

Alteraciones lipídicas producidas por dietas suplementadas con el contaminante alimentario Di (2-Etil Hexil) Ftalato *

Mocchiutti, Norberto O.; Martinelli, Marcela I.; Bernal, Claudio A.

Departamento de Ciencias Biológicas. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas – U.N.L. C.C.530 - (3000) Santa Fe.-
Tel. (042) 571140 – Fax. (042) 571153. e-mail: nmocchi@lbc.unl.edu.ar

RESUMEN: Se compararon los efectos del Di (2-Etil Hexil) Ftalato (DEHF) sobre el perfil lipídico de ratas Wistar alimentadas con baja dosis (0.5% DEHF) durante un período prolongado de tiempo (90 días) (Grupo: DEHF 0.5%-90d) con los observados a alta dosis (2% DEHF) durante un período corto (21 días) (Grupo: DEHF 2%-21d). Animales alimentados con DEHF 2%-21d mostraron una reducción en ganancia de peso, no siendo la misma observada a dosis inferiores (DEHF 0.5%-90d). El incremento en el peso de los hígados fue semejante en los grupos DEHF 0.5%-90d y DEHF 2%-21d, sin embargo, el aumento relativo de dicho peso fue más pronunciado a la dosis alta. En ambos grupos DEHF se observó hipolipemia, alcanzando descensos significativos en los niveles plasmáticos de triglicéridos (35-50%) y colesterol (30%), y observándose sólo una tendencia al decrecimiento en las concentraciones plasmáticas de fosfolípidos (15%). Estos resultados sugieren que a pesar de no presentar retardo en el crecimiento, los animales que recibieron la dosis de 0.5% DEHF durante 90 días, manifiestan un grado semejante de hepatomegalia e hipolipemia al de las ratas alimentadas con altas dosis (2%) durante un tiempo corto, lo que promueve la continuación de estudios cuyos niveles se aproximen a los de exposición humana durante toda la vida.

SUMMARY: The effects of Di (2-Ethyl Hexyl) Phthalate (DEHP) on lipid profiles of rats fed low doses (0.5%) for a long time (90 days) were assessed and compared with those obtained for rats fed high doses (2%) for a short time (21 days). The latter showed a significant decrease in body weight gain, whereas the former did not show any alteration. Increases in liver weight were similar in both DEHP groups, yet increases of relative liver weight were more pronounced at the highest doses. Hypolipidemia was observed in both DEHP groups but, whereas significant decreases in plasma triglyceride (35-50%) and cholesterol (30%) levels were noted, plasma phospholipid concentrations showed only a tendency to decrease (15%). These results suggest that, although no reduction in body weight gain was shown, those animals fed low doses of DEHP (0.5%) for a long time (90 days) showed degrees of hepatomegaly and hypolipidemia similar to those shown by rats fed high doses (2%) for a short time (21 days), this fact promoting further studies modelled on lifespan human exposure.

Introducción

El derivado de la familia de los ésteres del ácido ftálico, Di (2-Etil Hexil) Ftalato (DEHF), es comúnmente adicionado como plastificante a los polímeros del tipo PVC con la finalidad de conferir al producto final mayor ductilidad y flexibilidad.

Numerosos estudios (1-5) han focalizado la atención sobre las repercusiones tóxicas del DEHF debidas a su capacidad contaminante. La apreciable migración de este agente de polimerización, fundamentalmente por lixiviación desde el envase plástico hacia su entorno (6-8), determina para el mismo una distribución ubicua y por ende, una considerable exposición potencial para el ser humano (9-11).

En animales de experimentación alimentados con diferentes ésteres del ácido ftálico a altas dosis, se han descrito un extenso número de acciones tóxicas (12,13), sin embargo, el DEHF y sus metabolitos tienen el mayor efecto deletéreo. Pero estos hallazgos no alcanzaron suficiente relevancia sobre los posibles riesgos para la salud humana, hasta que se demostró que el DEHF es carcinogénico en ratas y ratones (14,15). Entre otras modificaciones bioquímicas producidas por este contaminante, se han informado alteraciones en el metabolismo lipídico, caracterizadas por una marcada hipolipemia (16-18) asociada a una proliferación de los peroxisomas hepáticos (19,20) y a alteraciones en las actividades enzimáticas peroxisomales (21-23).

El descenso en los niveles de los lípidos plasmáticos de animales alimentados con DEHF, mostró su máxima expresión sobre la concentración de triglicéridos (16,20) efecto que ha sido relacionado originalmente con una inducción en la proliferación de los peroxisomas hepáticos. Recientemente hemos demostrado (24) que animales alimentados

* Los resultados del presente trabajo han sido presentados al "X Seminario Latinoamericano y del Caribe de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Simposio Internacional de Aditivos e Ingredientes Alimentarios". Organizado por la Asociación Argentina de Tecnólogos Alimentarios. Buenos Aires, Setiembre 1997.

durante 21 días con una dieta estándar, suplementada con 2% de DEHF, incrementan las actividades lipolíticas de los tejidos extrahepáticos, lo que nos permitió hipotetizar que el aumento en la remoción plasmática de las lipoproteínas ricas en triglicéridos podría ser otro mecanismo involucrado en la hipolipemia descrita.

La mayoría de las evaluaciones relacionadas sobre los efectos deletéreos del DEHF en animales de experimentación (3,16,25,26) emplearon dietas suplementadas con altas concentraciones (1-2% p/p) y distintos periodos de tiempo, sin embargo, los niveles de exposición habitual del ser humano a este compuesto son marcadamente inferiores. Si bien, en los pacientes que requieren hemodiálisis se ha demostrado (7) un elevado grado de incorporación de DEHF (3.1 mg/Kg/día) proveniente del equipamiento empleado, cuantitativamente la mayor vía de incorporación al organismo es a través de los alimentos contenidos en envases plásticos.

En nuestro país, a nuestro conocimiento, no se dispone de datos referidos a la exposición humana diaria al DEHF, pero en países desarrollados el consumo diario ha sido estimado entre 2.1 - 5.8 mg/día (27,28). Si bien estos niveles pueden ser considerados significativamente inferiores a las dosis empleadas en los estudios realizados en animales de experimentación, no se puede desconocer el riesgo potencial que para el ser humano implica la incorporación del DEHF durante toda la vida.

En vista de estas apreciaciones, el presente estudio fue realizado con el objetivo de comparar los efectos del DEHF sobre el perfil lipídico de animales de experimentación alimentados a baja dosis (0.5%) y largo tiempo (90 días), con los de los alimentados a alta dosis (2%) durante un tiempo corto (21 días).

Materiales y Métodos

Se emplearon ratas macho de la cepa Wistar, que fueron aclimatadas desde su arribo en un ambiente con ciclos luz-oscuridad de 12 horas (07.00-19.00) y con temperatura controlada ($23 \pm 2^\circ\text{C}$). Los animales tuvieron libre acceso a una dieta estándar de laboratorio (Nutrimentos S.A. - Bs.As.), compuesta en peso por: 62% carbohidratos, 4% grasas, 23% proteínas, 6% celulosa, 1% sales y vitaminas, la misma proporciona aproximadamente 365 Cal/100 g dieta.

Cuando los animales alcanzaron un peso promedio aproximado de 120 g, fueron divididos al azar

en 4 grupos, dos de los cuales (DC-21d y DC-90d) consumieron la dieta estándar de laboratorio durante periodos de 21 y 90 días; a los otros dos grupos (DEHF 2%-21d y DEHF 0.5%-90d) se les proporcionó durante 21 y 90 días la misma dieta suplementada cada una con dosis experimentales de 2.0 y 0.5 g de Di (2-Etil Hexil) Ftalato (DEHF) por cada 100 g de comida, respectivamente. El peso de los animales y la ingesta de comida fue registrado tres veces por semana durante el período experimental, determinándose la ingesta calórica y la ganancia de peso corporal.

Al finalizar los respectivos periodos experimentales, los animales fueron anestesiados i.p. con Tiopental sódico (60 mg/kg peso corporal) entre las 9.00 y 11.00 h. Se colectaron muestras de sangre de la vena cava inferior, las que fueron centrifugadas a 4°C y los sueros obtenidos, se procesaron inmediatamente o congelaron a -20°C hasta el momento de su valoración. Se congelaron porciones de diferentes lóbulos del hígado y el corazón entero (libre de grasa pericárdica) que fueron posteriormente trituradas y conservadas en nitrógeno líquido hasta su procesamiento. Se registró el peso de los riñones libres de grasa periférica y del tejido adiposo epididimal.

Las determinaciones de las concentraciones plasmáticas de triglicéridos (29), colesterol (30) y fosfolípidos (31) se efectuaron por métodos espectrofotométricos empleando Trioleína, colesterol y $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ como sustancias patrones. En homogeneizados de hígado y de corazón (10% en solución fisiológica) se cuantificaron las concentraciones de triglicéridos y de colesterol, empleando los mismos métodos citados para el plasma. Mayores detalles de las condiciones técnicas fueron descriptas en publicaciones anteriores (32,33).

Reactivos: El Di (2-Etil Hexil) Ftalato (97% puro por HPLC) fue adquirido de Reidel der Häen (Frankfurt - Alemania). Las sustancias utilizadas como patrones fueron adquiridas en Sigma Chemical Co (St Louis, MO - USA). Todos los demás reactivos fueron de grado ACS.

Análisis Estadístico: Los resultados son expresados como $X \pm \text{SEM}$. Se utilizó el Análisis de Variancia (ANOVA 2×2) (34) para comparar los efectos del tratamiento dietario y dosis-tiempo. Cuando el Análisis de Variancia mostró significancia en al menos $p < 0.05$, se utilizó posteriormente el test de Scheffé (34) para comparar estadísticamente los efectos individuales entre grupos, en cuyo caso valores de $p < 0.05$ fueron considerados significativamente diferentes.

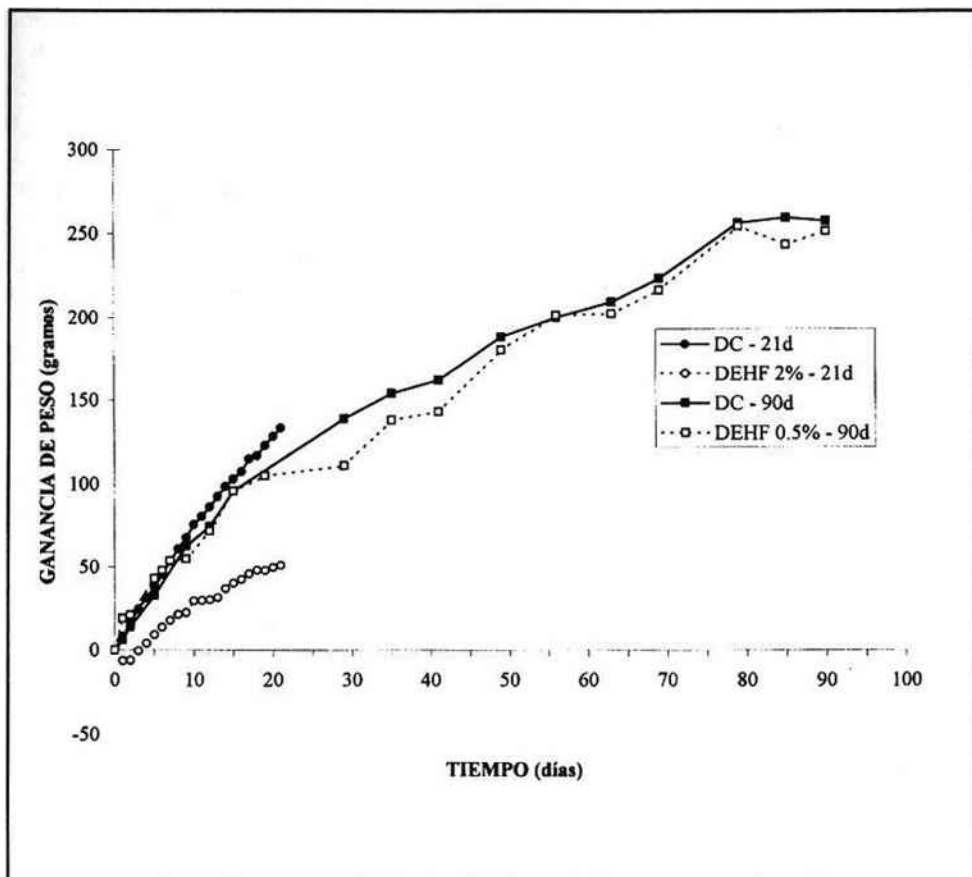
Resultados y Discusión

Cuando el Di (2-Etil Hexil) Ftalato (DEHF) es administrado oralmente a animales de experimentación, causa profundos cambios bioquímicos y morfológicos que son influenciados por la dosis (18), el tiempo (2, 18), el contenido de grasa de la dieta (35), la edad de los animales (19), etc.

En el presente estudio comparamos los efectos del contaminante alimentario DEHF sobre el perfil lipídico en animales de experimentación administrado a baja dosis (0.5%) por un período de tiempo prolongado (90 días), con aquellos ya conocidos a dosis elevada (2%) por un tiempo corto (21 días).

La Figura 1 muestra la ganancia de peso en función del tiempo de los distintos grupos de animales que, durante 21 ó 90 días, se alimentaron con la dieta estándar sola (DC) ó suplementada con 2.0 y 0.5 g de DEHF/ 100 g de comida, respectivamente. En la dosis de 2% de DEHF, durante los primeros días los animales mostraron reducción de la ingesta dietaria, resultando una pérdida inicial de peso. Luego de una adaptación de 3 días, la ingesta calórica de dicho grupo no mostró diferencia con la de su respectivo control. Considerando la evolución de peso desde el día 4 hasta el final de la experiencia, los animales que recibieron la dieta DEHF 2.0% por 21 días manifestaron una ganancia de peso significativamente menor, que no se presentó cuando la dosis fue de 0.5% por 90 días.

Figura 1. Ganancia de peso en animales alimentados con 2.0% y 0.5% de DEHF.



Los efectos a corto tiempo de la administración de DEHF a elevadas concentraciones, fueron inicialmente investigados por Lake y col. (36) describiendo entre otros, una reducción de la ganancia de peso. Los resultados del presente estudio, confirman los descriptos previamente por nosotros (24) y extienden los publicados por diferentes autores (13,16). No obstante, la ganancia de peso de nuestros animales correspondientes al empleo de baja dosis y largo tiempo, no fueron concordantes con el descenso de peso informado en estudios efectuados hasta 9 meses por Mitchell y col. (18).

Otra característica de los efectos deletéreos del DEHF a elevada dosis, es la presencia de hepatomegalia acompañada con proliferación de peroxisomas. Así, Tomaszewski y col. (37) mostraron que la hepatomegalia era dependiente de la dosis hasta 2 g/Kg peso/día, siendo equivalente a una dieta que contiene 2 g DEHF/ 100 g de comida. En nuestras experiencias, los animales alimentados con DEHF 2%-21d y DEHF 0.5%-90d, mostraron un significativo incremento en los pesos de los hígados ($n > 4$ en cada grupo, g; DEHF 2%-21d: 17.35 ± 0.79 vs. 10.56 ± 0.34 en DC-21d, $p < 0.001$; DEHF 0.5%-90d: 18.46 ± 0.50 vs. 11.95 ± 0.67 en DC-90d, $p < 0.001$) y cuando dichos pesos fueron referidos a los correspondientes pesos de los animales, mostraron diferencias estadísticas aún mayores, manteniendo una relación directa con la dosis y no con el tiempo de exposición (g/100g; DEHF 2%-21d: 8.77 ± 0.34 vs. 4.58 ± 0.34 en DC-21d, $p < 0.001$; DEHF 0.5%-90d: 5.24 ± 0.11 vs. 3.23 ± 0.07 en DC-90d, $p < 0.001$).

Pudimos observar también que sólo los riño-

nes de los animales alimentados con 2% de DEHF evidenciaron un significativo incremento en sus pesos relativos ($n > 4$ en cada grupo, g; DEHF 2%-21d: 1.02 ± 0.02 vs. 0.83 ± 0.05 en DC-21d, $p < 0.01$). Mientras que, para ambas dosis de DEHF, los pesos de los corazones y epididimos no mostraron cambios significativos respecto a sus controles dietarios, independientemente de la forma de expresión ($n > 4$ en cada grupo, g de corazones; DEHF 2%-21d: 0.87 ± 0.08 vs. 0.85 ± 0.05 en DC-21d; DEHF 0.5%-90d: 1.15 ± 0.08 vs. 1.14 ± 0.05 en DC-90d; g de epididimos; DEHF 2%-21d: 0.78 ± 0.04 vs. 0.68 ± 0.11 en DC-21d; DEHF 0.5%-90d: 1.14 ± 0.27 vs. 0.98 ± 0.08 en DC-90d).

La Tabla 1 muestra el efecto del DEHF a dosis de 2% durante 21 días y 0.5% durante 90 días sobre los niveles plasmáticos de triglicéridos, colesterol y fosfolípidos en animales de experimentación. Podemos observar que con ambas dosis de DEHF encontramos un significativo descenso de la concentración de triglicéridos plasmáticos. El análisis estadístico de variancia (2×2 ANOVA) muestra un marcado efecto de la dieta con un nivel de significancia < 0.0001 . Las concentraciones plasmáticas de colesterol disminuyeron en proporción semejante (aproximadamente 30%) por la suplementación con DEHF a dosis de 2% - 21 días y 0.5% - 90 días. Dichos descensos fueron exclusivamente dependientes de la dieta (nivel de significancia: Dieta < 0.0001 y Dosis = 0.713). Los niveles de fosfolípidos circulantes mostraron una tendencia análoga a descender (15%) en los grupos DEHF 2%-21d y DEHF 0.5%-90d respecto a sus controles dietarios,

Tabla 1. Niveles de lípidos plasmáticos en animales alimentados con 2.0% y 0.5% DEHF.

	DC-21d	DEHF 2%-21d	DC-90d	DEHF 0.5%-90d
Triglicéridos (mg /100 ml)	37.71 ± 2.91^a (7)	24.37 ± 2.05^b (8)	50.67 ± 2.97^c (6)	25.00 ± 2.59^b (5)
Colesterol (mg /100 ml)	64.75 ± 2.09^a (6)	45.14 ± 1.83^b (7)	63.00 ± 3.94^a (7)	44.64 ± 3.03^b (7)
Fosfolípidos (mg /100 ml)	107.14 ± 10.85^a (5)	90.92 ± 5.74^a (6)	110.55 ± 14.31^a (4)	93.52 ± 5.16^a (5)

Los valores son expresados en media \pm SEM.

Los números en paréntesis indican el número de ratas empleadas en cada determinación.

Letras diferentes en superíndices indican significancia estadística entre grupos evaluadas a través del test de Scheffé ($p < 0.05$).

Tabla 2. Niveles de lípidos tisulares en animales alimentados con 2.0 % y 0.5 % DEHF

	DC 2%-21d	DEHF 2%-21d	DC 0.5%-90d	DEHF 0.5%-90d
Hígado				
Triglicéridos (μ moles/g tej. húm.)	7.41 \pm 0.44 ^a (7)	6.66 \pm 0.60 ^a (7)	7.03 \pm 0.82 ^a (3)	7.14 \pm 0.44 ^a (5)
Colesterol (μ moles/g tej. húm.)	8.92 \pm 0.66 ^a (6)	8.78 \pm 0.24 ^a (6)	9.53 \pm 0.12 ^a (3)	9.92 \pm 0.17 ^a (5)
Corazón				
Triglicéridos (μ moles/g tej. húm.)	5.47 \pm 0.15 ^a (7)	5.33 \pm 0.44 ^a (6)	5.29 \pm 0.37 ^a (7)	5.46 \pm 0.18 ^a (5)
Colesterol (μ moles/g tej. húm.)	7.13 \pm 0.44 ^a (7)	7.67 \pm 0.35 ^a (6)	7.16 \pm 0.26 ^a (7)	7.11 \pm 0.48 ^a (6)

Los valores son expresados en media \pm SEM.

Los números en paréntesis indican el número de ratas empleadas en cada determinación.

Letras diferentes en superíndices indican significancia estadística entre grupos evaluadas a través del test de Scheffé ($p < 0.05$).

no obstante, dicha reducción no logró alcanzar significancia estadística.

Si bien Dostal y col. (19) encontraron un efecto hipolipémico en animales adultos y no en ratas lactantes, pareciera ser que la edad podría jugar un rol importante en la respuesta lipídica del DEHF. Nuestros resultados demuestran claramente una respuesta hipolipémica equivalente en los animales alimentados con 0.5% de DEHF durante 90 días con los correspondientes conocidos alimentados con 2% de DEHF durante 21 días.

Todas estas modificaciones de los niveles de los componentes lipídicos del plasma se produjeron con ambas dosis de DEHF, sin alterar los niveles de triglicéridos y de colesterol en hígado y en corazón (Tabla 2). En este sentido, si bien no se conoce información acerca del efecto del DEHF a dosis bajas sobre la remoción y secreción de triglicéridos, recientemente demostramos (24) que en animales alimentados con 2% de DEHF durante 21 días, la hipolipemia estuvo asociada a un contenido normal de triglicéridos en hígado, y que la misma fue consecuencia de una incrementada actividad de la enzima Lipoproteína Lipasa (responsable de la hidrólisis de los triglicéridos circulantes) y a una normal capacidad de secreción al plasma de las lipoproteínas ricas en triglicéridos (VLDL).

Considerando que los animales alimentados con DEHF 0.5% durante 90 días presentan un perfil

lipídico semejante a aquellos alimentados con 2% DEHF durante 21 días, podemos inferir que una incrementada remoción y una normal secreción de triglicéridos podría estar presente también en esta baja dosis del contaminante alimentario.

Si bien estos resultados no se correlacionan con la inhibición de la síntesis hepática de lípidos reportada por Bell y col. (38,39), las diferencias podrían ser debidas a la edad de los animales empleados en este estudio, dado que los mismos autores, encontraron resultados disímiles cuando los animales fueron expuestos al contaminante DEHF desde la vida intrauterina (38), que cuando la ingesta se inicia en ratas jóvenes (39).

Conclusiones

Así como los animales de experimentación alimentados con una dieta conteniendo 2g DEHF/100g de comida durante 21 días, experimentan una marcada hipolipemia asociada con hepatomegalia, los resultados del presente estudio empleando una dosis menor (0.5g DEHF/100g comida) por un tiempo más prolongado (90 días) muestran también, un perfil lipídico modificado con hepatomegalia manifiesta. Lo que nos permite concluir que en estos animales podría también estar presente los mismos mecanismos descritos por nosotros pre-

viamente (incrementada remoción y normal secreción de lipoproteínas ricas en triglicéridos) en dosis elevada (2%).

Un mejor conocimiento a nivel experimental de los efectos tóxicos que ejercería el DEHF, permitirá evaluar el riesgo potencial para la salud humana que su incorporación determina al ser vehiculizado por los alimentos.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Sr. Daniel Amato por la asistencia técnica prestada.

Este trabajo fue financiado por la UNL – Cursos de Acción para la Investigación y Desarrollo – (Programación CAI+D).

Bibliografía

- 1- Reardon K. y Zhang G., 1992. Environmental influences on Diethyl Phthalate biodegradation kinetics. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **34/35**: 753-765.
- 2- Melnick R., Morrissey R. y Tomaszewski K., 1987. Studies by the National Toxicology Program on Di (2-Ethylhexyl) Phthalate. *Toxicol. Ind. Health* **3**, 1: 99-118.
- 3- Rubin R., y Jaeger R., 1973. Some pharmacologic and toxicologic effects of Di-2-Ethylhexyl Phthalate (DEHP) and other plasticizers. *Environ. Health Perspect.* 53-59.
- 4- Thomas J., Darby T., Wallin R., Garvin P y Martis L., 1978. A review of biological effects of Di-(2-Ethylhexyl) Phthalate. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **45**, 1-27.
- 5- Daniel J., 1978. Toxicity and metabolism of Phthalate esters. *Clin. Toxicol.* **13**, 2: 257-268.
- 6- Pollack G., Buchanan J., Slaughter R., Kohli R. y Shen D., 1985. Circulating concentrations of Di (2-Ethylhexyl) Phthalate and its de-esterified Phthalic Acid products following plasticizer exposure in patients receiving hemodialysis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **79**, 257-267.
- 7- Jaeger R. y Rubin R., 1973. Extraction, localization, and metabolism of Di-2-Ethylhexyl Phthalate from PVC plastic medical devices. *Environ. Health Perspect.* 95-102.
- 8- Pearson, S. y Trissel L., 1993. Leaching of diethylhexyl phthalate from polyvinyl chloride containers by selected drugs and formulation components. *Am. J. Hosp. Pharmacol.* **50**: 1405-1409.
- 9- Sharman M., Read W., Castle L. y Gilbert J., 1994. Levels of Di-(ethylhexyl) Phthalate and Phthalate Esters in milk, cream, butter and cheese. *Food Addit. Contam.* **11**, 3: 375-385.
- 10- Meek M. y Chan P., 1994. Bis(2-ethylhexyl)phthalate: Evaluation of risks to health from environmental exposure in Canada. *Environ. Carcino. and Ecotox. Revs. C* **12**, 2: 179-194.
- 11- Canadian Environmental Protection Act - Priority Substances List Assessment Report, 1994. "Bis(2-Ethylhexyl) Phthalate". Minister of Supply and Services. Catalogue N° En40-215/37E. Government of Canada.
- 12- Barber E., Astill B., Moran E., Schneider B., Gray T., Lake B. y Evans J., 1987. Peroxisome induction studies on seven Phthalate Esters. *Toxicol. Ind. Health* **3**, 2: 7-22.
- 13- Mann A., Price S., Mitchell F., Grasso P., Hinton R. y Bridges J., 1985. Comparison of the short-term effects of Di (2-Ethylhexyl) Phthalate, Di (n-Hexyl) Phthalate, and Di (n-Octyl) Phthalate in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **77**: 116-132.
- 14- Kluwe W., Haseman J., Fielding D., Douglas J. y Huff J., 1982. The carcinogenicity of dietary Di(2-Ethylhexyl) Phthalate (DEHP) in Fisher 344 rats and B6C3F1 mice. *J. Toxicol. Environ. Health* **10**: 797-815.
- 15- Kluwe W., Haseman J. y Huff J., 1983. The carcinogenicity of Di(2-Ethylhexyl) Phthalate (DEHP) in perspective. *J. Toxicol. Environ. Health* **12**: 159-169.
- 16- Yanagita T., Satoh M., Nomura H., Enomoto N. y Sugano M., 1987. Alteration of hepatic phospholipids in rats and mice by feeding Di-(2-Ethylhexyl) Adipate and Di-(2-Ethylhexyl) Phthalate. *Lipids* **22**, 8: 572-577.
- 17- Mitchell A., Lhuguenot J., Bridges J. y Elcombe C., 1985. Identification of the proximate peroxisome proliferator(s) derived from Di (2-Ethylhexyl) Phthalate. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **80**: 23-32.
- 18- Mitchell F., Price S., Hinton R., Grasso P. y Bridges J., 1985. Time and dose-response study of the effects on rats of the plasticizer Di (2-Ethylhexyl) Phthalate. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **81**: 371-392.
- 19- Dostal L., Jenkins W. y Schwetz B., 1987. Hepatic peroxisome proliferation and hypolipidemic effects of Di (2-Ethylhexyl) Phthalate in neonatal and adult rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **87**: 81-90.
- 20- Mitchell F., Bridges J. y Hinton R., 1986. Effects of Mono (2-Ethylhexyl) Phthalate and its straight chain analogues Mono-n-Hexyl Phthalate and Mono-n-Octyl Phthalate on lipid metabolism in isolated hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* **35**, 17: 2941-2947
- 21- Reubsæet F., Veerkamp J., Bruckwilder M., Trijbels J. y Monnens L., 1991. Peroxisomal oxidases and catalase in liver and kidney homogenates of normal and Di(Ethylhexyl) Phthalate-fed rats. *Internat. J. Biochem.* **23**: 961-967.
- 22- Reubsæet F., Veerkamp J., Dirven H., Bruckwilder M., Hashimoto T., Trijbels J. y Monnens L., 1990. The effect of Di(Ethylhexyl) Phthalate on fatty acid oxidation and carnitine palmitoyl transferase in various rat tissues. *Biochim. et Biophys. Acta* **1047**: 264-270.
- 23- Okita R. y Okita J., 1992. Effects of Diethyl Phthalate and other plasticizers on laurate hydroxylation in rat liver microsomes. *Pharm. Res.* **9**, 12: 1648-1653.
- 24- Mocchiuti N. y Bernal C., 1997. Effects of chronic Di(2-Ethylhexyl) Phthalate intake on the secretion and removal rate of

triglyceride-rich lipoproteins in rats. *Food Chem. Toxicol.* **35**: 1017-1021.

25- Reddy J., Moody D., Azarnoff D. y Rao M., 1976. Di-(2-Ethylhexyl) Phthalate: an industrial plasticizer induces hypolipidemia and enhances hepatic catalase and carnitine acetyltransferase activities in rats and mice. *Life Sciences* **18**: 941-946.

26- Nair N. y Kurup C., 1986. Investigations on the mechanism of the hypocholesterolemic action of Diethylhexyl Phthalate in rats. *Biochem. Pharmacol.* **35**, **20**: 3441-3447.

27- Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, 1987. Survey of plasticizer levels in food contact materials and in foods. Food Surveillance paper N° 21 (London: HMSO).

28- US Department of Health and Human Services, 1985. Fourth Annual Report on Carcinogens; NTP Publication N° 85-002 (Washington, DC: US GPO).

29- Laurell S., 1966. A method for routine determinations of plasma triglycerides. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **18**: 668-672.

30- Leffler H., 1959. Estimation of cholesterol in serum. *Am. J. Clin. Pathol.* **31**: 310-313.

31- Duck-Chong C., 1979. A rapid sensitive method for determining phospholipid phosphorous involving digestion with magnesium nitrate. *Lipids* **14**: 492-497.

32- Bernal C., Basílico M., Gutman R. y Lombardo Y., 1989. Secretion and removal rates of very low density lipoprotein triglycerides at the three metabolic periods of hypertriglyceridemia induced by a sucrose rich diet. *Nutr. Rep. Intern.* **40**, **1**: 71-83.

33- Mocchiutti N., Bernal C. y Lombardo Y., 1992. Ingesta crónica de aceites vegetales bromados: su acción sobre la secreción hepática y catabolismo de lipoproteínas plasmáticas. *Arch. Latin. Nutr.* **42**, **4**: 403-408.

34- DeGroot M., 1975. "Probability and Statistics" Addison-Wesley, Reading, MA USA. 429.

35- Stein M., Caasi P. y Nair P., 1974. Influence of dietary fat and Di-2-Ethylhexyl Phthalate on tissue lipids in rats. *J. Nutr.* **104**: 187-191.

36- Lake B., Gangolli S., Grasso P. y Lloyd A., 1975. Studies on the hepatic effects of orally Di-(2-Ethylhexyl) Phthalate in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **32**: 355-367.

37- Tomaszewski K., Derks M. y Melnick R., 1987. Acyl CoA oxidase is the most suitable marker for hepatic peroxisomal changes caused by treatment of F344 rats with Di(2-Ethylhexyl) Phthalate. *Toxicol. Let.* **37**: 203-212.

38- Bell F., Makowske M., Schneider D. y Patt C., 1979. Inhibition of sterologenesis in brain and liver of fetal and suckling rats from dams fed di-2-ethylhexyl phthalate plasticizer. *Lipids* **14**, **4**: 372-377.

39- Bell F., Patt C., Brundage B., Gillies P. y Phillips W., 1978. Studies on lipid biosynthesis and cholesterol content of liver and serum lipoproteins in rats fed various phthalate esters. *Lipids* **13**: 66-74.