sulla

steroidogenesi varia con l'andamento delle fasi evolutive. Al contrario, gli effetti avversi sulle cellule germinali sono stati costantemente presenti durante le fasi attive di sviluppo delle gonadi. Tale risultato evidenzia che, gli effetti avversi che si vengono a determinare a livello testicolare, non hanno alcuna relazione con la produzione di ormoni steroidei. Inoltre, tutti gli effetti sono rimasti invariati nei testicoli di topi mancanti di estrogeni (ERaKO o ERbKO) o androgeni (TFM) recettori.

In conclusione, i risultati di tale studio, dimostrano che gli ftalati hanno la capacità di compromettere la produzione del numero di cellule germinali nei topi durante la vita fetale, analogamente ad altre specie di mammiferi, ma con un meccanismo d'azione né estrogenica né antiandrogena (96).

Tossicità

Una valutazione approfondita dei dati esistenti sulla tossicità degli ftalati è stata effettuata recentemente dal National Toxicology Program's Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction (CERHR), con lo scopo di uniformare le valutazioni sui potenziali effetti di queste sostanze sulla salute umana.

Di seguito vengono riportate 5 brevi schede sui composti più studiati:

- butil-benzil-ftalato (BBP);
- di-(2-etil)-ftalato (DEHP);
- di-isodecil-ftalato (DIDP);
- di-isononil-ftalato (DINP);
- di-n-butil-ftalato (DBP).

Il BBP è utilizzato nella manifattura delle mattonelle di vinile e del PVC da utilizzare nella produzione di nastri trasportatori per alimenti, prodotti di vinile e, in misura minore, guanti di vinile e adesivi.

La stima più affidabile dell'esposizione nella popolazione generale è di 2 µg/kg (2) di peso corporeo al giorno negli adulti, con livelli di esposizione fino a 2-3 volte superiori nei bambini. L'esposizione occupazionale può arrivare invece fino a 286 µg/kg (2) per giorno lavorativo.

Gli studi nell'animale hanno evidenziato che il BBP è tossico per lo sviluppo di topi e ratti e che l'esposizione perinatale influisce sulla capacità riproduttiva.

DEHP

La tossicità di questo composto deriva principalmente dalla conversione, ad opera delle lipasi intestinali (presenti in misura nettamente superiore nei roditori rispetto ai primati), nel suo metabolita attivo, il MEHP (mono-(2-etil-esil)-ftalato). Per questo motivo si pensa che gli effetti sull'uomo siano probabilmente minimi. Non è ancora noto inoltre se il MEHP sia tossico nella stessa misura per le cellule del Sertoli umane e murine.

DIDP

Questo composto viene usato in molti prodotti di consumo. I livelli di esposizione sembrano essere inferiori a quelli del DEHP e probabilmente non eccedono i 3-30 µg/kg al giorno (2). L'esposizione occupazionale avviene per via inalatoria e dermica. I dati disponibili nell'animale sono sufficienti per stabilire che l'esposizione orale materna al DIDP può causare problemi sullo sviluppo del feto durante la vita adulta.

DINP

Anche questo plastificante viene utilizzato in molti prodotti di consumo. I livelli di esposizione dell'adulto non sembrano essere superiori a 3-30 µg/kg al giorno (2). Nei ratti il DINP ha mostrato di essere in grado di provocare effetti negativi sulla capacità riproduttiva. Il fatto che questo ftalato sia presente nei giocattoli impone la necessità di approfondire i rischi derivanti dall'abitudine dei bambini di portare qualsiasi oggetto verso la bocca.

DBP

Il livello di esposizione di questo ftalato (presente anche nei solventi per vernici) è di circa 2-10 µg/kg al giorno (2). Nei ratti provoca malformazione dell'apparato riproduttore quando somministrato per via orale, perché agisce sulla biosintesi del testosterone. Nei primati sono necessari elevati livelli plasmatici per ottenere gli stessi effetti. In generale risulta ancora piuttosto difficile utilizzare i dati attualmente disponibili sull'animale per valutare i potenziali rischi per l'uomo (2).

1.4 Scopo dello studio

Dall'entrata in vigore del nuovo regolamento REACH, avvenuto il 1° Giugno 2007, è iniziata una nuova era per le industrie, per gli importatori ed esportatori di sostanze chimiche (o di articoli). Una delle principali novità del REACH è l'imposizione ed il controllo anche per le sostanze ritenute capaci di alterare il sistema ormonale. Sino al 2007 infatti, solo le sostanze classificate come CMR (Cancerogene, Mutagene o Tossiche per la Riproduzione) erano regolamentate in maniera scrupolosa. Da qui la scelta di questo progetto di ricerca ed in particolare la scelta della classe di sostanze da valutare: gli Ftalati.

Come è stato già evidenziato, gli ftalati sono oggi considerati sostanze capaci di alterare il sistema ormonale nell'uomo, ed in quanto tali sono oggi soggette a regolamentazione. D'ora in poi, gli importatori ed i produttori, per immettere sul mercato i loro prodotti contenenti ftalati, saranno obbligati a presentare, all'interno del Chemical safety Report, gli scenari di esposizione per confermare il loro uso sicuro.

Gli ftalati vengono utilizzati per rendere più morbidi e flessibili svariati prodotti, tra cui i giocattoli. L'attenzione per questo progetto di ricerca si è concentrata proprio sul fatto che tali articoli vengono utilizzati dai bambini, la sottopopolazione più suscettibile.

L'obiettivo principale del progetto di ricerca è quello di effettuare la valutazione del rischio per tali sostanze. La prima fase di valutazione è stata quella di determinare le caratteristiche tossicologiche di dette sostanze (tramite ricerca bibliografica), successivamente, tenendo in considerazione la popolazione più suscettibile, sono stati sviluppati degli ipotetici **scenari di esposizione** (valutazione dell'esposizione) per le suddette classi : Neonati (4.5 mesi); Neonati (7.5 mesi); Bambini (13.5 mesi).

Infine, per la caratterizzazione del rischio, è stata messa in relazione la pericolosità delle suddette sostanze con l'esposizione ed è stata valutata la probabilità che si verificassero effetti avversi sui bambini.

In conclusione si è cercato di mettere a fuoco gli scenari di esposizione più probabili e compatibili con le abitudini di vita quotidiane della popolazione generale, cercando di individuare azioni di prevenzione ambientale finalizzate a ridurre il rischio di esposizione per la popolazione più suscettibile.

2 Materiali e Metodi

2.1 Approccio modellistico: ConsExpo

Uno dei momenti di esposizione a sostanze chimiche ambientali per gli esseri umani è l'uso di prodotti di consumo che le contengono. A causa della grande varietà di prodotti di consumo e le differenze nel comportamento dei consumatori, non sono generalmente disponibili dei dati rappresentativi dell'esposizione. In queste circostanze, la via più utilizzata per la stima dell'esposizione è rappresentata dall'utilizzo di modelli matematici.

ConsExpo 4.1 è un software, basato su modelli matematici, sviluppato per contribuire alla valutazione dell'esposizione di sostanze chimiche nei prodotti di consumo.

Il programma è di origine olandese ed è stato sviluppato nell'ambito del progetto "La valutazione del rischio per i consumatori" nel 2005.

ConsExpo 4.1 implementa una vasta gamma di modelli matematici di applicazione generale che descrivono i processi di esposizione per inalazione, per contatto dermico e per ingestione durante l'utilizzo di diverse categorie di prodotti (88). Permette di effettuare la valutazione dell'esposizione utilizzando un approccio graduale, iniziando dapprima con semplici modelli di primo ordine che potranno essere utilizzati per stimare un livello più grossolano di esposizione, e proseguire fino ai modelli più dettagliati e complessi che necessitano di molti altri dati. E' da sottolineare che il modello più semplice, di primo ordine, richiede solo poche informazioni generali, mentre i modelli più avanzati richiedono spesso dati molto specifici che possono essere difficili da reperire. A questo proposito, per agevolare

la valutazione sopperendo alla carenza di dati specifici, il programma ConsExpo 4.1 è dotato di un database con valori di default per alcuni degli scenari di esposizione. I valori di default sono riportati in schede, che sono incentrate sulle categorie di prodotti. Al momento, le schede sono state pubblicate su prodotti generali (88), vernici (87), prodotti per il controllo dei parassiti (64), giocattoli (49) e cosmetici (48).

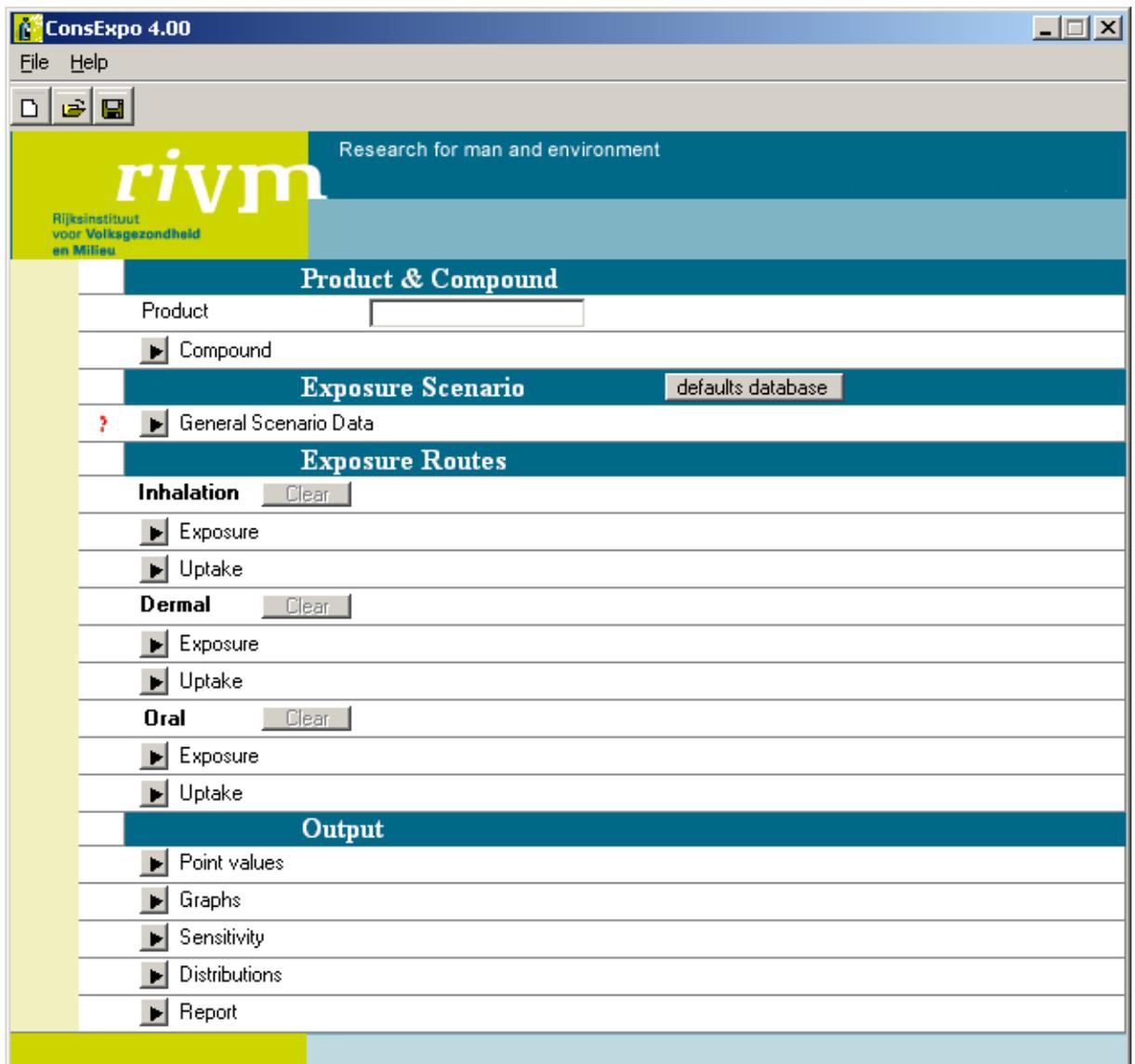
L'insieme dei valori di default utilizzati per la predisposizione e lo sviluppo degli scenari di esposizione, oggetto di questa tesi, è il *Children's Toys Factsheet* (47). Questo documento, sviluppato come parte integrante del progetto "Risk Assessment of Consumer" (94), è di notevole utilità per stimare e valutare l'esposizione a sostanze chimiche incluse in prodotti di consumo, nel caso specifico i giocattoli, e per la valutazione dell'assorbimento di dette sostanze da parte degli esseri umani.

In particolare, all'interno del suddetto documento, vengono predisposti esempi di scenari di esposizione per le varie vie di esposizione. I parametri utilizzati per lo sviluppo degli scenari di esposizione oggetto dell'indagine (aventi come via di esposizione solo la via orale) sono stati ricavati da un modello predefinito presente nel suddetto documento (95).

Procedura

Come si può vedere in Fig.4, la schermata principale di ConsExpo 4.1 offre un elenco di passaggi necessari per valutare l'esposizione ad una data sostanza derivante dall'utilizzo del prodotto scelto.

Fig. 4 Schermata principale ConsExpo



Nella sezione *Prodotti e Composti* (Fig. 5), le informazioni sul prodotto ed il composto di interesse possono essere inseriti e modificati. Sotto la voce 'composto' si possono specificare le proprietà fisico-chimiche di base del composto per il quale viene fatta la valutazione.

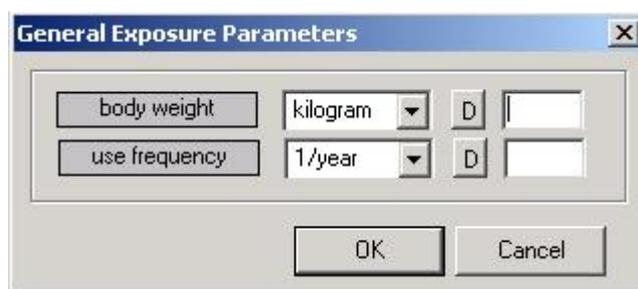
Fig. 5 Sezione Prodotti e Composti

The image shows a software dialog box titled "compound". It contains several input fields and dropdown menus. At the top, there are two text boxes labeled "compound name" and "CAS number". Below these is a section for "application temperature" with a dropdown menu set to "Celsius", a "D" checkbox, and an empty text box. A bolded heading reads "Molecular data at application temperature:". Underneath, there are three rows of data entry: "molecular weight" with a dropdown set to "g/mol", a "D" checkbox, and an empty text box; "KOW" with a dropdown set to "linear", a "D" checkbox, and an empty text box; and "vapour pressure" with a dropdown set to "Pascal", a "D" checkbox, and an empty text box. At the bottom of the dialog are "OK" and "Cancel" buttons.

La 'temperatura di applicazione' è la temperatura della stanza in cui è utilizzato il prodotto, durante il tempo di esposizione. Le proprietà fisico-chimiche del composto devono essere specificate a questa temperatura. Il peso molecolare, il Kow (coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua) e la tensione di vapore possono essere necessari per il calcolo dell'esposizione, a seconda della scenari scelti.

Dopo aver inserito i parametri chimico-fisici della sostanza, si inseriscono gli input base dello scenario (Fig. 6).

Fig. 6 Input base dello scenario



The image shows a software dialog box titled "General Exposure Parameters". It contains two rows of input fields. The first row has a "body weight" label, a "kilogram" dropdown menu, a "D" unit dropdown, and an empty text box. The second row has a "use frequency" label, a "1/year" dropdown menu, a "D" unit dropdown, and an empty text box. At the bottom are "OK" and "Cancel" buttons.

Il peso corporeo della persona esposta è necessario per calcolare l'esposizione interna. La frequenza di utilizzo è il numero di volte per unità di tempo (per anno) che il prodotto viene utilizzato ed è necessaria per valutare l'esposizione cronica.

Successivamente si seleziona la via di esposizione: inalazione, cutanea o la via orale. Per il nostro progetto di ricerca la via di esposizione scelta è la via orale. In questo caso il modello richiede l'inserimento di alcuni dati input necessari per il calcolo dell'esposizione: il tempo di esposizione (in minuti), cm^2 di corpo esposti, la velocità di migrazione della sostanza, ecc..

L'output del programma, che opera attraverso diversi modelli matematici, è la stima dell'esposizione a quella determinata sostanza per quel determinato "attore".

I risultati sono espressi come dose interna acuta: mg di sostanza manipolata nel corso di un evento per kg di peso corporeo; e dose interna croniche: media giornaliera per mg di sostanza manipolata per kg di peso corporeo.

2.2 Scenari di esposizione predisposti

Data l'ubiquità d'uso degli ftalati, tutta la popolazione generale è esposta, per le diverse vie di esposizione (ingestione, inalazione e cutanea), a tali sostanze. Per questo progetto di ricerca è stato necessario sviluppare degli scenari che riguardassero la popolazione più suscettibile, i bambini.

Ovviamente ci sono diverse classi di età da tenere in considerazione. Per il nostro progetto sono state prese in considerazione le seguenti tre classi di infanti (13):

1. Neonati di 4.5 mesi di età
2. Neonati di 7.5 mesi di età
3. Bambini di 13.5 mesi di età

La scelta di tale sottoclassificazione è basata sul fatto che queste fasce di età sono quelle che principalmente utilizzano gli articoli per l'infanzia o i giocattoli molto morbidi e quindi ricchi di plastificanti (ftalati). Inoltre tra i 4 ed i 18 mesi di età, i bambini hanno l'abitudine di portare qualsiasi oggetto alla bocca (in misura diversa a seconda della fascia di età sopra riportata), aumentando l'esposizione per via orale alla sostanza in esame.

Input del modello

Input riferiti alle sostanze - Scelta degli ftalati

La scelta degli ftalati da esaminare è basata su dati derivanti dalla letteratura. E' stato scelto questo tipo di approccio con lo scopo di individuare le sostanze più utilizzate e per determinare quali di queste si ritrovino in maggior concentrazione nei giocattoli.

Il Danish Technology Institute nel 2004 (41) ha determinato la concentrazione di ftalati in 35 campioni di giocattoli provenienti da diversi paesi. I risultati di tale studio concludono che nei campioni erano presenti diversi tipi di ftalati, il DEHP, il DINP, il DEP, il DBP ed altri. In particolare la concentrazione massima del DEHP era 18.5%; per il DINP la concentrazione massima era 42%; il DBP aveva una concentrazione massima di 0.03%. Gli altri ftalati non hanno concentrazione massima in quanto sono stati ritrovati in campioni singoli: il DEP è stato trovato con una concentrazione di 0.006%; e gli altri ftalati con un totale di 0.004%.

Stringer et al (33) ha analizzato 77 campioni di giocattoli ed ha ritrovato solo la presenza di due ftalati: il DINP ed il DEHP. La concentrazione massima del DINP era 51%; il DEHP è stato trovato con massimo di 35.5%.

Biedermann-Brem et al (32) ha analizzato 252 giocattoli riscontrando nel 27% di essi concentrazioni di ftalati molto alta⁸. In particolare è stato trovato il DEHP ad una concentrazione massima del 42%, il DINP del 41%, il DIBP del 35%, il DBP del 15%, il DIDP del 32% ed il DNOP con una concentrazione massima del 38%.

In uno studio del 2001 (31) sono stati analizzati 20 campioni e sono state trovate le seguenti concentrazioni massime: DINP al 36% ed il DEHP al 31% .

In un recentissimo studio del 2010 (30) (regolamento REACH in vigore da tre anni), sono state evidenziate concentrazioni di ftalati molto alte. In particolare il DEHP è stato determinato ad una massima concentrazione di 2.6% e il DINP ad una concentrazione di 16.2%.

⁸ Decisione del Parlamento Europeo del 1999: concentrazione massima dello 0.1% di ftalati nei giocattoli ed articoli per l'infanzia

Bouma et al (28), in 62 campioni di giocattoli analizzati, hanno ritrovato la più alta concentrazione di DEHP, rispetto a tutti gli studi ritrovati in letteratura. Nel caso specifico sono stati ritrovati due ftalati: DEHP e il DINP. Il DEHP ad una concentrazione del 48% ed il DINP ad una concentrazione del 44%.

In conclusione, l'analisi della letteratura ha portato a focalizzare l'attenzione principalmente su i due ftalati ritrovati in ogni studio ed in ogni campione analizzato: **DEHP** ed **DINP**.

Concentrazioni da utilizzare

In Tab. 4 vengono illustrate le concentrazioni massime e minime riportate dagli studi considerati utili nella revisione della letteratura disponibile.

Tab. 4 Concentrazione di ftalati nei giocattoli

Tipo di studio	N° campioni	Min conc. % w/w	Max conc. % w/w	Ref.
Analisi ftalati nei giocattoli	35	DEHP: <0,002% w/w; DINP: 0.22%; DEP: 0.006%; DBP: 0.002%; Altri: 0.004%	DEHP: 18.5%; DINP: 42%; Altri: 0.03%	(41)
Analisi ftalati nei giocattoli	77	DINP: 0.4 %; DEHP: 0.003 %	DINP: 51%; DEHP: 35.5%	(33)
Analisi ftalati nei giocattoli	252	DEHP: 0.2%; DINP: 0.7%; DIBP: 0.4%; DBP: 0.5%; DIDP: 9.3%; DNOP: 38%	DEHP: 42%; DINP: 41%; DIBP: 35%; DBP: 15%; DIDP: 32%; DNOP: 38%	(32)
Analisi ftalati nei giocattoli	20	DINP 0.406%; DEHP 0.061%; DINP+DEHP 35.316%; DBP 0.147%	DINP 36.050%; DEHP 30.754%; DINP+DEHP 54.998%	(31)

Analisi ftalati nei giocattoli	24	DEHP: <0.1%; DINP: 0.1%	DEHP: 2.6%; DINP: 16.2%	(30)
Analisi ftalati nei giocattoli	15	DBP <0.005%; BBP: <0.005%; DIBP: <0.005%; DEHP: 0.0365%;DINP: 1.202%; DINP+DIDP: 1.666%	DBP: 0.463%; BBP: 0.019%; DIBP: 0.226%; DEHP: 28.976%; DINP: 37.290%	(24)
Analisi ftalati nei giocattoli	17	DEHP: 0.01%; DBP: 0.01%; DEP: 0.13%; BBP: 0.02%; DINP+DIDP: 19.6%	DEHP: 22.40%; DINP+DIDP: 40.2 + 7.9%	(10)
Analisi ftalati nei giocattoli	24	DINP: 12.9%	DINP: 39.4%	(9)
Migrazione da giocattoli in PVC	62	DINP: 16%; DEHP: 3%	DINP: 48%; DEHP: 44%	(28)

E' stata condotta l'analisi statistica delle concentrazioni massime ricavate dai dati raccolti in letteratura. Sono stati calcolati il 50°, il 75°, il 90° ed il 95° percentile della distribuzione del valore massimo per entrambe le sostanze. In Tab. 5 sono presentati i risultati statistici.

Tab. 5 Percentili

Sostanza	50° percentile	75° percentile	90° percentile	95° percentile
DEHP	29.8	37,12	42.6	43.3
DINP	40.2	43.5	48.9	49.9

In base al principio del worst-case scenario⁹, si è deciso di utilizzare come dato input per il programma ConsExpo 4.1, i valori del 95° percentile, per entrambe le sostanze in esame (**DEHP: 43.3% e DINP: 49.9%**).

Caratteristiche chimico-fisiche

Una volta definito quali sostanze prendere in considerazione ed in quali concentrazioni, sono state esaminate le caratteristiche chimico-fisiche delle due sostanze: CAS Number (numero identificativo della sostanza); peso molecolare; Ko/w e la tensione di vapore.

Per entrambe le sostanze, il DEHP ed il DINP, sono stati considerati i parametri ad una temperatura di 20° C.

Leaching rate

L'ultimo degli input, riferito alle sostanze in esame, indispensabili per lo sviluppo degli scenari, è la velocità di migrazione della sostanza dal prodotto alla mucosa orale (parametro sostanza-specifico). Tale parametro viene definito "leaching rate". Anche in questo caso si è preferito agire attraverso una ricerca bibliografica. Il più alto valore di leach rate (sempre per contemplare il caso peggiore ritrovato) per il **DEHP** è stato riportato in una review danese del 2003 (3), ed è pari a **4.4⁻⁸ g/cm²/min**; per il **DINP** il valore di leach rate più alto (ritrovato in letteratura) è pari a **2.44⁻⁷ g/cm²/min** e deriva dal report Children's Toys Factsheet (47).

⁹ Worst-case scenario: rappresenta lo scenario peggiore, avente come input i parametri che condizionano la maggiore esposizione

Input riferiti agli “attori”

Molti dei dati input riferiti alla persona sono stati estratti dal report “Children’s Toys Fact sheet” (47). In particolare sono stati presi i dati riferiti alla frequenza di esposizione in termini di giorni all’anno; il peso corporeo del bambino; il peso del giocattolo; l’area di contatto; la frequenza di esposizione (in termini di minuti di contatto al giorno).

La frequenza di esposizione è 365 giorni all’anno. Tale valore è stato utilizzato per tutti gli scenari predisposti.

Il valore di peso corporeo per “l’attore” di ogni singolo scenario, invece, sarà diverso a seconda dell’età dell’infante. Come suggerito dal report, si è utilizzato 6.21 kg per il neonato di 4.5 mesi di età; 7.2 kg per il neonato di 7.5 mesi e 9.47 kg per il bambino di 13.5 mesi di età.

Il peso del giocattolo che il bambino utilizza, come suggerito dal report, è pari a 20 grammi per il neonato di 4.5 mesi di età; 100 grammi per gli altri due “attori”, il neonato di 7.5 mesi ed il bambino di 13.5 mesi di età.

L’area di contatto del bambino è 10 cm². Esso rappresenta la superficie della bocca e lo stesso valore viene utilizzato per tutti gli scenari.

La frequenza di esposizione invece varia per i tre scenari. Si è considerato che il neonato di 4.5 mesi, sia esposto per 11 minuti al giorno; il neonato di 7.5 mesi sia esposto per 63 minuti al giorno ed il bambino di 13.5 mesi sia esposto per solo 9 minuti.

Scenari predefiniti:

Le diverse condizioni, stabilite per lo sviluppo degli scenari di esposizione, sono qui riassunte.

Scenario 1: L'attore è il neonato di 4.5 mesi, avente un peso corporeo di 6.21 kg, ed esposto al giocattolo contenente DEHP/DINP con una frequenza di 365 giorni l'anno. Ogni giorno il neonato è esposto, per via orale, al giocattolo per 11 minuti esponendo 10 cm² della sua superficie corporea. Il giocattolo in uso ha un peso di 20 grammi ed un 49.9% di esso contiene il DINP (leaching rate = 2.44^{-7} g/cm²/min) / 43.3% contiene il DEHP (leaching rate = 4.4^{-8} g/cm²/min).

Scenario 2: L'attore è il neonato di 7.5 mesi, avente un peso corporeo di 7.62 kg, ed esposto al giocattolo contenente DEHP/DINP con una frequenza di 365 giorni l'anno. Ogni giorno tale neonato gioca con il giocattolo per 63 minuti esponendo 10 cm² della sua superficie corporea. Il giocattolo in uso ha un peso di 100 grammi ed un 49.9% di esso contiene il DINP (leaching rate = 2.44^{-7} g/cm²/min) / 43.3% contiene il DEHP (leaching rate = 4.4^{-8} g/cm²/min).

Scenario 3: L'attore è il bambino di 13.5 mesi, avente un peso corporeo di 9.47 kg, ed esposto al giocattolo contenente ftalati con una frequenza di 365 giorni l'anno. Ogni giorno tale bambino gioca con il giocattolo per 9 minuti esponendo 10 cm² della sua superficie corporea. Il giocattolo in uso ha un peso di 100 grammi ed un 49.9% di esso contiene il DINP (leaching rate = 2.44^{-7} g/cm²/min) / 43.3% contiene il DEHP (leaching rate = 4.4^{-8} g/cm²/min).

3. Risultati

3.1 *Valutazione dell' Esposizione*

Seguendo la procedura del programma di ConsExpo, il modello ha permesso di ottenere una stima puntuale dell'esposizione ad entrambi gli ftalati per ogni attore di ogni scenario. Le dosi di esposizione, derivate dalla via orale, sono di seguito descritte per ogni scenario predisposto.

Sostanza esaminata: DEHP (di-2 ethylhexyl phthalate)

Il risultato (in termini di dose interna orale) derivante dallo Scenario 1 è pari a

0.000779 mg/kg bw/ day

ConsExpo 4.1 report		
file name: DEHP: scenario 1		
Report date: 26/08/2010		
<u>Product</u>		
toys		
<u>Compound</u>		
Compound name :	di (2-ethylhexyl) phthalate	
CAS number :	117-81-7	
molecular weight	391	g/mol
vapour pressure	3,4E-5	Pascal
KOW	7,5	10Log
<u>General Exposure Data</u>		
exposure frequency	365	1/year
body weight	6,21	kilogram
<u>Oral model: Oral exposure to product : migration</u>		
weight fraction compound	43,3	%
product amount	20	gram
leach rate	4,4E-8	g/cm2/min
contact area	10	cm2
exposure time	11	minute
<u>Uptake model: Fraction</u>		
uptake fraction	1	fraction
<u>Output</u>		
<u>Oral : point estimates</u>		
oral external dose :	0,000779	mg/kg
oral acute (internal) dose :	0,000779	mg/kg
oral chronic (internal) dose :	0,000779	mg/kg/day
<u>Integrated (point estimates)</u>		
total external dose:	0,000779	mg/kg
total acute dose (internal):	0,000779	mg/kg
total chronic dose (internal):	0,000779	mg/kg/day

Il risultato (in termini di dose interna orale) derivante dallo Scenario 2 è pari a
0.00364 mg/kg bw/ day

<u>ConsExpo 4.1 report</u>		
file name: DEHP: scenario 2		
Report date: 26/08/2010		
<u>Product</u>		
toys		
<u>Compound</u>		
Compound name :	di (2-ethylhexyl) phthalate	
CAS number :	117-81-7	
molecular weight	391	g/mol
vapour pressure	3,4E-5	Pascal
KOW	7,5	10Log
<u>General Exposure Data</u>		
exposure frequency	365	1/year
body weight	7,62	kilogram
<u>Oral model: Oral exposure to product : migration</u>		
weight fraction compound	43,3	%
product amount	100	gram
leach rate	4,4E-8	g/cm2/min
contact area	10	cm2
exposure time	63	minute
<u>Uptake model: Fraction</u>		
uptake fraction	1	fraction
<u>Output</u>		
<u>Oral : point estimates</u>		
oral external dose :	0,00364	mg/kg
oral acute (internal) dose :	0,00364	mg/kg
oral chronic (internal) dose :	0,00364	mg/kg/day
<u>Integrated (point estimates)</u>		
total external dose:	0,00364	mg/kg
total acute dose (internal):	0,00364	mg/kg
total chronic dose (internal):	0,00364	mg/kg/day

Il risultato (in termini di dose interna orale) derivante dallo Scenario 3 è pari a

0.000418 mg/kg bw/ day

ConsExpo 4.1 report

file name: **DEHP: scenario 3**
Report date: 26/08/2010

Product

toys

Compound

Compound name :	di (2-ethylhexyl) phthalate	
CAS number :	117-81-7	
molecular weight	391	g/mol
vapour pressure	3,4E-5	Pascal
KOW	7,5	10Log

General Exposure Data

exposure frequency	365	1/year
body weight	9,47	kilogram

Oral model: Oral exposure to product : migration

weight fraction compound	43,3	%
product amount	100	gram
leach rate	4,4E-8	g/cm2/min
contact area	10	cm2
exposure time	9	minute

Uptake model: Fraction

uptake fraction	1	fraction
-----------------	---	----------

Output

Oral : point estimates

oral external dose :	0,000418	mg/kg
oral acute (internal) dose :	0,000418	mg/kg
oral chronic (internal) dose :	0,000418	mg/kg/day

Integrated (point estimates)

total external dose:	0,000418	mg/kg
total acute dose (internal):	0,000418	mg/kg
total chronic dose (internal):	0,000418	mg/kg/day

Sostanza esaminata: DINP (di-isononyl phthalate)

Il risultato (in termini di dose interna orale) derivante dallo Scenario 1 è pari a

0.00432 mg/kg bw/ day

<u>ConsExpo 4.1 report</u>		
file name: DINP: scenario 1		
Report date: 26/08/2010		
<u>Product</u>		
toys		
<u>Compound</u>		
Compound name :	di-isononyl phthalate	
CAS number :	68515-48-0	
molecular weight	421	g/mol
vapour pressure	6E-5	Pascal
KOW	8,8	10Log
<u>General Exposure Data</u>		
exposure frequency	365	1/year
body weight	6,21	kilogram
<u>Oral model: Oral exposure to product : migration</u>		
weight fraction compound	49,9	%
product amount	20	gram
leach rate	2,44E-7	g/cm2/min
contact area	10	cm2
exposure time	11	minute
<u>Uptake model: Fraction</u>		
uptake fraction	1	fraction
<u>Output</u>		
<u>Oral : point estimates</u>		
oral external dose :	0,00432	mg/kg
oral acute (internal) dose :	0,00432	mg/kg
oral chronic (internal) dose :	0,00432	mg/kg/day
<u>Integrated (point estimates)</u>		
total external dose:	0,00432	mg/kg
total acute dose (internal):	0,00432	mg/kg
total chronic dose (internal):	0,00432	mg/kg/day

Il risultato (in termini di dose interna orale) derivante dallo Scenario 2 è pari a
0.0202 mg/kg bw/ day

ConsExpo 4.1 report		
file name: DINP: scenario 2 Report date: 26/08/2010		
<u>Product</u>		
toys		
<u>Compound</u>		
Compound name :	di-isononyl phthalate	
CAS number :	68515-48-0	
molecular weight	421	g/mol
vapour pressure	6E-5	Pascal
KOW	8,8	10Log
<u>General Exposure Data</u>		
exposure frequency	365	1/year
body weight	7,62	kilogram
<u>Oral model: Oral exposure to product : migration</u>		
weight fraction compound	49,9	%
product amount	100	gram
leach rate	2,44E-7	g/cm2/min
contact area	10	cm2
exposure time	63	minute
<u>Uptake model: Fraction</u>		
uptake fraction	1	fraction
<u>Output</u>		
<u>Oral : point estimates</u>		
oral external dose :	0,0202	mg/kg
oral acute (internal) dose :	0,0202	mg/kg
oral chronic (internal) dose :	0,0202	mg/kg/day
<u>Integrated (point estimates)</u>		
total external dose:	0,0202	mg/kg
total acute dose (internal):	0,0202	mg/kg
total chronic dose (internal):	0,0202	mg/kg/day

Il risultato (in termini di dose interna orale) derivante dallo Scenario 3 è pari a
0.00232 mg/kg bw/ day

<u>ConsExpo 4.1 report</u>		
file name: DINP: scenario 3 Report date: 26/08/2010		
<u>Product</u>		
toys		
<u>Compound</u>		
Compound name :	di-isononyl phthalate	
CAS number :	68515-48-0	
molecular weight	421	g/mol
vapour pressure	6E-5	Pascal
KOW	8,8	10Log
<u>General Exposure Data</u>		
exposure frequency	365	1/year
body weight	9,47	kilogram
<u>Oral model: Oral exposure to product : migration</u>		
weight fraction compound	49,9	%
product amount	100	gram
leach rate	2,44E-7	g/cm2/min
contact area	10	cm2
exposure time	9	minute
<u>Uptake model: Fraction</u>		
uptake fraction	1	fraction
<u>Output</u>		
<u>Oral : point estimates</u>		
oral external dose :	0,00232	mg/kg
oral acute (internal) dose :	0,00232	mg/kg
oral chronic (internal) dose :	0,00232	mg/kg/day
<u>Integrated (point estimates)</u>		
total external dose:	0,00232	mg/kg
total acute dose (internal):	0,00232	mg/kg
total chronic dose (internal):	0,00232	mg/kg/day

Riassumendo, le dosi orali a cui gli “attori” sono esposti nei nostri scenari di esposizione sono presentati in Tab. 6

Tab. 6 Valutazione dell’esposizione

DEHP		
Tipo scenario	Età bambino (mesi)	Dose (mg/kgbw/day)
Scenario 1	4.5	0.000779
Scenario 2	7.5	0.00364
Scenario 3	13.5	0.000418
DINP		
Scenario 1	4.5	0.00432
Scenario 2	7.5	0.0202
Scenario 3	13.5	0.00232

3.2 Valutazione del Rischio

Dopo aver caratterizzato, sulla base dei dati bibliografici, la pericolosità degli ftalati e dopo avere valutato l’esposizione dei bambini (secondo gli scenari illustrati), è necessario valutare la probabilità che si verifichino effetti avversi in suddette condizioni (Valutazione del Rischio).

Per effettuare la valutazione del rischio si è scelto di utilizzare il metodo del Margin Of Safety (MOS):

$$\text{MOS} = \frac{\text{NOAEL (mg/kg bw/day)}}{\text{Esposizione (mg/kg bw/day)}}$$

Il MOS è il metodo di valutazione più appropriato quando si conoscono (o si possono stimare) le dosi di esposizione a cui il consumatore è esposto.

L'esposizione umana calcolata con l'ausilio dei modelli è stata definita durante il processo di valutazione dell'esposizione (scenari di esposizione).

Per il calcolo del MOS è necessario conoscere il NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) della sostanza e la stima (o misura) dell'esposizione umana.

Il No Observed Effect Level viene definito come la dose alla quale non si osservano effetti (oppure nel caso del NOAEL, la dose alla quale non si osservano effetti avversi). Tale dose (espressa come mg/kg bw/day) viene ricavata da studi tossicologici su animali, o se disponibili, su uomini.

Per la scelta del NOAEL, sono stati utilizzati dati disponibili in letteratura. Bouma et al (28) hanno definito i NOAEL ed il TDI (Tolerable Daily Intake, cioè la dose giornaliera tollerabile affinché non si evidenzino effetti avversi sulla salute umana) per alcuni ftalati, tra cui i due ftalati oggetto di studio (vedi Tab.7).

Tab.7 Effetti critici, valori di NOAEL e TDI (28)

Ftalato	Effetti critici	NOAEL (mg/kg/day)	TDI (µg/kg/day)
DINP	Aumento del peso del fegato e dei reni	15	200
DNOP	Cambi microscopici a livello del fegato e della tiroide	37	95
DEHP	Danno a livello dei testicoli	3.7	200
DIDP	Aumento del peso del fegato	25	17.5
BBP	Diminuzione della concentrazione degli spermatozoi	20	0.95
DBP	Ridotto peso dei figli in F2	52 ^A	0.40

^ALOAEL (Low Observed Adverse Effect Level)

Dal report sono stati scelti i seguenti NOAEL:

DEHP ⇨ 3.7 mg/kg bw/day

DINP ⇨ 15 mg/kg bw/day

Una volta definiti i valori di NOAEL, utilizzando i valori di esposizione ottenuti con l'ausilio dei modelli di ConsExpo, è stato possibile determinare il Margin of Safety con la seguente formula:

$$\text{MOS} = \frac{\text{NOAEL (mg/kg bw/day)}}{\text{Esposizione (mg/kg bw/day)}}$$

In linea generale si può affermare che più il valore derivante dal calcolo del MOS è un numero alto più il rischio di avere effetti avversi sulla salute umana è basso.

In Tab. 10 vengono presentati i valori dei MOS ottenuti per tutti gli scenari di esposizione.

Tab. 10 Summary dei Margin of Safety

Ftalato	NOAEL (mg/kg/day)	Esposizione (mg/kg/day)	MOS
DINP	15	Scenario 1	3472
		Scenario 2	742
		Scenario 3	6465
DEHP	3.7	Scenario 1	4749
		Scenario 2	1016
		Scenario 3	8851

Calcolo del MOS

DEHP:

Scenario 1:

- Bambino di 4.5 mesi di età:

$$\text{MOS} = \frac{3.7 \text{ mg/kg bw/day}}{0.000779 \text{ mg/kg bw/day}} = \mathbf{4749}$$

Scenario 2:

- Bambino di 7.5 mesi di età:

$$\text{MOS} = \frac{3.7 \text{ mg/kg bw/day}}{0.00364 \text{ mg/kg bw/day}} = \mathbf{1016}$$

Scenario 3:

- Bambino di 13.5 mesi di età:

$$\text{MOS} = \frac{3.7 \text{ mg/kg bw/day}}{0.000418 \text{ mg/kg bw/day}} = \mathbf{8851}$$

DINP:

Scenario 1:

- Bambino di 4.5 mesi di età:

$$\text{MOS} = \frac{15 \text{ mg/kg bw/day}}{0.00432 \text{ mg/kg bw/day}} = \mathbf{3472}$$

Scenario 2:

- Bambino di 7.5 mesi di età:

$$\text{MOS} = \frac{15 \text{ mg/kg bw/day}}{0.0202 \text{ mg/kg bw/day}} = \mathbf{742}$$

Scenario 3:

- Bambino di 13.5 mesi di età:

$$\text{MOS} = \frac{15 \text{ mg/kg b/wday}}{0.00232 \text{ mg/kg bw/day}} = \mathbf{6465}$$

4. Discussione

Quando il NO(A)EL deriva da test sperimentali, un MOS ≥ 100 è generalmente considerato adeguato per la protezione contro i potenziali effetti tossici da parte della sostanza chimica (23).

I risultati ottenuti dal calcolo del MOS, per tutti gli scenari che sono stati predisposti, superano ampiamente il valore minimo di accettabilità pari a 100.

Ciò significa che, secondo le condizioni d'uso, la frequenza d'uso, e più in generale secondo lo scenario impostato, le concentrazioni di ftalati considerate (sebbene notevolmente superiori ai limiti di legge), non rappresentano un rischio inaccettabile per le categorie di bambini indagate.

Quindi, i risultati derivanti dal calcolo del Margin of Safety, hanno confermato che la probabilità di avere effetti avversi dovuti all'ingestione di dette sostanze, almeno per le condizioni da noi definite, considerate dei "worst-case scenario" (popolazione più suscettibile, concentrazioni elevate di ftalati nei giocattoli, ...) è trascurabile.

Vale la pena evidenziare però che tale ricerca è stata effettuata tenendo in considerazione una sola via di esposizione (orale), riferita solo a due particolari ftalati, il DEHP ed il DINP (dotati di maggiore tossicità), e considerando come scenario di esposizione solo l'utilizzo di giocattoli. Per effettuare una più completa valutazione del rischio, sarebbe opportuno considerare tutte le vie di esposizione (ingestione, inalazione e cutanea), tutti gli ftalati (effettuando una valutazione del rischio cumulativo ed aggregato) ed i vari scenari di vita quotidiana che la popolazione (più suscettibile) si trova ad affrontare. Come è stato detto

nell'introduzione, gli ftalati hanno un uso veramente ubiquitario e questo sottopone la popolazione ad una esposizione non trascurabile, ogni giorno ed in ogni situazione. Il fatto di aver escluso il rischio di effetti avversi nei bambini che giocano con giocattoli contenenti concentrazioni oltre il limite di legge di ftalati, non ci permette di escludere il rischio di effetti dannosi sulla salute umana causati da un effetto cumulativo degli ftalati provocato da un'esposizione ubiquitaria.

Un ulteriore problema da sottolineare è il potenziale incremento della dose di esposizione, per la popolazione più suscettibile, dovuto alla capacità degli ftalati di essere adsorbiti. Infatti gli ftalati vengono facilmente assorbiti dalle particelle trasportate dall'aria, dalla pelle dell'uomo e dal pulviscolo aerodisperso nelle abitazioni. Inoltre tali sostanze hanno anche la caratteristica di essere emesse dai pavimenti in PVC, situazione che diviene rilevante in caso di scenario di esposizione indoor. Come è stato dimostrato da alcuni autori (15,21,22), infatti, gli ftalati si adsorbono in concentrazioni elevate nella polvere di casa, portando così ad aumentare l'esposizione umana sia per via inalatoria (per la popolazione in generale) che per via orale e cutanea (bambini).

Considerando questo ulteriore *intake*, dovuto all'esposizione in ambienti indoor, e considerando che i bambini hanno l'abitudine di portare qualsiasi oggetto (contaminato con polvere) alla bocca, la dose giornaliera ingerita per i bambini potrebbe aumentare in maniera importante.

5. Conclusioni

I risultati ottenuti dalla valutazione del rischio, impostata per questo progetto di ricerca, portano alla conclusione che vi è un rischio trascurabile nell'utilizzo di giocattoli contenenti alte concentrazioni di ftalati (DEHP: 43.3% e DINP: 49.9%) anche per la sottopopolazione più suscettibile.

Nonostante tali risultati siano confortanti, il problema della registrazione e della sostituzione delle sostanze considerate altamente pericolose, per la normativa REACH, rimane sempre aperto. Gli ftalati, che rientrano in questo processo di controllo, devono, per essere registrati, rispettare le concentrazioni limite e devono portare risultati sicuri (ovvero comportare rischio trascurabile) negli scenari di esposizione che la ditta deve fornire.

Come già sottolineato, già dal 1999, sono in vigore normative di legge che regolamentano la massima concentrazione di ftalati nei giocattoli od in articoli per l'infanzia pari allo 0.1 %. In particolare vi è la restrizione d'uso di sei ftalati (**DEHP**, **DBP**, **BPP**, **DINP**, **DIDP** e **DNOP**) perché sospettati di causare effetti su reni, fegato e sistema riproduttivo.

Tra gli ftalati che devono sottostare alla restrizione d'uso, sono inclusi anche il DEHP ed il DINP (ftalati in oggetto per questa ricerca). Ricordiamo però che, dalla ricerca bibliografica, le concentrazioni di ftalati ritrovate nei giocattoli sono molto più alte rispetto ai limiti di legge.

Per lo sviluppo degli scenari di esposizione sono state utilizzate le seguenti concentrazioni: DEHP: 43.3% e DINP: 49.9%. Tali valori rappresentano il 95° percentile delle concentrazioni massime determinate durante le analisi di ftalati nei

giocattoli (su 9 studi presi in esame). Tali concentrazioni sono ben al di sopra dello 0.1% imposto dai limiti di legge.

Questi dati sottolineano che, nonostante esistano normative e limiti di legge, essi non sempre vengono rispettati dai produttori e dagli importatori di giocattoli; gli studi considerati infatti sono stati condotti recentemente (dal 1998 al 2010) ed i campioni provenivano anche da paesi UE.

Uno degli scopi dell'introduzione della nuova normativa REACh è proprio quello di regolamentare la quantità massima di sostanza, ritenuta pericolosa, presente in un oggetto. Il REACh impone a tutti i produttori di presentare, per le sostanze considerate altamente pericolose, uno scenario di esposizione che evidenzi un rischio trascurabile per l'uomo e per l'ambiente, per ogni uso a cui è destinato.

Dal 2007 in poi l'industria è la responsabile della certificazione di sicurezza (con l'ausilio di scenari di esposizione) che viene, in seguito, valutata dall'Autorità competente. Solo nel caso in cui tale Autorità esprima un giudizio positivo, la sostanza ed i prodotti contenenti tale sostanza, possono essere immessi sul mercato oppure essere importati.

L'introduzione del REACh, come unico sistema normativo, porta ad un unico motto: *No safe...no market!*

L'analisi conclusiva di tale ricerca ci permette di affermare che, nonostante i risultati ottenuti siano confortanti per gli scenari di esposizione da noi predisposti, è necessario condurre un'ulteriore analisi e valutazione del rischio per gli ftalati. La futura analisi deve tenere in considerazione i diversi scenari di utilizzo e le diverse vie di esposizione a cui la popolazione è giornalmente esposta. Inoltre deve

essere preso in considerazione anche l'effetto cumulativo non solo tra i diversi ftalati ma anche l'effetto che può derivare dall'associazione ftalati ed altre sostanze aventi lo stesso meccanismo d'azione o gli stessi organi bersaglio.

6. Appendice

6.1 *Cos'è la valutazione del rischio?*

Prima di definire cos'è e come viene effettuata la valutazione del rischio, è necessario definire cosa si intende per rischio. Il rischio è la probabilità che avvengano effetti nocivi per la salute umana o per i sistemi ecologici, derivanti dall'esposizione ad un fattore di stress ambientale. Tali fattori di stress possono essere di tipo fisico, chimico, biologico oppure entità che hanno la capacità di indurre una reazione avversa.

Molto spesso le parole rischio e pericolo vengono interscambiate come significato, quindi è doveroso sottolineare la differenza tra i due termini. Come è stato detto in precedenza, il rischio è la *probabilità* che avvengano effetti nocivi a causa di una sostanza, il pericolo di una sostanza, invece, è una *proprietà intrinseca* della sostanza stessa di causare effetti avversi.

Quindi, la valutazione del rischio è il calcolo della probabilità che si verifichi un effetto avverso dopo una esposizione ad un agente chimico, fisico o biologico.

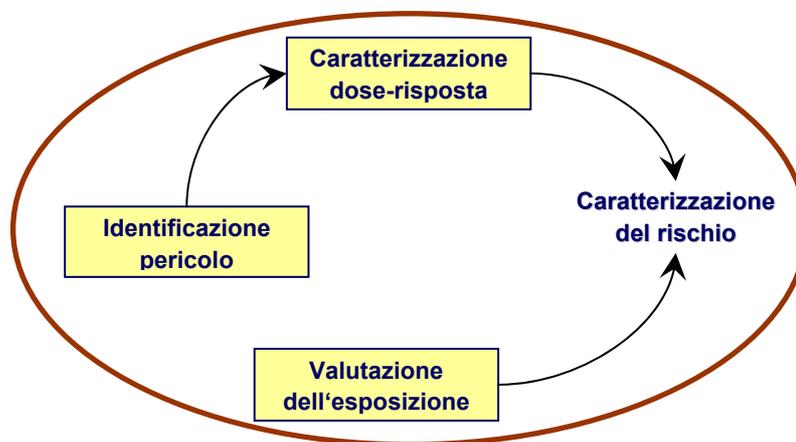
Tale processo di valutazione viene effettuato mediante step (vedi Fig. 5):

- 1) Caratterizzazione del pericolo della sostanza: individuazione delle caratteristiche intrinseche di provocare effetti avversi per l'uomo (o per l'ambiente); determinazione della curva dose-risposta sulla base di test su animali.

2) Valutazione dell'esposizione: valutazione della popolazione che è o può essere potenzialmente esposta ed i livelli di esposizione che ci si aspetta da azioni giornaliere o in una situazione di "worst-case".

3) Caratterizzazione del rischio: combinazione di pericolo della sostanza ed esposizione per quantificare la probabilità, la natura, e la grandezza degli effetti nocivi per la salute che possono verificarsi per un dato scenario (24).

Fig. 5 Schema del processo di valutazione del rischio



6.2 Definizioni secondo regolamento REACH:

sostanza: un elemento chimico e i suoi composti, allo stato naturale od ottenuti per mezzo di un procedimento di fabbricazione, compresi gli additivi necessari a mantenerne la stabilità e le impurità derivanti dal procedimento utilizzato, ma esclusi i solventi che possono essere separati senza compromettere la stabilità della sostanza o modificarne la composizione;

preparato: una miscela o una soluzione composta di due o più sostanze;

articolo: un oggetto a cui sono dati durante la produzione una forma, una superficie o un disegno particolari che ne determinano la funzione in misura maggiore della sua composizione chimica;

produttore di un articolo: ogni persona fisica o giuridica che fabbrica o assembla un articolo all'interno della Comunità;

fabbricante: ogni persona fisica o giuridica stabilita nella Comunità che fabbrica una sostanza all'interno della Comunità;

importazione: l'introduzione fisica nel territorio doganale della Comunità;

importatore: ogni persona fisica o giuridica stabilita nella Comunità responsabile dell'importazione;

immissione sul mercato: l'offerta o la messa a disposizione di terzi, contro pagamento o gratuita. L'importazione è considerata un'immissione sul mercato;

utilizzatore a valle: ogni persona fisica o giuridica stabilita nella Comunità diversa dal fabbricante o dall'importatore che utilizza una sostanza, in quanto tale o in quanto componente di un preparato, nell'esercizio delle sue attività industriali o professionali. I distributori e i consumatori non sono considerati utilizzatori a valle. Un re-importatore a cui si applica l'esenzione di cui all'articolo 2, paragrafo 7, lettera c) è considerato un utilizzatore a valle;

distributore: ogni persona fisica o giuridica stabilita nella Comunità, compreso il rivenditore al dettaglio, che si limita ad immagazzinare e a immettere sul mercato una sostanza, in quanto tale o in quanto componente di un preparato, ai fini della sua vendita a terzi;

attori della catena d'approvvigionamento: tutti i fabbricanti e/o importatori e/o utilizzatori a valle in una catena d'approvvigionamento;

agenzia: l'agenzia europea per le sostanze chimiche quale istituita dal presente regolamento;

autorità competente: la o le autorità o gli organismi istituiti dagli Stati membri per adempiere agli obblighi risultanti dall'applicazione del presente regolamento;

7. Bibliografia

- 1) REGOLAMENTO (CE) N. 1907/2006 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 18 dicembre 2006
- 2) Gianluca Tognon; Principali effetti degli interferenti endocrini nell'uomo; <http://www.wwf.it/UserFiles/File/News%20Dossier%20Appti/DOSSIER/detox/effetti%20interferenti%20endocrini.pdf>
- 3) Muller A.K. et al; Human Exposure to selected Phthalates in Denmark; Institute of Food Safety and Nutrition; October 2003
- 4) Schettler, T. 2006. Human exposure to phthalates via consumer products. Int. J. Androl. 29(1):134-139.
- 5) <http://www.greenfacts.org/phthalates/dinp-didp/index.htm>
- 6) <http://ecb.jrc.it/esis/>
- 7) John Little et al; Exposure to phthalate emitted from vinyl flooring and sorbed to interior surfaces, dust, airborne particles and human skin., 2008.
- 8) EFSA. Opinion of the scientific Panel on Food Additives, Flavouring, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a request from the Commission related to 2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane (Bisphenol A). EFSA J 2006; 428:1-75
- 9) Babich M.A. et al; Risk Assessment of oral exposure to diisononyl phthalate from children's products; Regulatory Toxicology and Pharmacology, Vol.40; 151-167; 2004

- 10) Rastogi S.C.; Gas Chromatographic Analysis of Phthalate Esters in Plastic Toys; *Chromatographia*, Vol.47, 1998
- 11) Dash C., Bisphenol A: Do recent studies of health effects among humans inform the long-standing debate? *Mutat Res* 2006; 613:68-75
- 12) Kang JH., Human exposure to bisphenol A. *Toxicology* 2006: 226:79-89
- 13) Mahalingaiah S. Temporal variability and predictors of urinary bisphenol A concentrations in men and women. *Environ Health Perspect* 2008; 116:173-178
- 14) Staples C.A. A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. *Chemosphere* 1998; 36:2149-2173
- 15) Per Axel Clausen et al; Emission of Di-2-ethylhexyl Phthalate from PVC Flooring into Air and Uptake in Dust: Emission and Sorption Experiments in FLEC and CLIMPAQ; *Environ. Sci. Technol.*, **2004**, 38 (9), 2531-2537 • DOI: 10.1021/es0347944 • Publication Date (Web): 26 March 2004
- 16) European-Union. Risk Assessment Report-4,4'-isopropylidene-diphenol (Bisphenol A) 2003. http://ecb.jrc.it/DOCUMENTS/Existing-Chemicals/RISK_ASSESSMENT/REPORT/bisphenolareport325.pdf.
- 17) Imanaka M. Determination of bisphenol A in food using GM/MS. *J Food Hyg Soc Jpn* 2001;42:71-78
- 18) Goodson A. Survey of bisphenol A and bisphenol F in canned foods. *Food Addit Contam* 2002; 19:796-802

- 19) Munguia-Lopez E.M. Migration of bisphenol A (BPA) from can coatings into a fatty-food stimulant and tuna fish. *Food Addit Contam* 2005; 22: 892-898
- 20) Thomson B.M., Grounds P.R. Bisphenol A in canned foods in New Zealand: an exposure assessment. *Food Addit Contam* 2005; 22:65-72
- 21) Wensing M. et al, Plastics additives in the indoor environment—flame retardants and plasticizers; *Science of the Total Environment* 339 (2005) 19–40
- 22) John Little et al ; Exposure to phthalate emitted from vinyl flooring and sorbed to interior surfaces, dust, airborne particles and human skin., 2008.
- 23) Handbook of Pesticide Toxicology: Principles; Chapter 32 (pg.695); Robert Irving Krieger.
- 24) Rastogi S C. and Jensen G. H.; Compliance testing of phthalates in toys; NERI Research Notes N.185; 2003
- 25) Vom Saal FS. An Extensive New Literature Concerning Low-Dose Effects of Bisphenol A shows the need for a New risk Assessment. *Environmental Health Perspectives* 2005; 113: 926-932
- 26) Herbst AL. Adenocarcinoma of the vagina: association of maternal stilbestrol therapy with tumour appearance in young women. *N Engl J Med* 1971; 284:878-881
- 27) Sun Y. Determination of bisphenol A in human breast milk by HPLC with column-switching and fluorescence detection. *Biomed Chromat* 2004; 18: 501-507

- 28) Bouma K. Et al; Migration of phthalates from PVC toys into saliva simulant by dynamic extraction; Food Additives and Contaminants, Vol. 19; 602-610; 2002
- 29) Alonso-Magdalena P. Low doses of bisphenol A and diethylstilbestrol impair Ca²⁺ signals in pancreatic alpha-cells through a nonclassical membrane estrogen receptor within intact islets of Langerhans. Environ Health Perspect 2005; 113: 969-977
- 30) Sapna J. et al; Phthalates in Toys; Centre for Science and Environment; CSE/PML/PR-36/2010
- 31) Rastogi S C. and Worsoe M. I; Analytical chemical control of phthalates in toys; NERI Technical Report N. 373; 2001
- 32) Biedermann-Brem S., et al; Plasticizers in PVC Toys and Childcare Products: What Succeeds the Phthalates? Market Survey 2007; Chromatographia, Vol. 68, 2008
- 33) Stringer R. et al.; Concentration of Phthalate Esters and Identification of Other Additives in PVC Children's Toys; Environ. Sci. & Pollut. Res., Vol. 7, 2000
- 34) Kitamura S. Comparative study of the endocrine-disrupting activity of bisphenol A and 19 related compounds. Toxicol Sci 2005; 84:249-259
- 35) Sun H. Effect of bisphenol A, tetrachlorobisphenol A and pentachlorophenol on the transcriptional activities of androgen receptor-mediated reporter gene. Food Chem Toxicol 2006; 44:1916-1921
- 36) Zoeller RT. Bisphenol-A, an environmental contaminant that acts as a thyroid hormone receptor antagonist in vitro, increases serum thyroxine, and alters

- RC3/neurogranin expression in the developing rat brain. *Endocrinology* 2005; 146:607-612
- 37) Moriyama K. Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 5185-5190
- 38) Fini JB. An in vivo multiwell-based fluorescent screen for monitoring vertebrate thyroid hormone disruption. *Environ Sci Technol* 2007; 41:5908-5914
- 39) Jung KK. Differential regulation of thyroid hormone receptor-mediated function by endocrine disruptors. *Arch Pharm Res* 2007; 30:616-623
- 40) Ghisari M. Impact of environmental chemicals on the thyroid hormone function in pituitary rat GH3 cell. *Mol Cell Endocrinol* 2005; 244:31-41
- 41) Danish Technology Institute; *Test of Toys for presence of Chemical compounds*; 2004
- 42) Takeuchi T. Serum bisphenol A concentrations showed gender differences, possibly linked to androgen levels. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 291:76-78
- 43) Takeuchi T. Positive relationship between androgen and the endocrine disruptor, bisphenol A, in normal women and women with ovarian dysfunction. *Endocr J* 2004;51:165-169
- 44) Hanaoka T. Urinary bisphenol A and plasma hormone concentrations in male workers exposed to bisphenol A diglycidyl ether and mixed organic solvents. *Occup Environ Med* 2002; 59:625-628

- 45) Sugiura-Ogasawara M. Limitations of a case-control study on bisphenol A (BPA) serum levels and recurrent miscarriage. *Human Reproduction* 2006; 21:566-567
- 46) Yamada H. Maternal serum and amniotic fluid bisphenol A concentrations in the early second trimester. *Reprod Toxicol* 2002; 16:735-739
- 47) Children's Toy's Fact Sheet, to assess the risk for the consumer; Bremmer H.J., van Veen M.P.; RIVM report 612810012/2002
- 48) Bremmer H.J. , Prud'homme de Lodder L.C.H. and van Engelen J.G.M. Cosmetics Fact Sheet, RIVM report 320104001.
- 49) Bremmer H.J. and van Veen M.P. (2002) Children's Toys Fact Sheet, RIVM report 612810012.
- 50) http://echa.europa.eu/pre-registration/SIEF_it.asp
- 51) Markey CM, Wadia PR, Rubin BS, Sonnenschein C, Soto AM (2005). "[Long-term effects of fetal exposure to low doses of the xenoestrogen bisphenol-A in the female mouse genital tract](#)". *Biol. Reprod.* **72** (6): 1344–51. doi:10.1095/biolreprod.104.036301. PMID 15689538
- 52) Muñoz-de-Toro M, Markey CM, Wadia PR, *et al* (2005). "[Perinatal exposure to bisphenol-A alters peripubertal mammary gland development in mice](#)". *Endocrinology* **146** (9): 4138–47. doi:10.1210/en.2005-0340. PMID 15919749. PMC 2834307
- 53) Newbold, R.; Jefferson, N.; Padilla-Banks, E. (Jun 2009). "[Prenatal exposure to bisphenol a at environmentally relevant doses adversely affects the murine](#)

- [female reproductive tract later in life](#)". *Environmental health perspectives* **117** (6): 879–885. doi:10.1289/ehp.0800045. ISSN 0091-6765. PMID 19590677
- 54) Nagel SC, vom Saal FS, Thayer KA, Dhar MG, Boechler M, Welshons WV (1997). ["Relative binding affinity-serum modified access \(RBA-SMA\) assay predicts the relative in vivo bioactivity of the xenoestrogens bisphenol A and octylphenol"](#). *Environ. Health Perspect.* **105** (1): 70–6. doi:10.2307/3433065. PMID 9074884. PMC 1469837
- 55) Honma S, Suzuki A, Buchanan DL, Katsu Y, Watanabe H, Iguchi T (2002). ["Low dose effect of in utero exposure to bisphenol A and diethylstilbestrol on female mouse reproduction"](#). *Reprod. Toxicol.* **16** (2): 117–22. doi:10.1016/S0890-6238(02)00006-0. PMID 11955942
- 56) Akingbemi BT, Sottas CM, Koulova AI, Klinefelter GR, Hardy MP (2004). ["Inhibition of testicular steroidogenesis by the xenoestrogen bisphenol A is associated with reduced pituitary luteinizing hormone secretion and decreased steroidogenic enzyme gene expression in rat Leydig cells"](#). *Endocrinology* **145** (2): 592–603. doi:10.1210/en.2003-1174. PMID 14605012
- 57) Murray TJ, Maffini MV, Ucci AA, Sonnenschein C, Soto AM (2007). ["Induction of mammary gland ductal hyperplasias and carcinoma in situ following fetal bisphenol A exposure"](#). *Reprod. Toxicol.* **23** (3): 383–90. doi:10.1016/j.reprotox.2006.10.002. PMID 17123778. PMC 1987322
- 58) Ho SM, Tang WY, Belmonte de Frausto J, Prins GS (2006). ["Developmental exposure to estradiol and bisphenol A increases susceptibility to prostate carcinogenesis and epigenetically regulates phosphodiesterase type 4 variant](#)

- 4". *Cancer Res.* **66** (11): 5624–32. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-0516.
PMID [16740699](#). PMC [2276876](#)
- 59) Palanza PL, Howdeshell KL, Parmigiani S, vom Saal FS (2002). "[Exposure to a low dose of bisphenol A during fetal life or in adulthood alters maternal behavior in mice](#)". *Environ. Health Perspect.* **110** Suppl 3: 415–22.
PMID [12060838](#). PMC [1241192](#)
- 60) Kubo K, Arai O, Omura M, Watanabe R, Ogata R, Aou S (2003). "[Low dose effects of bisphenol A on sexual differentiation of the brain and behavior in rats](#)". *Neurosci. Res.* **45** (3): 345–56. doi:10.1016/S0168-0102(02)00251-1.
PMID [12631470](#)
- 61) Leranath C, Hajszan T, Szigeti-Buck K, Bober J, Maclusky NJ (September 2008). "[Bisphenol A prevents the synaptogenic response to estradiol in hippocampus and prefrontal cortex of ovariectomized nonhuman primates](#)". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105** (37): 14187. doi:10.1073/pnas.0806139105.
PMID [18768812](#)
- 62) Adewale, B.; Jefferson, N.; Newbold, R.; Patisaul, B. (Jun 2009). "[Neonatal Bisphenol-A Exposure Alters Rat Reproductive Development and Ovarian Morphology Without Impairing Activation of Gonadotropin Releasing Hormone Neurons](#)" (Free full text). *Biology of reproduction* **81** (4): 690–699. doi:10.1095/biolreprod.109.078261. ISSN 0006-3363. PMID [19535786](#).
<http://www.biolreprod.org/cgi/pmidlookup?view=long&pmid=19535786>.
- 63) EPA (Environmental Protection Agency). 1988. [Oral RfD Assessment: Bisphenol A. Integrated Risk Information System](#)

- 64) Bremmer H.J., Blom W.M., van Hoeven-Arentzen P.H. and et al. (2002) Pest Control Products Fact Sheet, RIVM report 613340003.
- 65) Lassen, C., Lokke, S. & Hansen, L.I. (1999) Brominated flame retardants: substance flow analysis and substitution feasibility study. Miljøprojekt nr. 494, Danish Environmental Protection Agency: 240 pp.
- 66) OECD (1994) Risk Reduction Monograph No. 3: Selected Brominated Flame Retardants – Background and national experience with reducing risk. OCDE / GD (94) 96, Paris 1994: 152 pp.
- 67) de Boer, J., de Boer, K. & Boon, J.P. (2000) Polybrominated Biphenyls and Diphenylethers. Chapter 4 in: Paasivirta, J. [Ed], The Handbook of Environmental Chemistry Vol. 3, Part K: New Types of Persistent Halogenated Compounds, Springer-Verlag, Berlin: 61-95
- 68) Bergman, A. (2000) Brominated flame retardants – a burning issue. Organohalogen Compounds 47: 36-48
- 69) KEMI (1999) Phase-out of PBDEs and PBBs: Report on a Governmental Commission, The Swedish National Chemicals Inspectorate, 15th March 1999: 34 pp.
- 70) Loganathan, B.G., Kannan, K., Watanabe, I., Kawano, M., Irvine, K., Kumar, S. & Sikka, H.C. (1995) Isomer-specific determination and toxic evaluation of polychlorinated biphenyls, polychlorinated/brominated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans, polybrominated biphenyl ethers and extractable organic halogen in carp from the Buffalo River, New York. Environmental Science and Technology 29(7): 1832-1838

- 71) Nylund, K., Asplund, L., Jansson, B., Jonsson, P., Litzen, K. & Sellstrom, U. (1992) Analysis of some polyhalogenated organic pollutants in sediment and sewage sludge. *Chemosphere* 24(12): 1721-1730
- 72) Andersson, O. & Wartanian, A. (1992) Levels of polychlorinated camphenes (Toxaphene), chlordane compounds and polybrominated diphenyl ethers in seals from Swedish waters. *Ambio* 21(8):550-552
- 73) Sellstrom, U., Jansson, B., Kierkegaard, A., De Wit, C., Odsjo, T. & Olsson, M. (1993) Polybrominated diphenyl ethers (PBDE) in biological samples from the Swedish environment. *Chemosphere* 26(9):1703-1718
- 74) Jansson, B., Andersson, R., Asplund, L., Litzen, K., Nylund, K., Sellstrom, U., Uvemo, U.-B., Wahlberg, C., Wideqvist, U., Odsjo, T. & Olsson, M. (1993) Chlorinated and brominated persistent organic compounds in biological samples from the environment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 12(7): 1163-1174
- 75) de Boer, J. (1989) Organochlorine compounds and bromodiphenylethers in livers of Atlantic cod (*Gadus morhua*) from the North Sea, 1977-1987
- 76) Gustafsson, K., Bjork, M., Burreau, S. & Gilek, M. (1999) Bioaccumulation kinetics of brominated flame retardants (polybrominated diphenyl ethers) in blue mussels (*Mytilus edulis*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 18(6): 1218-1224
- 77) de Boer, J. & Dao, Q.T. (1993) Overview of bromodiphenylether data in aquatic biota and sediments. RIVO report C020/93, Ijmuiden, The Netherlands

- 78) Lindstrom, G., van Bavel, B., Hardell, L. & Liljegren, G. (1997) Identification of the flame retardants polybrominated diphenyl ethers in adipose tissue from patients with non- Hodgkin's lymphoma in Sweden. *Oncology Reports* 4(5): 999-1000
- 79) Meneses, M., Wingfors, H., Schuhmacher, M., Domingo, J.L., Lindstrom, G. & von Bavel, B. (1999) Polybrominated diphenyl ethers detected in human adipose tissue from Spain. *Chemosphere* 39(13): 2271-2278
- 80) Strandman, T., Koistinen, J., Kiviranta, H., Vuorinen, P.J., Tuomisto, J. & Vartiainen, T. (1999) Levels of some polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in fish and human adipose tissue in Finland. *Organohalogen Compounds* 40:355-358
- 81) She, J., Winkler, J., Visita, P., McKinney, M. & Petreas, M. (2000) Analysis of PBDEs in seal blubber and human breast adipose tissue samples. *Organohalogen Compounds* 47: 53-56
- 82) Meironyte, D., Noren, K. & Bergman, A. (1999) Analysis of polybrominated diphenyl ethers in Swedish human milk. A time-related trend study, 1972-1997. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A* 58(6): 329-341
- 83) Hooper, K., & McDonald, T.A. (2000) The PBDEs: an emerging environmental challenge and another reason for breast-milk monitoring programs. *Environmental Health Perspectives* 108(5): 387-392
- 84) Noren, K. & Meironyte, D. (2000) Certain organochlorine and organobromine contaminants in Swedish human milk in perspective of past 20-30 years. *Chemosphere* 40(9-11): 1111-1123

- 85) Bergman, A., Ostman, C., Nyborn, R., Sjodin, A., Carlsson, H., Nilsson, U. & Wachtmeister, C.A. (1997) Flame retardants and plasticisers on particulate in the modern computerised indoor environment. *Organohalogen Compounds* 33: 414-419
- 86) Sjodin, A., Carlsson, H., Thuresson, K., Sjolun, S., Bergman, A. & Ostman, C. (2001) Flame retardants in indoor air at an electronics recycling plant and at other work environments. *Environmental Science and Technology* 35(3): 448-454
- 87) Bremmer H.J. and van Veen M.P. (2000b) Factsheet Verf, RIVM rapport 612810010.
- 88) Bremmer H.J. and van Veen M.P. (2000a) Factsheet algemeen, RIVM rapport 612810009.
- 89) Olsson, P.-E., Borg, B., Brunstrom, B., Hakansson, H. & Klasson-Wehler, E. (1998). Endocrine disrupting substances - Impairment of reproduction and development. Swedish Environmental Protection Agency Report 4859. ISBN 91-620-4859-7: 150 pp.
- 90) Eriksson, P., Viberg, H. Jakobsson, E., Orn, U. & Fredriksson, A. (1999) PBDE, 2,2',4,4',5- pentabromodiphenyl ether, causes permanent neurotoxic effects during a defined period of neonatal brain development. *Organohalogen Compounds* 40: 333-336
- 91) Darnerud, P.O. & Sinjari, T. (1996). Effects of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) on thyroxine and TSH blood levels in rats and mice. *Organohalogen Compounds* 29 (Dioxin '96): 316-319.

- 92) Meerts, I.A.T.M., Marsh, G., van Leeuwen-Bol, I., Luijks, E.A.C., Jakobsson, E., Bergman, A. & Brouwer, A. (1998) Interaction of polybrominated diphenyl ether metabolites (PBDE-OH) with human transthyretin *in vitro*. *Organohalogen Compounds* 37: 309-312.
- 93) Helleday, T., Tuominen, K.L., Bergman, A. & Jenssen, D. (1999) Brominated flame retardants induce transgenic recombination in mammalian cells. *Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 439(2): 137-147
- 94) ECB (2003) Technical Guidance Document on Risk Assessment.
- 95) J.E. Delmaar, M.V.D.Z. Park, J.G.M. van Engelen; ConsExpo 4.0 Consumer Exposure and Uptake Models Program Manual; RIVM report 320104004/2005
- 96) Abdelali Lehraiki et al; Phthalates Impair Germ Cell Number in the Mouse Fetal Testis by an Androgen- and Estrogen-Independent Mechanism, *TOXICOLOGICAL SCIENCES* 111(2), 372–382 (2009)
- 97) Barlow, N.J., and P.M. Foster. 2003. Pathogenesis of male reproductive tract lesions from gestation through adulthood following in utero exposure to di(*n*-butyl) phthalate. *Toxicol. Pathol.* 31(4): 397-410.
- 98) Gray, L.E., Jr., J. Laskey, and J. Ostby. 2006. Chronic di-*n*-butyl phthalate exposure in rats reduces fertility and alters ovarian function during pregnancy in female Long Evans hooded rats. *Toxicol. Sci.* 93(1):189-195.
- 99) Lovekamp-Swan, T., and B.J. Davis. 2003. Mechanisms of phthalate ester toxicity in the female reproductive system. *Environ. Health Perspect.* 111(2):139-146.

- 100) Lovekamp, T.N., and B.J. Davis. 2001. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses aromatase transcript levels and estradiol production in cultured rat granulosa cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 172(3): 217-224.
- 101) Davis, B.J., R. Weaver, L.J. Gaines, and J.J. Heindel. 1994b. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses estradiol production independent of FSH-cAMP stimulation in rat granulosa cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 128(2):224-228.
- 102) Davis, B.J., R.R. Maronpot, and J.J. Heindel. 1994a. Di-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses estradiol and ovulation in cycling rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 128(2):216-223.
- 103) Gray, L.E., Jr., J. Ostby, J. Furr, M. Price, D.N. Veeramachaneni, and L. Parks. 2000. Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. *Toxicol. Sci.* 58(2):350-365.
- 104) Mylchreest, E., M. Sar, R.C. Cattley, and P.M. Foster. 1999. Disruption of androgen-regulated male reproductive development by di(*n*-butyl) phthalate during late gestation in rats is different from flutamide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 156(2):81-95.
- 105) Mylchreest, E., R.C. Cattley, and P.M. Foster. 1998. Male reproductive tract malformations in rats following gestational and lactational exposure to di(*n*-butyl) phthalate: An antiandrogenic mechanism? *Toxicol. Sci.* 43(1):47-60.

- 106) Silva, M.J., J.A. Reidy, K. Kato, J.L. Preau Jr., L.L. Needham, and A.M. Calafat. 2007a. Assessment of human exposure to di-isodecyl phthalate using oxidative metabolites as biomarkers. *Biomarkers* 12(2):133-144.
- 107) CDC (Centers for Disease Control and Prevention). 2005. Third National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals. NCEH Pub. No. 05-0570. National Center for Environmental Health Division of Laboratory Sciences, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA [online]. Available: <http://www.cdc.gov/exposurereport/report.htm> [accessed August 30, 2010].
- 108) Brock, J.W., S.P. Caudill, M.J. Silva, L.L. Needham, and E.D. Hilborn. 2002. Phthalate monoesters levels in the urine of young children. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 6(3):309-314.
- 109) Koch, H.M., H. Drexler, and J. Angerer. 2004. Internal exposure of nursery-school children and their parents and teachers to di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP). *Int. J. Hyg. Environ. Health* 207(1):15-22.
- 110) Koch, H.M., R. Preuss, H. Drexler, and J. Angerer. 2005a. Exposure of nursery school children and their parents and teachers to di-n-butylphthalate and butylbenzyl-phthalate. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 78(3):223-229.
- 111) Shea, K.M., and the AAP Committee on Environmental Health. 2003. Pediatric exposure and potential toxicity of phthalate plasticizers. *Pediatrics* 111(6 Pt.1):1467-1474.
- 112) Green, R., R. Hauser, A.M. Calafat, J. Weuve, T. Schettler, S. Ringer, K. Huttner, and H. Hu. 2005. Use of di(2-ethylhexyl) phthalate-containing medical

- products and urinary levels of mono(2-ethylhexyl) phthalate in neonatal intensive care unit infants. *Environ. Health Perspect.* 113(9):1222-1225.
- 113) Sjoberg, P.O., U.G. Bondesson, E.G. Sedin, and J.P. Gustafsson. 1985. Exposure of newborn infants to plasticizers. Plasma levels of di(2ethylhexyl)phthalate during exchange transfusion. *Transfusion* 25(5):424-428.
- 114) Silva, M.J., E. Samandar, J.A. Reidy, R. Hauser, L.L. Needham, and A.M. Calafat. 2007b. Metabolite profiles of di-n-butyl phthalate in humans and rats. *Environ. Sci. Technol.* 41(21):7576-7580.
- 115) Wittassek, M., and J. Angerer. 2008. Phthalates: Metabolism and exposure. *Int. J. Androl.* 31(2):131-138.
- 116) Silva, M.J., D.B. Barr, J.A. Reidy, K. Kato, N.A. Malek, C.C. Hodge, D. Hurtz III, A.M. Calafat, L.L. Needham, and J.W. Brock. 2003. Glucuronidation patterns of common urinary and serum monoester phthalate metabolites. *Arch. Toxicol.* 77(10):561-567.
- 117) Kato, K., M.J. Silva, J.A. Reidy, D. Hurtz, N.A. Malek, L.L. Needham, H. Nakazawa, D.B. Barr, and A.M. Calafat. 2004. Mono(2-ethyl-5-hydroxyhexyl) phthalate and mono-(2-ethyl-5-oxohexyl) phthalate as biomarkers for human exposure assessment to di-(2-ethylhexyl) phthalate. *Environ. Health Perspect.* 112(3):327-330.
- 118) Calafat, A.M., J.W. Brock, M.J. Silva, L.E. Gray Jr., J.A. Reidy, D.B. Barr, and L.L. Needham. 2006. Urinary and amniotic fluid levels of phthalate

- monoesters in rats after the oral administration of di(2-ethylhexyl) phthalate and di-n-butyl phthalate. *Toxicology* 217(1):22-30.
- 119) Silva, M.J., E. Samandar, J.L. Preau, L.L. Needham, and A.M. Calafat. 2006. Urinary oxidative metabolites of di (2-ethylhexyl) phthalate in humans. *Toxicology* 219(1-3):22-32.
- 120) Gray, T.J., K.R. Butterworth, I.F. Gaunt, G.P. Grasso, and S.D. Gangolli. 1977. Short-term toxicity study of di-(2-ethylhexyl) phthalate in rats. *Food Cosmet. Toxicol.* 15(5):389-399.
- 121) Foster, P.M., L.V. Thomas, M.W. Cook, and S.D. Gangolli. 1980. Study of the testicular effects and changes in zinc excretion produced by some n-alkyl phthalates in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 54(3):392-398.
- 122) Foster, P.M., B.G. Lake, M.W. Cook, L.V. Thomas, and S.D. Gangolli. 1981a. Structure-activity requirements for the induction of testicular atrophy by butyl phthalates in immature rats: Effect on testicular zinc content. *Adv. Exp. Med. Biol.* 136 Pt A:445-452.
- 123) Foster, P.M., B.G. Lake, L.V. Thomas, M.W. Cook, and S.D. Gangolli. 1981b. Studies on the testicular effects and zinc excretion produced by various isomers of monobutyl-o-phthalate in the rat. *Chem. Biol. Interact.* 34(2):233-238.
- 124) Foster, P.M., J.R. Foster, M.W. Cook, L.V. Thomas, and S.D. Gangolli. 1982. Changes in ultrastructure and cytochemical localization of zinc in rat testis following the administration of di-n-pentyl phthalate. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 63(1):120-132.

- 125) Creasy, D.M., J.R. Foster, and P.M. Foster. 1983. The morphological development of di-n-pentyl phthalate induced testicular atrophy in the rat. *J. Pathol.* 139(3):309-321.
- 126) Creasy, D.M., L.M. Beech, T.J. Gray, and W.H. Butler. 1987. The ultrastructural effects of di-n-pentyl phthalate on the testis of the mature rat. *Exp. Mol. Pathol.* 46(3):357-371.
- 127) Lloyd, S.C., and P.M. Foster. 1988. Effect of mono-(2-ethylhexyl)phthalate on follicle-stimulating hormone responsiveness of cultured rat Sertoli cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 95(3):484-489.
- 128) Heindel, J.J., and R.E. Chapin. 1989. Inhibition of FSH-stimulated cyclic AMP accumulation by mono-(2-ethylhexyl) phthalate in primary rat Sertoli cell cultures. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 97(2): 377-385.
- 129) Gray, T.J., I.R. Rowland, P.M. Foster, and S.D. Gangolli. 1982. Species differences in the testicular toxicity of phthalate esters. *Toxicol. Lett.* 11(1-2):141-147.
- 130) NTP (National Toxicology Program). 1991. Final Report on the Reproductive Toxicity of Di-N-Butyl Phthalate (CAS. No. 84-74-2) in Sprague-Dawley Rats. T-0035C. NTIS PB92-111996. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institute of Health, National Toxicology Program, Research Triangle Park, NC.
- 131) Wine, R.N., L.H. Li, L.H. Barnes, D.K. Gulati, and R.E. Chapin. 1997. Reproductive toxicity of di-n-butylphthalate in a continuous breeding protocol in Sprague-Dawley rats. *Environ. Health Perspect.* 105(1):102-107.

132) Carruthers, C.M., and P.M. Foster. 2005. Critical window of male reproductive tract development in rats following gestational exposure to di-*n*-butyl phthalate. Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol. 74(3):277-285.