

Alchilfenoli: valutazione dei rischi per gli ecosistemi acquatici e per la salute umana con particolare riferimento agli effetti endocrini

Fulvio FERRARA (a), Enzo FUNARI (a), Elena De FELIP (b), Giancarlo DONATI (a),
Maria Elsa TRAINA (a) e Alberto MANTOVANI (b)

(a) Laboratorio di Igiene Ambientale, (b) Laboratorio di Tossicologia Comparata ed Ecotossicologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Riassunto. - Gli *endocrine disrupting chemicals* (EDC) sono un insieme eterogeneo di sostanze in grado di interferire con numerose funzioni endocrine. Gli effetti nocivi degli EDC sono stati messi in evidenza in diversi taxa e vi è una considerevole attenzione verso i possibili rischi per la salute umana. Gli alchilfenoli rappresentano una delle categorie più importanti di EDC, si formano per degradazione nell'ambiente o negli impianti di trattamento delle acque reflue dei rispettivi polietossilati, composti largamente utilizzati come tensioattivi in numerose formulazioni chimiche. Hanno in genere elevati fattori di bioconcentrazione (BCF) e accumulano nei sedimenti e negli organismi acquatici. Gli alchilfenoli mostrano un'attività estrogenica; studi su roditori e pesci hanno evidenziato effetti riproduttivi e sullo sviluppo. In uno studio recente, i livelli di alchilfenoli determinati nei prodotti ittici dell'Adriatico hanno indicato un rischio sanitario non trascurabile per i forti consumatori di questi prodotti.

Parole chiave: nonilfenolo, octilfenolo, tossicità, ecotossicità, effetti endocrini.

Summary (*Alkylphenols: evaluation of the risk to aquatic ecosystems and human health with reference to endocrine effects*). - Endocrine disrupting chemicals (EDC) are a heterogeneous group of substances that can interfere with many endocrine functions. Their effects have been demonstrated in different taxa and they are suspected to affect human health. Alkylphenols are an important group of EDC. They are formed from the degradation of alkylphenol polyethoxylates in the environment or in the sewage treatment plants. They are generally characterized by a high bioconcentration factor (BCF) and accumulate both in sediments and aquatic species. Alkylphenols (APE) show estrogenic activity: studies on fish and rodents put into evidence on both reproductive and developmental effects. In a recent study, the levels of APE detected in seafood from the Adriatic Sea showed a no negligible human health risk for strong fish consumers.

Key words: nonylphenol, octylphenol, ecotoxicity, toxicity, endocrine disrupters.

Introduzione

Gli *endocrine disrupting chemicals* (EDC) sono un insieme eterogeneo di sostanze in grado di interferire con numerose funzioni endocrine, ed in particolare con gli steroidi sessuali e la tiroide, attraverso differenti meccanismi, quali ad esempio interazioni recettoriali (agonismo od antagonismo), inibizione della sintesi e/o del trasporto degli ormoni [1]. Gli alchilfenoli (AF) rappresentano una delle categorie più importanti di EDC, in considerazione sia della potenziale esposizione della popolazione generale che della dimostrata attività estrogenica. In Fig. 1 e 2 sono confrontate le formule di struttura degli ormoni sessuali e del nonilfenolo.

Gli effetti degli EDC sono stati dimostrati in diversi taxa, nei quali sono stati osservati effetti sulla differenziazione sessuale, decrementi della fertilità e riduzioni del tasso di accrescimento [2, 3]. Si sospetta che l'esposizione agli EDC possa costituire un rischio

per la salute umana, tuttavia al momento manca una dimostrazione univoca di una relazione causa-effetto: vengono ipotizzate associazioni con aumenti dell'incidenza di patologie dell'apparato riproduttivo maschile quali seminomi, malformazioni (ipospadia, criptorchidismo) e alterazioni dei parametri seminali e di conseguenza della fertilità in alcune aree dei paesi industrializzati [4-6]. Riguardo alla salute riproduttiva femminile, gli EDC possono rappresentare un fattore di rischio per patologie quali l'abortività spontanea [7] e la pubertà precoce [8]. L'approfondimento scientifico di questo problema è considerato prioritario da parte di organizzazioni internazionali come la WHO, l'OCSE e l'UE. I dati sperimentali concordemente indicano lo sviluppo prenatale e postnatale come fasi particolarmente vulnerabili agli effetti degli EDC [9].

Questa rassegna intende affrontare in maniera integrata le problematiche sanitarie ed ambientali relative agli AF.

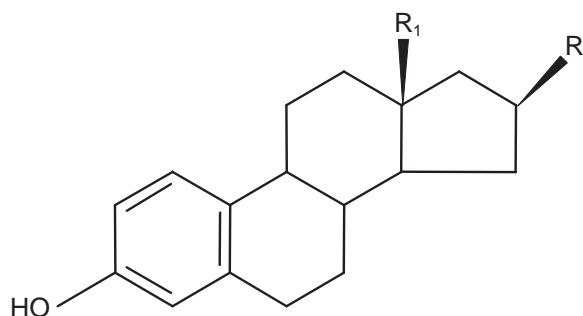


Fig. 1. - Formula di struttura degli ormoni sessuali.

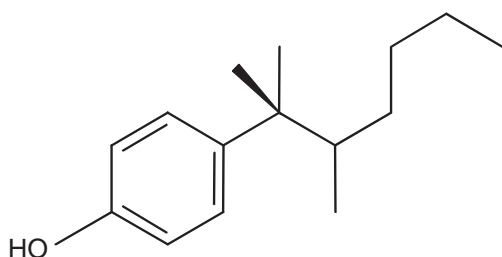


Fig. 2. - Formula di struttura del nonilfenolo.

Caratteristiche generali ed utilizzi

Gli AF sono composti fenolici con catene alchiliche di varia lunghezza. Il nonilfenolo è utilizzato come intermedio nella produzione di resine fenoliche ed epossidiche, ossime fenoliche, stabilizzanti plastici e trionilfenilfosfito. E' inoltre utilizzato nella produzione degli alchilfenoli polietossilati (APE), in particolare nonilfenoli polietossilati (NPE). Questi ultimi sono tensioattivi non-ionici largamente utilizzati nei detergenti delle industrie tessile e conciaria, in attività domestiche, nelle vernici, come disperdenti nella formulazione di pesticidi ad uso agricolo e domestico e come emulsionanti in diversi prodotti per l'igiene e l'uso personale [10, 11]. Il nonilfenolo (NF) è di gran lunga il composto più importante commercialmente tra gli alchilfenoli [12].

La presenza di AF (soprattutto NF, in parte minore octilfenolo, OF) nei corpi idrici è dovuta ai processi degradativi degli APE che si verificano in essi o negli impianti di depurazione [13, 14].

Gli AF, essendo caratterizzati da buone proprietà antiossidanti, vengono impiegati anche nella produzione delle plastiche trasparenti utilizzate nell'industria alimentare, al fine di ritardarne l'ingiallimento o l'opacamento; pertanto, le bevande e gli alimenti che ne vengono a contatto possono risultare contaminati [15].

Livelli ambientali

Corpi idrici

Gli AF sono composti idrofobici, con valori di Kow di 4,0 e 4,6 rispettivamente per NF e OF [16], e sono caratterizzati da elevata persistenza ambientale [17, 18]. Vengono considerati contaminanti ubiquitari dell'ambiente acquatico, ove tendono ad associarsi al particolato e ai sedimenti [18-23].

NF e NPE sono stati riscontrati in acque superficiali, dolci e marine, sotterranee, nei sedimenti, e in acque degli affluenti ed effluenti degli scarichi fognari.

I dati disponibili in Europa ed in particolare in Italia sulla contaminazione dei corpi idrici da APE e AF sono limitati a pochi studi (Tab. 1). Per le acque superficiali i dati disponibili riguardano principalmente il NF e mostrano concentrazioni notevolmente variabili. In uno studio tedesco sono state riportate concentrazioni elevate di NF in prossimità degli effluenti degli impianti di trattamento delle acque fognarie [24]. In uno studio sulla presenza di alcuni alchilfenoli nelle acque del fiume Po negli anni 1994-1996, sono state rilevate concentrazioni di NF (come somma dei suoi isomeri) comprese tra < 0,1 e 158 µg/l. Tuttavia i livelli osservati hanno mostrato un andamento decrescente con un livello massimo di 8,8 µg/l nel 1996. Questo andamento non è stato osservato per gli altri alchilfenoli. Sono stati inoltre riportati livelli di 4-*ter*-OF compresi tra < 0,1 e 28 µg/l [25]. I pochi studi condotti sulle acque sotterranee si riferiscono a campioni prelevati in prossimità di fiumi, pertanto si tratta di acque provenienti dall'infiltrazione di questi corpi idrici piuttosto che dalla percolazione di acque piovane [26]. Per le acque marine, i dati disponibili in letteratura mostrano livelli di contaminazione da APE generalmente inferiori rispetto alle acque interne. In uno studio sulla Laguna Veneta, sono stati determinati livelli di NPE di 0,5-4,5 µg/l [27]. In tutti gli altri casi, i rilevamenti sono stati effettuati in aree estuarine; anche in questo caso uno studio croato ha rilevato maggiori concentrazioni in prossimità di scarichi [28].

Organismi acquatici

Il NF, essendo lipofilo e persistente, tende ad accumulare negli organismi acquatici; sono stati riportati fattori di bioconcentrazione di 90-110 in crostacei (*Crangon crangon*), 2740-4120 in molluschi (*Mytilus edulis*), e 1200-1300 in pesci (*Gasterosteus aculeatus*) [29]. I dati analitici disponibili sul biota sono riportati in Tab. 2.

Come si può osservare da questa tabella, le concentrazioni di NF in pesci e molluschi possono essere anche superiori a 0,5 mg/kg peso fresco (pf) [30, 31]. In particolare, in uno studio italiano [32] è stata riscontrata la presenza diffusa di NF in molluschi filtratori (bivalvi)

Tabella 1. - Concentrazioni di alchilfenoli ed alchilfenoli etossilati nei corpi idrici europei

Tipologia corpo idrico	Concentrazioni	Rif. Bibl.
Acque di superficie		
Croazia, Fiume Sava	NF: 0,1-1 µg/l	[65]
Germania (Baviera) alcuni fiumi	NF: 0,01-0,08 µg/l	[24]
Germania (Baviera) alcuni fiumi in prossimità di effluenti degli impianti di trattamento delle acque fognarie	NF: 0,1-1 µg/l	[24]
Inghilterra, 6 fiumi	NF: 0,2-12 µg/l	[66]
Italia, fiume Po	NF: < 0,1-158,0 µg/l nel 1994 NF: < 0,1- 32,0 µg/l nel 1995 NF: < 0,1- 8,8 µg/l nel 1996 4- <i>ter</i> -OF: < 0,1-28,0 µg/l nel 1994 4- <i>ter</i> -OF: < 0,1-25,0 µg/l nel 1995 4- <i>ter</i> -OF: < 0,1-26,7 µg/l nel 1996	[25]
Svizzera, Fiume Glatt	NF: 0,3-45 µg/l	[67-69]
Acque sotterranee		
Croazia	NF: 0,1-1 µg/l	[65]
Svizzera, in prossimità del fiume Glatt	NF: 0,1-3,1 µg/l NF: 0,2-0,96 µg/l	[26] [69]
Acque marine (estuari)		
Croazia	NF e NF1EO: < 0,02-0,12 µg/l NF2EO < 0,02 µg/l	[28]
Croazia (in prossimità di scarichi)	NF: 0,28-2,3 µg/l NF1EO: 0,09-7,4 µg/l NF2EO: 0,08-5,6 µg/l	[28]
Inghilterra, alcuni fiumi	NF: nella maggior parte dei campioni 0,08-0,32 µg/l, punte sino a 5,2 µg/l	[66]
Italia, laguna Veneta	NFnEO: 0,5-4,5 mg/l	[27]

NF: nonilfenolo; 4-*ter*-OF: 4-*ter*-octilfenolo; NF1,2 EO: nonilfenolo mono,di- etossilato; NFnEO: nonilfenolo polietossilato.

Tabella 2. - Concentrazioni di alchilfenoli ed alchilfenoli etossilati nei biota acquatici

Area geografica	Taxa	Concentrazioni	Rif. Bibl.
Inghilterra, estuario di alcuni fiumi	Teleostei	NF: 5-800 µg/kg pf OF: 0-17 µg/kg pf	[31] [30]
Italia, mare Adriatico (campionatura dal Veneto alla Puglia)	Molluschi bivalvi	NF: 243-265 µg/kg pf OF: 2,7-4,9 µg/kg pf OPE: 0,1-0,2 µg/kg pf	[32]
Italia, mare Adriatico (campionatura dal Veneto alla Puglia)	Molluschi cefalopodi	NF: 67-697 µg/kg pf OF: 3,6-18,6 µg/kg pf OPE: 0,1-0,4 µg/kg pf	[32]
Svezia, prossimità di uno scarico	Mitili	NF: 400 µg/kg ps NF1EO: 275 µg/kg ps NF2EO: 130 µg/kg ps NF3EO: 40 µg/kg ps	[70]

NF: nonilfenolo; OF: octilfenolo; OPE: octilfenolo polietossilato; NF1,2,3 EO: nonilfenolo mono,di, tri- etossilato.

e predatori (cefalopodi) prelevati nel 1997 lungo tutta la costa del Mare Adriatico. Le concentrazioni di OF riportate sono sempre risultate notevolmente inferiori, probabilmente in ragione della minore emissione di octifenoloetossilati.

Ecotossicologia

Sono disponibili diversi studi sulla tossicità acuta e dello sviluppo in alghe, invertebrati acquatici e teleostei in seguito a trattamento con AF e/o APE (Tab. 3). Nelle

Tabella 3. - Studi di ecotossicologia su alchilfenoli ed alchilfenoli etossilati

Classe e specie	Composto	Parametri	Livelli di dose	Rif. Bib.
Alghe				
<i>Chlorella pyrenoidosa</i> (acqua dolce)	NF	LC ₅₀ a 24 h	1500 µg/l	[71]
<i>Selenastrum capricornutum</i> (acqua dolce)	NF	Tossicità a 96 h	LOEC ^{subproduzione} 1480 µg/l	[34]
<i>Selenastrum capricornutum</i> (acqua dolce)	NF9EO	Tossicità a 96 h	NOEC 694 µg/l	[72]
<i>Scenedesmus subspicatus</i> (acqua dolce)	NF	Inibizione della crescita, 72 h	NOEC ^{ereschia} 8000 µg/l	[33]
<i>Skeletonema costatum</i> (marina)	NF	Inibizione della crescita, 96 h	EC ₅₀ 56,3 µg/l	[37]
Crosteacei				
<i>Ceriodaphnia dubia</i> (acqua dolce)	NF1EO; NF2EO	LC ₅₀ a 48 h	1040 µg/l	[35]
<i>Daphnia magna</i> (acqua dolce)	NF	Tossicità a 48 h	EC ₅₀ 85 µg/l	[34]
<i>Daphnia magna</i> (acqua dolce)	NF	Tossicità a 21 gg	NOEC 24 µg/l	[73]
<i>Hyalella azteca</i> (acqua dolce)	NF	Tossicità a 96 h	EC ₅₀ 20,7 µg/l	[34]
<i>Mysidopsis bahia</i> (marina)	NF	LC ₅₀ 96 h	43 µg/l	[74]
<i>Mysidopsis bahia</i> (marina)	NF	Tossicità a 28 gg	LOEC ^{lunghezza} 6,7 µg/l	[36]
<i>Mysidopsis bahia</i> (marina)	NF1-5EO	LC ₅₀ a 48 h	NOEC 3,9 µg/l	[36]
	NF9EO		1660-3340 µg/l	
	NF15EO		710-2000 µg/l	
	NF40EO		2570 µg/l	
			40 000-10 ⁶ µg/l	
Molluschi				
<i>Mytilus edulis</i>	NF10EO	LC ₅₀ 96 h	12 000 µg/l	[37]
<i>Mytilus edulis</i>	NF10EO	Effetti sulla fertilità e sullo sviluppo, 72 h	2000 µg/l: sviluppo sino allo stadio di blastula	[37]
			1000 µg/l: sviluppo sino allo stadio di veliger	[75]
			Assenza di effetti a 200 µg/l	
Teleostei				
Uova di <i>Oryzias latipes</i> (acqua dolce)	4- <i>ter</i> -OF	Fertilità e sopravvivenza	Alterazioni significative a 20 µg/l	[39]
<i>Lepomis macrochirus</i> (acqua dolce)	NF	Tossicità a 28 gg	LOEC ^{mortalità} di 126 µg/l	[76]
<i>Pimephales promelas</i> (acqua dolce)	NF	Tossicità acuta, 96 h	NOEC ^{mortalità} di 59,5 µg/l	[34]
Embrioni di <i>Pimephales promelas</i> (acqua dolce)	4-NF ramificato	Tossicità a 33 gg	LOEC ^{mortalità} 128 µg/l	[38]
<i>Cyprinodon variegatus</i> (marina)	4-NF ramificato	Tossicità acuta, 96 h	LOEC perdita equilibrio 98 µg/l	[40]
			NOEC sopravvivenza 14 µg/l	[77]
			LC ₅₀ ^{sopravvivenza} 7,4 µg/l	
			NOEC 240 µg/l	
Teleostei – effetti estrogenici				
<i>Onchorhynchus mykiss</i> (acqua dolce)	NF	Aumento della vitellogenina plasmatica	Effetti a ≥ 10 µg/l	[43]
	OF	Riduzione del tasso di accrescimento del testicolo	Effetti a ≥ 3 µg/l	[43, 44]
<i>Onchorhynchus mykiss</i> (acqua dolce)	NF	Aumento della vitellogenina plasmatica (maschi)	NOEC 5,02 µg/l	[21]

NF: nonilfenolo; LC₅₀: concentrazione letale per il 50% degli organismi; NF1-nEO: nonilfenolo mono, poli-etossilato; OF: octilfenolo; 4-*ter*-OF: 4-*ter*-octilfenolo.

alghe è stata osservata inibizione della crescita a livelli di NF dell'ordine di $\leq 50 \mu\text{g/l}$ [33]. Così pure in alcuni studi su crostacei di acqua dolce o marini sono state riscontrate LC_{50} (*lethal concentration*) o EC_{50} (*effect concentration*) acute per il NF inferiori ai $50 \mu\text{g/l}$ [34]; per i NPE il valore più basso di LC_{50} a 48 h finora riportato è stato di $1040 \mu\text{g/l}$ per il NF 1EO [35]. Sempre per il NF si è osservata tossicità prolungata a concentrazioni dell'ordine di $5 \mu\text{g/l}$ [36].

I molluschi non sembrano particolarmente suscettibili, rispetto ai crostacei, agli effetti dei NFE: è stato osservato un arresto dello sviluppo embrionale alla concentrazione di $1000 \mu\text{g/l}$ per il NF 1EO [37].

Nei teleostei si osservano effetti acuti a concentrazioni di NF dell'ordine di $\leq 100 \mu\text{g/l}$ [34, 38] ed effetti prolungati (sviluppo embrionale) a concentrazioni di AF dell'ordine di $\leq 20 \mu\text{g/l}$ [39, 40].

Effetti endocrini: un'attenzione specifica meritano gli studi sugli effetti endocrini nei teleostei. Il NF, OF e NPE hanno mostrato attività estrogenica in vari test *in vitro* [21, 22, 41, 42]. Effetti sulla riproduzione e lo sviluppo riconducibili ad attività estrogenica sono stati evidenziati *in vivo* nei teleostei sia attraverso saggi sperimentali che osservazioni in campo [19]; nella maggior parte degli studi, tali effetti sono stati osservati alle concentrazioni di $10\text{-}20 \mu\text{g/l}$. NF e OF inducono un aumento della vitellogenina plasmatica ed una riduzione significativa del tasso di accrescimento del testicolo nei pesci a concentrazioni rispettivamente di $10 \mu\text{g/l}$ e $3 \mu\text{g/l}$ [43, 44]. In maschi di trota esposti a NF, si è osservata una *no observed effect concentration* (NOEC) di $5,02 \mu\text{g/l}$ [21] per l'aumento della vitellogenina plasmatica. Si può complessivamente concludere che, almeno nei teleostei, gli effetti estrogenici risultano i parametri critici per valutare il rischio ecotossicologico.

Tossicologia

Tossicità generale

Nel ratto il *p-ter-OF* mostra una modesta biodisponibilità sistemica per via orale ($\leq 10\%$); le maggiori concentrazioni tissutali si ritrovano nel grasso e nel fegato, tuttavia diminuiscono rapidamente con il cessare dell'esposizione. Questi dati, ancorché incompleti, non indicano un significativo potenziale di bioaccumulo.

Gli AF, in genere, presentano una bassa tossicità in seguito ad esposizione prolungata per via orale. Un complesso di studi effettuati negli anni '60 indica che nei roditori, gli effetti principali osservati riguardano l'incremento del peso relativo di fegato e rene, senza significative alterazioni istopatologiche; nel cane si sono osservate, solo in alcuni studi, lesioni miocardiche. In complesso dai dati disponibili il *no observed effect level*

(NOEL) più basso è di $8,5 \text{ mg/kg}$ peso corporeo (pc) (cane, 2 anni); tuttavia sono scarsi gli studi effettuati secondo le linee guida ed i requisiti attuali. Gli AF sono risultati privi di potenziale genotossico nei numerosi studi effettuati; non sono disponibili test di cancerogenesi (dati forniti dall'Inventario Nazionale Sostanze Chimiche, Istituto Superiore di Sanità, ISS).

In uno studio recente di tossicità subcronica nel ratto con il *p-NF* sono stati osservati effetti nefrotossici reversibili, riduzione del peso corporeo e del consumo di alimento alla dose più alta: il *lowest observed effect level* (LOEL) e NOEL erano rispettivamente di 150 e 50 mg/kg pc [45].

Effetti endocrini, riproduttivi e sullo sviluppo prenatale e postnatale

Gli effetti estrogenici degli AF sono noti dal 1938 e sono stati confermati da svariati studi pubblicati nell'ultimo decennio, su modelli *in vitro* [19, 22, 41] ed *in vivo* [46]. Gli AF vanno, quindi, considerati a tutti gli effetti come EDC nei mammiferi, in quanto inducono alterazioni endocrine nell'organismo integro. Gli effetti endocrini sono considerati il parametro principale su cui basare la valutazione del rischio tossicologico degli AF. Sulla base delle informazioni disponibili, le proprietà tossicologiche intrinseche degli AF mostrano caratteristiche specifiche nonché alcuni punti critici suscettibili di ulteriori chiarimenti.

Meccanismi di azione. - Gli AF interagiscono direttamente con i recettori estrogenici *in vitro* [41]. La maggiore attività estrogenica si osserva con un singolo gruppo alchile *ter* in posizione *para*; *in vivo* la potenza estrogenica del 4-NF è maggiore di un fattore 2 rispetto al 4-*ter* OF. La potenza *in vivo* del 4-NF è risultata tuttavia da 10^4 a 10^6 di volte inferiore a quella di estrogeni noti ($17\text{-}\beta\text{-estradiolo}$ o dietilstilbestrolo - DES) [47]. Il NF modula in maniera differenziata l'espressione di geni regolati dagli estrogeni in cellule MCF-7, derivate da carcinoma mammario umano [48]. Inoltre la modulazione può presentare caratteristiche tessuto-specifiche. Uno studio sul ratto neonato ha mostrato che, a differenza del DES, l'OF aumenta l'espressione dei recettori estrogeni (ER) alfa o beta nell'ipofisi anteriore ed in misura minore nell'ipotalamo dei ratti maschi, ma non nell'utero o nella prostata [49, 50]. Sempre nel ratto neonato e prima della maturità sessuale l'OF induce alterazioni ormonali (prolungata iperprolattinemia nei due sessi; riduzione di FSH e testosterone nei maschi; disturbi nel rilascio ciclico di LH, FSH, e prolattina nelle femmine) che suggeriscono una modulazione dell'asse neuroipofisario [49-51]. Ad ulteriore sostegno di tale ipotesi, benché il NF non induca significativi effetti neurocomportamentali in seguito a esposizione prenatale nel ratto [52] sono state osservate alterazioni del volume

del nucleo sessualmente dimorfico dell'area mediale preottica con il NF [53] e con il *p-ter-OF* [49]; queste alterazioni vengono considerate indicatori di possibili effetti sul comportamento riproduttivo. Il sistema neuroendocrino potrebbe quindi essere un bersaglio sensibile all'azione degli AF.

Non possono essere esclusi effetti sulla sintesi ed il trasporto ormonali. In epatociti di ratto il *t-OF* viene trasformato in un complesso di prodotti, in gran parte catecoli semplici e metilati; benché sia improbabile che tali prodotti siano in grado di interagire con gli ER, non può essere escluso che il *t-OF* e i suoi metaboliti agiscano come substrati di enzimi che determinano il metabolismo e l'escrezione ormonali, in quanto le vie di biotrasformazione sono analoghe a quelle del catabolismo degli estrogeni endogeni [54]. Pertanto, diversi dati recenti indicano che gli AF potrebbero alterare l'equilibrio endocrino anche attraverso vie diverse dalla diretta interazione recettoriale nei tessuti riproduttivi. Tuttavia, non è ancora chiara la estrapolabilità all'essere umano e la effettiva rilevanza per la valutazione del rischio, in particolare riguardo alle alterazioni dell'asse ipotalamico-ipofisario.

Effetti a breve termine. - Uno studio di Katsuda *et al.* [55] effettuato con somministrazione sc del *p-ter-OF* in ratte adulte ovariectomizzate indica che gli effetti estrogenici (incremento del peso uterino, aumento di altezza delle cellule endometriali) sono correlati alla presenza di livelli plasmatici relativamente elevati (≥ 80 ng/ml) del composto originario. Uno studio analogo effettuato con il *p-NF* ha evidenziato una maggiore sensibilità delle femmine immature rispetto alle femmine adulte ovariectomizzate [56].

In seguito ad esposizione orale a breve termine (≤ 25 gg) a *4-NF* nel ratto si è osservato un NOEL di 25 mg/kg pc per i classici effetti morfologici dei composti ad azione estrogenica nelle femmine immature, quali incremento del peso uterino ed una maggiore precocità della comparsa della pervietà vaginale [46].

Riguardo al *4-ter-OF*, una esposizione durante la prima fase della gravidanza (dalla fecondazione sino all'inizio dell'organogenesi) induce nel ratto un incremento significativo della embriofetale in presenza di minima tossicità materna (LOEL e NOEL: 31,3 e 15,6 mg/kg pc, rispettivamente). Tale effetto, non accompagnato da alcun incremento di malformazioni, suggeriva un'alterazione della recettività uterina e/o della risposta deciduale [57].

Effetti in seguito ad esposizioni prolungate. - L'unico studio adeguato disponibile sugli effetti del NF sulla fertilità maschile nel ratto adulto (somministrazione nella dieta per 90 gg), non ha evidenziato effetti sul testicolo o sui parametri seminali neppure al livello di dose più alto (150 mg/kg pc), in cui era invece osservabile una modesta nefrotossicità [45].

Per contro il periodo di sviluppo del sistema riproduttivo può essere più vulnerabile rispetto alla fase della maturità sessuale. Una riduzione significativa della fertilità femminile e del peso delle ovaie, insieme ad una maggiore precocità della pervietà vaginale, è stata osservata in ratte esposte *in utero*, durante l'allattamento e fino alla maturità sessuale a 50 mg/kg pc di NF per gavaggio: erano inoltre presenti aumentata mortalità neonatale e alterazioni istopatologiche epatiche e renali, queste ultime anche nella generazione parentale. Non sono stati osservati disturbi della fertilità maschile, né alterazioni seminologiche. Complessivamente questo studio ha fornito un NOEL di 10 mg/kg pc e 50 mg/kg [58].

Uno studio a 3 generazioni sul ratto mediante esposizione attraverso la dieta a *4-NF* [59] ha evidenziato una più precoce comparsa della pervietà vaginale nel corso delle 3 generazioni a ≥ 30 mg/kg pc; al livello di esposizione inferiore (corrispondente ad un'assunzione di ≥ 9 mg/kg pc) sono osservati solo lievi aumenti della lunghezza del ciclo estrale e della durata della gravidanza, di non chiaro significato biologico. Riguardo agli effetti sui parametri maschili, era presente solo una ridotta concentrazione dello sperma nell'epididimo nella seconda generazione a ≥ 30 mg/kg. Anche gli studi multigenerazionali sul *p-ter-OF* non mostrano un forte impatto sulla riproduzione. In un test a 2 generazioni nel ratto è stato osservato solo un ritardo nell'insorgenza della pubertà in ambedue i sessi, probabilmente associato al generale ritardo di crescita, alla dose più alta (2000 ppm, equivalenti a ≥ 100 mg/kg pc); il NOEL era di 200 ppm, equivalenti a ≥ 10 mg/kg pc [10]. In complesso, gli studi indicano quindi che gli effetti estrogenici sulla riproduzione degli AF sono comparativamente meno evidenti in seguito ad esposizione prolungata.

Per contro, nello studio già citato a 3-generationi sul ratto con *4-NF* [60] si è osservato un incremento di alterazioni istopatologiche renali a carattere cronico, di intensità crescente nel corso delle generazioni; nei piccoli dell'ultima generazione l'effetto si osservava anche al livello di dose più basso saggiato (200 ppm corrispondenti ad almeno 9 mg/kg pc), che non può quindi essere considerato come un LOEL. Pertanto, in seguito ad esposizioni prolungate la nefrotossicità sia nell'adulto [45] che soprattutto nell'organismo immaturo, appare un parametro più sensibile rispetto agli effetti propriamente riproduttivi.

Effetti a basse dosi. - Rimane ancora controversa la possibilità per gli EDC di indurre effetti endocrini a livelli di dose molto bassi, dell'ordine di 100 μ g/kg pc. Tali effetti potrebbero verificarsi verosimilmente attraverso interazioni con specifici recettori in fasi biologiche particolarmente vulnerabili, quali determinate "finestre" dello sviluppo prenatale e perinatale. Benché ulteriori studi siano necessari per chiarire l'effettivo meccanismo

ed anche la plausibilità biologica, alcuni studi mostrano che un rischio per esposizioni alle basse dosi potrebbe non escludersi: alterazioni dello sviluppo riproduttivo sono state osservate nel topo in seguito all'esposizione intrauterina a 50 µg/kg pc di bisfenolo A, un EDC debole ma capace di interagire con gli ER.

Riguardo agli AF, riduzioni del 10-21% nella dimensione del testicolo e nella spermatogenesi sono state evidenziate nella prole maschile di ratte esposte a 1 mg/l di OF nell'acqua di bevanda (corrispondente a ca 100 µg/kg pc), prima dell'accoppiamento e durante la gestazione e allattamento per un totale di 8-9 settimane [60]. Secondo una breve comunicazione degli stessi autori questi risultati non sono stati tuttavia confermati in un successivo studio [61]. Pertanto, la plausibilità biologica di effetti endocrini a basse dosi non può essere al momento confermata per gli AF; tuttavia, l'argomento è certamente meritevole di ulteriori studi data la possibile rilevanza per la valutazione del rischio.

Situazione normativa

I problemi posti dagli utilizzi degli APE sono attualmente oggetto di una valutazione del rischio a livello comunitario, ed hanno già da tempo destato attenzione a livello internazionale.

La raccomandazione 92/8 della PARCOM (*Oslo and Paris Commissions*, Convenzione inter-governativa per la protezione dell'ambiente marino del nord-est Atlantico) ha proposto la messa al bando dei NPE per gli usi domestici a partire dal 1995 e per gli usi industriali dal 2000. A queste raccomandazioni sono seguiti provvedimenti nazionali: molti paesi hanno drasticamente limitato l'uso degli APE (Svezia, Belgio, Inghilterra, Germania, Olanda, ecc.), mentre la Svizzera li ha del tutto banditi.

In Italia non è stata ancora emanata una normativa specifica. Sulla base delle informazioni disponibili, tuttavia, risulta che le industrie operanti nel territorio nazionale abbiano aderito alla raccomandazione di interrompere l'uso dei NPE nei prodotti per uso domestico (Dipartimento della Prevenzione, Ministero della Sanità, comunicazione personale).

Valutazione dei rischi sanitari e ambientali

Sulla base dei dati disponibili si possono evidenziare alcuni elementi critici per la valutazione dei rischi sanitari ed ambientali.

L'utilizzo di APE, e soprattutto di NPE, può essere concentrato in particolari settori industriali quali quello tessile, della concia e delle cartiere. Va considerato inoltre che gli AF sono moderatamente mobili nei corpi idrici, dove vengono prevalentemente adsorbiti ai sedimenti, e

che le concentrazioni sono maggiori in prossimità degli effluenti degli impianti di trattamento delle acque reflue [24, 28]. Questo porterebbe a livelli ambientali notevolmente maggiori nelle aree a più alta concentrazione di uso degli APE. Non sono ancora disponibili studi ambientali su ampia scala che permettano di valutare la diffusione degli AF, come tali, nei corpi idrici del territorio nazionale. Sarebbe quanto mai opportuno poter disporre di una mappatura con la localizzazione delle attività nelle quali vengono utilizzati gli APE, in modo da poter individuare le aree maggiormente a rischio di contaminazione.

A causa della loro lipofilità e persistenza, gli AF hanno fattori di bioconcentrazione relativamente elevati [29] e tendono a bioaccumulare negli organismi acquatici, sia vertebrati che invertebrati [30, 31]. Gli effetti tossici variano notevolmente tra le diverse specie acquatiche. In alcune specie di artropodi e teleostei sono stati riportati NOEC per esposizioni prolungate uguali o inferiori a 5 µg/l [36].

L'attività estrogenica degli AF è stata dimostrata in specie ittiche. Si può complessivamente concludere che, almeno nei teleostei, gli effetti estrogenici sono i parametri critici per valutare il rischio ecotossicologico. Per il NF si può definire una NOEC nella trota (*Onchorinchus mykiss*) di ca 5 µg/l [21]; per contro una NOEC per gli effetti estrogenici non è stata tuttora determinata per l'OF, in quanto incrementi della vitellogenina plasmatica e ipotrofia testicolare sono stati osservati a concentrazioni pari a 3 µg/l [43, 44].

L'attività endocrina degli AF è inferiore di alcuni ordini di grandezza rispetto a quella di altri estrogeni, come ad esempio il 17-β-estradiolo. La loro rilevanza ambientale e sanitaria è dovuta alle ingenti quantità che possono venire immesse nei corpi idrici. Pertanto gli AF possono contribuire in misura non indifferente all'esposizione complessiva agli estrogeni ambientali.

L'attività endocrina degli AF è prevalentemente dovuta ad una diretta interazione con i recettori degli estrogeni nei tessuti bersaglio [41, 50], tra cui può essere particolarmente importante l'asse neuroendocrino [49, 54]; non possono essere tuttavia esclusi anche effetti sulla sintesi ed il trasporto ormonale [54].

Per il NF, nel ratto è stato osservato un NOEL di 25 mg/kg per gli effetti sull'utero delle femmine immature [46]. Per l'OF è stato individuato un NOEL di 15,6 mg/kg pc per gli effetti sulla prime fasi della gravidanza [57]. Gli effetti estrogenici tipici, evidenti soprattutto sull'apparato riproduttivo femminile, appaiono correlati ai livelli plasmatici relativamente elevati del composto parente [62]; quindi potrebbero essere parametri particolarmente rilevanti per la valutazione dei rischi in seguito ad esposizioni accidentali a breve termine, lavorative od in seguito a sversamenti nell'ambiente. Per

contro è possibile che questi picchi plasmatici siano più difficilmente raggiungibili mediante un'esposizione continua attraverso la dieta o l'acqua potabile.

Gli studi disponibili a più generazioni di qualità adeguata non mostrano una forte vulnerabilità del sistema riproduttivo al NF e all'OF [10, 58]. In particolare, la nefrotossicità nell'organismo immaturo appare un parametro più sensibile rispetto agli effetti propriamente riproduttivi del NF [59]: per tali alterazioni, osservabili anche al livello di dose più basso saggiato (≥ 9 mg/kg pc) non può essere definito un NOEL. Il meccanismo degli effetti renali degli AF non è stato ancora chiarito: è però interessante notare come, nel topo, le alterazioni del metabolismo di estrogeni ed androgeni possano contribuire al verificarsi di anomalie nello sviluppo renale [63].

Per quanto riguarda una valutazione del rischio per la salute umana, i dati disponibili sono tuttora insufficienti. In particolare:

a) considerando gli usi e le caratteristiche chimico-fisiche di questi composti, l'assunzione per via inalatoria è da considerarsi irrilevante. L'esposizione per via cutanea dovuta all'uso di detersivi e detergenti per uso personale non è quantificabile, poiché non sono disponibili studi adeguati. Va tuttavia ricordato che l'esposizione cutanea può essere importante per i contaminanti dei corpi idrici, considerando sia le acque di balneazione che gli usi domestici [64];

b) dati di letteratura scientifica indicano una maggiore contaminazione dei corpi idrici interni rispetto alle acque di estuario e marine;

c) gli unici dati di contaminazione di alimenti disponibili per l'Italia si riferiscono ad uno studio effettuato da ricercatori dell'Istituto Superiore di Sanità su quattro specie di molluschi provenienti dall'Adriatico e mostrano livelli di contaminazione da NF compresi tra 100 e 700 $\mu\text{g}/\text{kg}$ di peso fresco di parte edibile [32].

Uno scenario di rischio può essere derivato da tali dati e da quelli sul consumo di pesce per la popolazione italiana, prodotti dall'Istituto Nazionale della Nutrizione (1995). Sulla base delle assunzioni:

- che l'intera aliquota di prodotti ittici consumata sia costituita da soli molluschi;

- che tale aliquota sia a livelli di contaminazione pari al valore più alto riscontrato nei molluschi esaminati (700 $\mu\text{g}/\text{kg}$);

- che la popolazione considerata sia costituita da forti consumatori (95° percentile) per i quali il consumo di prodotti ittici è stato stimato essere di circa 120 g/persona/giorno (mentre tale consumo si attesta per la popolazione generale su circa 40 g/persona/giorno); ne deriva un'assunzione giornaliera di circa 80 μg , pari a circa 1,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ di peso corporeo.

Infine, sulla base dei dati disponibili, si può stimare che il contributo di assunzione con l'acqua potabile è nettamente inferiore e probabilmente rappresenta meno del 10% dell'assunzione con la dieta.

Conclusioni

Le informazioni disponibili sugli AF mostrano numerose lacune riguardo sia i dati di esposizione che quelli tossicologici, che rendono difficile un'adeguata valutazione del rischio. Tali lacune riguardano, in particolare:

- la mappatura degli impianti che utilizzano alchilfenoli polietossilati, in modo da poter individuare le aree maggiormente a rischio di contaminazione e determinare i livelli dell'esposizione umana (acqua potabile, organismi acquatici);

- il contributo dell'esposizione umana dovuto a fonti diverse da quella ambientale (prodotti alimentari a contatto con plastiche, prodotti per l'igiene personale, ecc.);

- la caratterizzazione dei meccanismi di azione e della relazione dose-risposta riguardo alla tossicità dello sviluppo degli AF, come parametro critico per la valutazione del rischio tossicologico.

In conclusione il rischio per la salute derivante dall'assunzione di AF non è, al momento, definibile in maniera adeguata; tuttavia le evidenze scientifiche indicano che i possibili effetti sanitari e/o ambientali non sono trascurabili. È quindi ragionevole adottare un approccio cautelativo che, in attesa di informazioni più dettagliate, ne consenta già a breve termine il controllo ed il contenimento dell'utilizzo e della immissione nell'ambiente.

Ringraziamenti

Il presente lavoro è stato effettuato nell'ambito del Progetto di Ricerca Finalizzata (art. 12 DL.vo 502/1992) "Esposizione umana a xenobiotici con potenziale attività endocrina: valutazione del rischio per la riproduzione e per l'età evolutiva".

Ricevuto il 25 luglio 2001.

Accettato il 5 novembre 2001.

BIBLIOGRAFIA

1. Neubert D. Vulnerability of the endocrine system to xenobiotic influence. *Regul Toxicol Pharmacol* 1997;26:9-29.
2. Colborn T, Clement C. *Chemically induced alterations in sexual and functional development: the wildlife/human connection*. Princeton, New Jersey: Princeton Scientific Publishing Company, Inc.; 1992. (Advances in Modern Environmental Toxicology, 21).
3. Harrison PTC, Holmes P, Humfrey CDN. Reproductive health in humans and wildlife: are adverse trends associated with environmental chemical exposure? *Sci Total Environ* 1997;205: 97-106.
4. Toppari J, Larsen JC, Christiansen P, Giwercman A, Grandjean P, Guillette LJJ, Jørgen B, Jensen TK, Jonannet P, Keiding N, Leffers H, McLachlan JA, Meyer O, Muller J, Rajert-Demeyts E, Scheike T, Sharpe R, Sumpter J, Skakkeback NE. Male reproductive health and environmental estrogens. *Environ Health Perspect* 1996; 104(suppl.4):741-803.

5. Daston GP, Gooch JW, Breslin WJ, Shuey DL, Nikiforov AY, Fico TA, Gorsuch JW. Environmental estrogens and reproductive health: a discussion of the human and environmental data. *Reprod Toxicol* 1997;11:465-81.
6. Sharpe RM, Skakkeback NE. Are estrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet* 1993;1:1392-5.
7. Gerhard I, Monga B, Krahe J, Runnebaum B. Chlorinated hydrocarbons in infertile women. *Environ Res* 1999;80:299-310.
8. Colon I, Caro D, Bourdony CJ, Rosario O. Identification of phthalate esters in the serum of young Puerto Rican girls with premature breast development. *Environ Health Perspect* 2000;108:895-900.
9. Mantovani A, Stazi AV, Macrì C, Maranghi F, Ricciardi C. Problems in testing and risk assessment of endocrine disrupting chemicals with regard to developmental toxicology. *Chemosphere* 1999;39(8):1293-300.
10. Tyl RW, Myers CB, Marr MC, Brine DR, Fail PA, Seely JC, Van Miller JP. Two-generation reproduction study with *para*-tert-octylphenol in rats. *Regul Toxicol Pharmacol* 1999;30(2 Pt 1):81-95.
11. Naylor CG. Environmental fate and safety of nonylphenol ethoxylates. *Tex Chem Color* 1995;27:29-33.
12. CEFIC. *Survey of nonylphenol and nonylphenol ethoxylate production, use, life cycle emission and occupational exposure*. CEFIC *ad hoc* nonylphenol risk assessment task force, CESIO APE Task Force; 1996.
13. Stephanou E, Giger W. Persistent organic chemicals in sewage effluents. 2. Quantitative determinations of nonylphenols and nonylphenol ethoxylates by capillary gas chromatography. *Environ Sci Technol* 1982;16:800-5.
14. Giger W, Brunner PH, Schaffner C. 4-nonylphenol in sewage sludge: accumulation of toxic metabolites from non-ionic surfactants. *Science* 1984;225:623-6.
15. Inoue K, Kondo S, Yoshie Y, Kato K, Yoshimura Y, Horie M, Nakazawa H. Migration of 4-nonylphenol from polyvinyl chloride food packaging films into food simulants and foods. *Food Add Cont* 2001;18(2):157-64.
16. Ahel M, Giger W. Partitioning of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates between water and organic solvents. *Chemosphere* 1993;26:1471-8.
17. Brunner PH, Capri S, Marcomini A, Giger W. Occurrence and behavior of linear alkylbenzenesulphonates, nonylphenol, nonylphenol mono- and nonylphenol diethoxylates in sewage and sewage sludge treatment. *Water Res* 1988;22:1465.
18. Nimrod AC, Benson WH. Environmental estrogenic effects of alkylphenol ethoxylates. *Crit Rev Toxicol* 1996;26(3):335-64.
19. Jobling S, Sumpter JP. Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: an *in vitro* study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquat Toxicol* 1993;27:361-72.
20. Purdom CE, Hardiman PA, Bye VJ, Eno NC, Tyler CR, Sumpter JP. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chem Ecol* 1994;8:275-85.
21. Jobling S, Sheahan D, Osborne JA, Matthiessen P, Sumpter JP. Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environ Toxicol Chem* 1996;15(2):194-202.
22. Soto AM, Justicia H, Wray JW, Sonnenschein C. *p*-Nonylphenol: an estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene. *Environ Health Perspect* 1991;92:167-73.
23. Vos J, Dbing E, Greim HA, Ladefoge O, Lambré C, Tarazona JV, Brandt I, Vethaak D. Health effects of the endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to European situation. *Crit Rev Toxicol* 2000;30(1):71-133.
24. Zellner A, Kalbfus W. *Belastung bayerischer Gewässer durch nonylphenole*. München-Wien: Institut für Wasserforschung; 1997. (Stoffe mit endokriner Wirkung in Wasser).
25. Davi ML, Gnudi F. Phenolic compounds in surface water. *Water Res* 1999;33(14):3213-9.
26. Schaffner C, Ahel M, Giger W. Field studies on the behavior of organic micropollutants during infiltration of river water to groundwater. *Water Sci Tech* 1987;19:1195-6.
27. Marcomini A, Pavoni B, Sfriso A, Orio AA. Persistent metabolites of alkylphenol polyethoxylates in the marine environment. *Mar Chem* 1990;29:307-23.
28. Kvestak R, Ahel M. Occurrence of toxic metabolites from nonionic surfactants in the Krka river estuary. *Ecotox Environ Safe* 1994;28:25-34.
29. Ekelund R, Bergman A, Granmo A, Berggren M. Bioaccumulation of 4-nonylphenol in marine animals - a re-evaluation. *Environ Pollut* 1990;64:107-20.
30. Lye CM, Frid CLJ, Gill ME, Cooper DW, Jones DM. Estrogenic alkylphenols in fish tissues, sediments, and waters from the UK Tyne and Tees estuaries. *Environ Sci Technol* 1999;33:1009-14.
31. Blackburn MA, Kirby SJ, Waldock MJ. Concentration of alkylphenol polyethoxylates entering UK estuaries. *Mar Pollut Bull* 1999;38(2):109-18.
32. Ferrara F, Fabietti F, Delise M, Piccioli Bocca A, Funari F. Alkylphenolic compounds in edible molluscs of the Adriatic Sea (Italy). *Environ Sci Technol* 2001;35(15):3109-12.
33. Kopf W. *Wirkung endokriner Stoffe in Biotests mit Wasserorganismen*. München-Wien: Institut für Wasserforschung; 1997. (Stoffe mit endokriner Wirkung in Wasser).
34. Brooke LT. *Acute and chronic toxicity of nonylphenol to ten species of aquatic organisms*. New York: EPA; 1993. (Contract no. 68-C1-0034: USEPA Draft Report).
35. Ankley G, Peterson G, Lukasewycz M, Jenner D. Characteristics of surfactants in toxicity identification evaluations. *Chemosphere* 1990;21:3-12.
36. Ward TJ, Boeri RL. *Chronic toxicity of nonylphenol to the mysid (Mysidopsis bahia)*; Glen Osmond, Australia: CMA; 1991. Report prepared for Chemical Manufacturers Association by Resource Analysts. (no. 8977-CMA).
37. Swedmark M, Braaten B, Emanuelsson E, Granmo A. Biological effects of surface active agents on marine mammals. *Mar Biol* 1971;9:183-201.
38. Holcombe GW, Phipps GL, Knuth ML, Felhaber T. The acute toxicity of selected substituted phenols, benzene and benzoic acid esters to fathead minnows *Pimephales promelas*. *Environ Pollut* 1984;35(A):367-81.

39. Gronen S. Serum vitellogenin levels and reproductive impairment of male Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 4-*tert*-octylphenol. *Environ Health Perspect* 1999;107(5):385-90.
40. Ward TJ, Boeri RL. Early life stage toxicity of nonylphenol to the fathead minnow (*Pimephales promelas*). Glen Osmond, Australia: CMA; 1991. Report prepared for Chemical Manufacturers Association by Resource Analysts.(Study no. 8979-CMA).
41. White R, Hoare SA, Sumpter JP, Parker MG. Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology* 1994;135(1):175-82.
42. Mueller GC, Kim U-H. Displacement of estradiol from estrogen receptors by simple alkyl phenols. *Endocrinology* 1978;102:1429-35.
43. Jobling S, Sheahan DA, Osborne JA, Matthiessen P, Sumpter JP. Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) exposed to environmental estrogens. *Environ Toxicol Chem* 1995;15:194-202.
44. Tyler CR, Jobling S, Sumpter JP. Endocrine disruption in wildlife: a critical review of the evidence. *Crit Rev Toxicol* 1998;28(4):319-61.
45. Cunny HC, Mayes BA, Rosica KA, Trutter JA, Van Miller JP. Subchronic toxicity (90-day) study with *para*-nonylphenol in rats. *Regul Toxicol Pharmacol* 1997;26(2):172-8.
46. Laws SC, Carey SA, Ferrell JM, Bodman GJ, Cooper RL. Estrogenic activity of octylphenol, nonylphenol, bisphenol A and methoxychlor in rats. *Toxicol Sci* 2000;54(1):154-67.
47. Blake CA, Boockfor FR. Chronic administration of the environmental pollutant 4-*tert*-octylphenol to adult male rats interferes with the secretion of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, prolactin, and testosterone. *Biol Reprod* 1997;57(2):255-66.
48. Jorgensen M, Vendelbo B, Skakkebaek NE, Leffers H. Assaying estrogenicity by quantitating the expression levels of endogenous estrogen-regulated genes. *Environ Health Perspect* 2000;108(5):403-12.
49. Herath CB, Watanabe G, Katsuda S, Yoshida M, Suzuki AK, Taya K. Exposure of neonatal female rats to *p*-*tert*-octylphenol disrupts afternoon surges of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and prolactin secretion, and interferes with sexual receptive behavior in adulthood. *Biol Reprod* 2001;64:1216-24.
50. Khurana S, Ranmal S, Ben-Jonathan N. Exposure of newborn male and female rats to environmental estrogens: delayed and sustained hyperprolactinemia and alterations in estrogen receptor expression. *Endocrinology* 2000;141:4512-7.
51. Yoshida M, Katsuda S, Takenaka A, Watanabe G, Taya K, Maekawa A. Effects of neonatal exposure to a high-dose *p*-*tert*-octylphenol on the male reproductive tract in rats. *Toxicol Lett* 2001;121:21-33.
52. Ferguson SA, Flynn KM, Delclos KB, Newbold RR. Maternal and offspring toxicity but few sexually dimorphic behavioral alterations result from nonylphenol exposure. *Neurotoxicol Teratol* 2000;22(4):583-91.
53. Ferguson SA, Scallet AC, Flynn KM, J.M. M, Schwetz, B.A. Developmental neurotoxicity of endocrine disruptors: focus on estrogens. *Neurotoxicology* 2000;21:947-56.
54. Pedersen RT, Hill EM. Identification of novel metabolites of the xenoestrogen 4-*tert*-octylphenol in primary rat hepatocytes. *Chem Biol Interact* 2000;128:189-209.
55. Katsuda S, Yoshida M, Isagawa S, Asagawa Y, Kuroda H, Watanabe T, Ando J, Takahashi M, Maekawa A. Dose- and treatment duration-related effects of *p*-*tert*-octylphenol on female rats. *Reprod Toxicol* 2000;14(2):119-26.
56. Kang KS, Kim HS, Ryu DY, Che JH, Lee YS. Immature uterotrophic assay is more sensitive than ovariectomized uterotrophic assay for the detection of estrogenicity of *p*-nonylphenol in Sprague-Dawley rats. *Toxicol Lett* 2000;118:109-15.
57. Harazono A, Ema M. Effects of 4-*tert*-octylphenol on initiation and maintenance of pregnancy following oral administration during early pregnancy in rats. *Toxicol Lett* 2001;119:79-84.
58. Nagao T, Wada K, Marumo H, Yoshimura S, Ono H. Reproductive effects of nonylphenol in rats after gavage administration: a two-generation study. *Reprod Toxicol* 2001;15:293-315.
59. Chapin RE, Delaney J, Wang Y, Lanning L, Davis B, Collins B, Mintz N, Wolfe G. The effects of 4-nonylphenol in rats: a multigeneration reproduction study. *Toxicol Sci* 1999;52(1):80-91.
60. Sharpe RM, Fisher JS, Millar MM, Jobling S, Sumpter JP. Gestational and lactational exposure of rats to xenoestrogens results in reduced testicular size and sperm production. *Environ Health Perspect* 1995;103(12):1136-43.
61. Sharpe RM, Turner KJ, Sumpter JP. Endocrine disruptors and testis development. *Environ Health Perspect* 1998;106:A220-A1.
62. Katsuda S, Yoshida M, Isagawa S, Asagawa Y, Kuroda H, Watanabe T, Ando J, Takahashi M, Maekawa A. Dose- and treatment duration-related effects of *p*-*tert*-octylphenol on female rats. *Reprod Toxicol* 2000;14(2):119-26.
63. Woo D, Lee GY, Anderson E, Aziz N. Immature ovaries and polycystic kidneys in the congenital polycystic kidney mouse may be due to abnormal sex steroid metabolism. *Mol Cell Endocrinol* 2001;176:155-62.
64. Levesque B, Ayotte P, LeBlanc A, Dewailly E, Prud'Homme D, Lavoie R, Allaire S, Levallois P. Evaluation of dermal and respiratory chloroform exposure in humans. *Environ Health Perspect* 1994;102:1082-7.
65. Ahel M. Infiltration of organic pollutants in groundwater: field study of intravaginally administered nonoxynol-9 containing contraceptive cream in rats. *Bull Environ Contam Toxicol* 1991;47:586-93.
66. Blackburn MA, Waldock MJ. Concentration of alkylphenols in rivers and estuaries in England and Wales. *Water Res* 1995;29(7):1623-9.
67. Ahel M, Giger W. Determination of alkylphenols and alkylphenol mono- and diethoxylates in environmental samples by high-performance liquid chromatography. *Anal Chem* 1985;57(8):1577-83.
68. Ahel M, Giger W, Schaffner C. Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment - II. Occurrence and transformation in rivers. *Water Res* 1994;28(5):1143-52.

69. Ahel M, Schaffner C, Giger W. Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment - III. Occurrence and elimination of their persistent metabolites during infiltration of river water to groundwater. *Water Res* 1996;30(1): 37-46.
70. Wahlberg C, Renberg L, Wideqvist U. Determination of nonylphenol and nonylphenolic ethoxylates as their penta-fluorobenzoates in water, sewage sludge and biota. *Chemosphere* 1990;20(1-2):179-95.
71. Weinberger P, Rea M. Nonylphenol: a perturbant additive to an aquatic ecosystem. Proceeding of the 7th aquatic toxicity workshop. Montreal, November, 5-7 1981. *Can J Fish Aquat Sci* 1981;990:371-80.
72. Dorn PB, Salanitro JP, Evans SH, Kravetz L. Assessing the aquatic hazard of some branched and linear nonionic surfactants by bio-degradation and toxicity. *Environ Toxicol Chem* 1993; 12:1751-62.
73. Comber MHL, Williams TD, Stewart KM. The effects of nonylphenol on *Daphnia magna*. *Water Res* 1993;27(2):273-6.
74. Ward TJ, Boeri RL. *Acute flow through toxicity of nonylphenol to the mysid (Mysidopsis bahia)*. Glen Osmond, Australia: CMA; 1990. Report prepared for the Chemical Manufacturer Association by Resource Analysts. (Study no. 8974-CMA).
75. Granmo A, Ekelund R, Magnusson K, Berggren M. Lethal and sublethal toxicity of 4-nonylphenol to the common mussel (*Mytilus edulis* L.). *Environ Pollut* 1989;59:115-27.
76. Brooke LT. *Accumulation and lethality for two freshwater fishes (fathead minnow and bluegill) to nonylphenol*: New York: EPA; 1993. (EPA Contract no. 68-C1-0034: USEPA Draft Report).
77. Ward TJ, Boeri RL. *Acute flow-through toxicity of nonylphenol to the shephead minnow (Cyprinodon variegatus)*. Glen Osmond, Australia: CMA; 1990. Report prepared for the Chemical Manufacturers Association by Resource Analysts. (Study no. 8975-CMA).