

Revisión exhaustiva de los posibles efectos sobre la salud y el medio ambiente del tetrametilbisfenol F (TMBPF; 4,4'-metilenebis (2,6-dimetilfenol; CAS# 5384-21-4).

Resumen ejecutivo.

En los últimos años, el TMBPF se identificó como un posible sustituto del bisfenol A (BPA) en la fabricación de recubrimientos epoxi utilizados para revestir latas de alimentos y bebidas. En 2017, los estudios iniciales de toxicidad del TMBPF se centraron en identificar si esta sustancia tenía una actividad estrogénica similar a la del BPA. La falta de bioactividad estrogénica observada en estos ensayos llevó a la promoción del TMBPF como sustituto "verde" del BPA. Sin embargo, los efectos estrogénicos son solo uno de los criterios de valoración peligrosos de preocupación para la disrupción endocrina, y la alteración endocrina es sólo un criterio de valoración peligroso de un perfil de toxicidad completo. Estudios más recientes realizados sobre el TMBPF demuestran un perfil de toxicidad diferente al del BPA, aunque es un perfil que contiene peligros. En el caso de la salud humana, el peso de la evidencia demuestra respuestas relacionadas con el sistema endocrino basadas en los resultados de estudios computacionales, *in vitro* e *in vivo*. Estos estudios mostraron actividad antiandrogénica y efectos sobre la esteroidogénesis con alteración de ambas hormonas, estradiol y testosterona. Los resultados de un *estudio puberal* *in vivo* mostraron cambios en los niveles circulantes de hormonas tiroideas y cambios histopatológicos en la tiroides. Además, un estudio dietético de 90 días de duración en ratas informó de un aumento de la incidencia y la gravedad de la proliferación epitelial en el timo y los quistes ováricos foliculares en ratas hembra. Un estudio realizado en 2021 mostró un deterioro dependiente de la dosis en el desarrollo, el crecimiento y la supervivencia de embriones de pollo expuestos a TMBPF en concentraciones bajas y relevantes para el medio ambiente. Estos hallazgos incluyeron efectos morfológicos severos en el ojo y las estructuras craneofaciales. Los autores de este estudio concluyeron que el TMBPF podría ser más teratogénico, potente y tóxico que el BPA. Otros estudios recientes *in vitro* revisados por pares indican que el TMBPF tiene una mayor respuesta a la citotoxicidad que el BPA, altera el desarrollo de las células grasas, acorta la vida útil de un organismo y aumenta los cambios relacionados con la edad en las neuronas, así como el potencial para alterar la homeostasis ósea y aumentar la resorción ósea. Existen lagunas en los datos sobre el TMBPF para muchos otros criterios de valoración de toxicidad, como la toxicidad para la reproducción, la toxicidad para el desarrollo y la carcinogenicidad. En cuanto a los peligros ambientales, también se observó la posibilidad de que el TMBPF produjera alteraciones endocrinas. En un estudio de metamorfosis de anfibios de 21 días, se observaron cambios histopatológicos en la tiroides y una reducción de la etapa de desarrollo en ranas. Un estudio en embriones/larvas de peces expuestos a TMBPF mostró efectos en el desarrollo que se atribuyeron al hipertiroidismo observado, la disminución de la hormona del crecimiento y la transcripción anormal de genes asociados con los sistemas endocrinos relacionados con la tiroides y la hormona del crecimiento. También se observaron cambios en los parámetros reproductivos indicativos de efectos antiandrogénicos y efectos agonistas de estrógenos en un estudio de reproducción de peces. Otro punto final de preocupación ambiental es la persistencia, ya que los resultados de los estudios de destino ambiental y la modelización muestran que el TMBPF es altamente estable, no sufre hidrólisis, no es fácilmente biodegradable en medio acuoso y tiene una larga vida media en el suelo y el sedimento con un fuerte potencial de unión a ambos. La forma de éter diglicidílico de TMBPF (es decir, TMBPF-DGE) tampoco era fácilmente biodegradable en medio acuoso. La persistencia de TMBPF (y potencialmente TMBPF-DGE) junto con los indicios de alteración endocrina en peces y ranas sugieren una gran preocupación por el medio ambiente. Los solicitantes de registro en el expediente de la ECHA clasificaron el TMBPF como muy tóxico para el medio acuático tanto para exposiciones agudas como crónicas. En una publicación reciente revisada por pares de 2020, se detectó que TMBPF y TMBPF-DGE migran de los recubrimientos de TMBPF

que recubren las latas de alimentos, lo que proporciona una ruta plausible de exposición a los seres humanos y al medio ambiente. Los estudios también han demostrado que numerosas NIAS (sustancias añadidas no intencionalmente) de identidad y cantidad desconocidas migran de los recubrimientos epoxi TMBPF. Además, el expediente REACH de la Unión Europea (UE) enumera la banda de tonelaje más alta (\geq de 1.000 toneladas a \leq 10.000 toneladas) para la fabricación e importación de TMBPF, lo que sugiere un uso generalizado de esta sustancia en la UE. Varios organismos reguladores de la UE completaron las revisiones del TMBPF afirmando que se justifican estudios adicionales para descartar los posibles efectos humanos y ambientales observados a partir del conjunto de pruebas existente. En 2017, la Agencia Nacional de Salud, Alimentación, Medio Ambiente y Seguridad Ocupacional (ANSES) de Francia revisó la literatura científica disponible sobre el TMBPF y determinó que no se puede descartar la capacidad de alteración endocrina para los seres humanos y el medio ambiente. La ANSES declaró además que "se necesitan datos experimentales [para el TMBPF] para aclarar las preocupaciones sobre la persistencia, la bioacumulación y la toxicidad para los organismos ambientales". En 2020, el Instituto Nacional de Salud Pública y Medio Ambiente (RIVM) de los Países Bajos también indicó que "se necesitan más estudios para evaluar el potencial de toxicidad reproductiva y del desarrollo de TMBPF". La ECHA está evaluando el TMBPF en busca de alteraciones endocrinas y ha solicitado a los solicitantes de registro que lleven a cabo estudios de nivel superior para comprender mejor los peligros. En conclusión, los datos disponibles públicamente generados hasta el momento identifican peligros derivados de la exposición al TMBPF que sugieren problemas de salud humana, así como grandes preocupaciones ambientales que incluyen el potencial de persistencia y alteración endocrina en peces y ranas.

Perfil toxicológico.

RESPUESTA ANTIANDROGÉNICA: El primer estudio reportado sobre TMBPF incluyó resultados de los siguientes ensayos: Ensayo de transactivación del receptor de estrógeno (RE), Ensayo uterotrófico y Ensayo puberal masculino/femenino (Soto et al., 2017). En este estudio también se informaron los resultados de un E-screen en migrantes a partir de una resina epoxi TMBPF. Estos ensayos de detección de disruptores endocrinos se diseñaron principalmente para evaluar la actividad estrogénica. El ensayo puberal también incluyó la evaluación de varios criterios de valoración androgénicos y tiroideos. Si bien los resultados de estos ensayos indicaron una falta de actividad estrogénica, hubo hallazgos relacionados con los tejidos dependientes de andrógenos. Se observó una tendencia decreciente dependiente de la dosis en el peso de la próstata dorso-lateral, la próstata ventral y las vesículas seminales (con glándula coagulante) en ratas macho expuestas a TMBPF. Estos resultados se localizaron en los datos complementarios del artículo publicado (Soto et al., 2017) y en el informe de un estudio de laboratorio (Valspar Study Report a, Unpublished)¹ pero no se mencionaron en el cuerpo de la publicación, probablemente debido a la falta de significación estadística. **Sin embargo, la tendencia dependiente de la dosis de disminución del peso de estos tejidos sensibles androgénicos sugiere una respuesta endocrina.**

Utilizando múltiples modelos basados en células, Szafran et al. (2017) evaluaron TMBPF y otros compuestos (por ejemplo, TMBPF diglicil éter; TMBPF-DGE) que forman parte del proceso de fabricación de la resina epoxi TMBPF. En estos modelos basados en células se incluyó una plataforma basada en microscopía de alto rendimiento que permitió determinar la actividad de estrógenos y andrógenos (tanto agonismo como antagonismo). Los hallazgos de este estudio no indican actividad agonista estrogénica o androgénica. **Sin embargo, TMBPF demostró actividad antiestrogénica y antiandrogénica. Los autores del estudio describieron la actividad antiandrogénica de TMBPF como "fuerte" porque el nivel de respuesta de TMBPF fue similar al de los controles positivos antiandrogénicos (es decir, MDV3100 y CDX) utilizados en el estudio (véase la figura siguiente; círculo morado).**

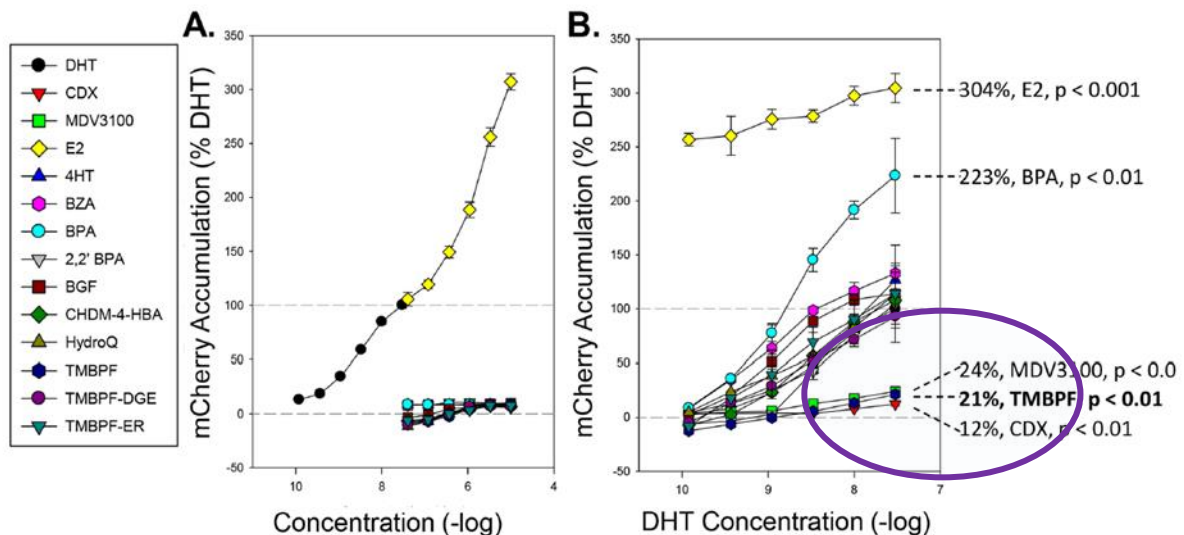


Fig 5. Chemical compound effect on an integrated ARE-containing probasin-mCherry-NLS reporter in the AR responsive LNCaP cell line. The nuclear accumulation of mCherry fluorescent protein in 2PB-mCherry-NLS:LNCaP cells treated with indicated compounds either alone at concentrations from 50 pM to 5 μ M (A) or at 5 μ M with DHT at ranging from 0.1 nM to 30 nM (B) for 48 hours. Compounds that induced either a significant androgen-like or anti-androgen-like response in the presence of DHT are indicated. All data represent mean of 3 experiments \pm standard deviation.

(Figura reproducida de Szafran et al., 2017; Se ha añadido un círculo morado para resaltar la respuesta antiandrogénica de TMBPF).

[¹TMBPF Estudio sobre el desarrollo puberal y la función tiroidea en ratas](#)

En 2020, Maffini y Canatsey informaron los resultados de un *ensayo de inhibición de la aromatasa in vitro*, un *ensayo de esteroidogénesis in vitro* y estudios *in vivo de agonismo/antagonismo androgénico*. Los resultados de un estudio de toxicidad dietética de 90 días también se informaron en este artículo. No se observaron efectos en el estudio de *inhibición de la aromatasa in vitro*. **Sin embargo, el estudio de esteroidogénesis in vitro demostró aumentos estadísticamente significativos de estradiol y testosterona en el nivel más alto de concentración no citotóxica. El ensayo in vivo de Hershberger en TMBPF demostró actividad antiandrogénica al nivel de dosis de exposición más alto debido a disminuciones estadísticamente significativas en el peso de dos tejidos reproductivos masculinos (es decir, vesículas seminales y el músculo elevador ani-bulbocavernoso [LABC]).**

En resumen, los hallazgos de estos tres estudios (Soto et al., 2017; Szafran et al., 2017; Maffini y Canatsey, 2020) demuestran un patrón de actividad antiandrogénica como se muestra en la Tabla 1 a continuación:

Tabla 1. Respuesta observada de TMBPF en el sistema androgénico.

Tipo de evaluación	Estudiar	Actividad o efecto observado	Especie y sexo o línea celular	Niveles de dosis de los efectos	Referencia
Computacional	Modelado QSAR (Leadscope y SciQSAR)	Predicción de la actividad antiandrogénica	No aplicable	No aplicable	Base de datos QSAR danesa, 2021
<i>In vitro</i>	Reportero Probasin-mCherry-NLS integrado y cribado basado en microscopía de alto rendimiento	Respuesta antiandrogénica: 79% ↓ en la respuesta inducida por DHT (Respuesta conocida de los antiandrógenos CDX y DV3100 ↓ en un 88 y 76%, respectivamente)	Línea celular de cáncer de próstata LNCaP sensible a los andrógenos	5 μM	Szafran et al., 2017
<i>In vitro</i>	Ensayo de esteroidogénesis	Testosterona inducida	Línea celular de carcinoma de corteza suprarrenal humana H295R	1 μM**, 3 μM** y 10 μM**	Maffini y Canatsey, 2020
<i>In vivo</i>	Ensayo puberal	↓ en peso de: <ul style="list-style-type: none"> • vesículas seminales (con glándula coagulante)* • Próstata (ventral)* • postrado (dorso-lateral)* 	Ratas macho	200 mg/kg-pc/día y 600 mg/kg-pc/día	Soto et al., 2017 (Información complementaria); (Informe del estudio Valspar a)
<i>In vivo</i>	Ensayo de Hershberger	↓ en peso de: <ul style="list-style-type: none"> • vesículas seminales • Músculo LABC* 	Ratas macho	100 mg/kg-pc/día, 300 mg/kg-pc/día, y 1000 mg/kg-pc/día**	Maffini y Canatsey, 2020

*Respuesta dependiente de la dosis.

** Cambio estadísticamente significativo con respecto a los controles experimentales .

DISRUPCIÓN TIROIDEA: Exponent (2017), una firma de consultoría científica, realizó una revisión de los informes de laboratorio que sirvieron de base para la publicación de Soto et al. (2017). Al revisar el ensayo puberal masculino y femenino, Exponent observó una reducción estadísticamente significativa en los niveles circulantes de tiroxina (T4) para ratas macho y hembra a 200 mg/kg/día y 600 mg/kg/día. Además, se observaron aumentos estadísticamente significativos en los niveles de hormona estimulante de la tiroides (TSH) en mujeres (600 mg/kg/día), aumentos estadísticamente significativos en el peso de los órganos tiroideos tanto en hombres como en mujeres (600 mg/kg/día) y aumentos en la altura de las células foliculares tiroideas (un indicador de una mayor actividad de la glándula tiroides) tanto en hombres como en mujeres (200 mg/kg/día y 600 mg/kg/día). También se observó un aumento estadísticamente significativo del peso del hígado y los riñones en las mujeres con 600 mg/kg/día y en los hombres con 200 mg/kg/día y 600 mg/kg/día en comparación con los controles. Los hallazgos tiroideos del ensayo puberal no se discutieron en el artículo de Soto et al. (2017) ni se incluyeron en los datos complementarios del artículo. Sin embargo, estos hallazgos se anotaron en el informe original del estudio de laboratorio (Informe del estudio Valspar a, no publicado).²

Exponent teorizó que los hallazgos tiroideos observados en el estudio puberal pueden ser el resultado de la inducción de enzimas hepáticas. El aumento del peso hepático y la hipertrofia de los hepatocitos observados en un estudio dietético de 90 días sobre TMPBF (Maffini y Canatsey, 2020) pueden apoyar esta hipótesis, pero no excluyen la interacción de TMBPF con la vía endocrina de la hormona tiroidea.

También se observaron efectos tiroideos en ranas expuestas a TMBPF en un ensayo de metamorfosis de anfibios. El propósito del ensayo de cribado de 21 días fue identificar si la exposición a una sustancia produce interferencia con el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (HPT). Los hallazgos histopatológicos en la tiroides del ensayo de metamorfosis de anfibios (Informe del estudio Valspar b, no publicado)³ son similares a los resultados en ratas del estudio puberal (arriba). Estos hallazgos tiroideos incluyeron un aumento en la incidencia y la gravedad de la hiperplasia de células foliculares, un aumento en la gravedad de la hipertrofia de células foliculares y un aumento en la incidencia de hipertrofia tiroidea. Se proporciona información adicional sobre este estudio en la *sección Disrupción* de la tiroides del *Perfil ambiental. Las múltiples respuestas tiroideas observadas con la exposición a TMBPF sugieren un efecto endocrino.*

TERATOGENICIDAD: Los efectos del TMBPF, así como del BPA y otros análogos del BPA, se evaluaron en un estudio de cribado de embriotoxicidad en pollos realizado por Harnett et al. (2021b). La exposición a TMBPF produjo efectos significativos dependientes de la dosis en el desarrollo, crecimiento y supervivencia del embrión. Los defectos de desarrollo más notables incluyeron malformaciones oculares y craneofaciales extremas. El crecimiento también se redujo drásticamente en los embriones expuestos al TMBPF, con un promedio de la mitad del tamaño y el peso de los embriones de control. Es importante destacar que los efectos en el desarrollo observados en este estudio ocurrieron en concentraciones bajas y relevantes para el medio ambiente (niveles de nM o ppb). ***Basándose en los resultados del estudio, los autores concluyeron que el TMBPF era mucho más teratogénico, potente y tóxico que el BPA y el segundo más tóxico de todos los análogos del BPA evaluados.***

RESPUESTA DE QUISTES OVÁRICOS Y TIMO: Como se mencionó anteriormente, los resultados de un estudio de toxicidad dietética de 90 días se informaron en un artículo científico de Maffini y Canatsey (2020) y en el informe del estudio original (Informe de estudio de Valspar c, no publicado).⁴ Los hallazgos microscópicos relacionados con la exposición a TMPBF incluyeron un aumento de la incidencia y gravedad de quistes ováricos y proliferación epitelial del timo en ratas hembras en

²[Estudio del desarrollo puberal en ratas de TMBPF](#)

³[Ensayo de metamorfosis de rana TMBPF](#)

⁴ [Informe del Estudio de Noventa Días en Ratitas de TMBPF](#)

el grupo de dosis más alta. También se observó en este estudio un aumento del peso de los riñones y una mayor incidencia de dilatación tubular y/o hipertrofia en ratas macho y hembra al nivel de dosis más alto. Se observó un carcinoma de células renales en una rata macho de dosis alta. El peso hepático aumentó en hombres y mujeres (≥ 100 mg/kg-pc/d) junto con una mayor incidencia de hipertrofia hepatocelular. ***Este estudio in vivo reveló un aumento dependiente de la dosis en la incidencia y gravedad de los quistes ováricos, así como la proliferación epitelial del timo en ratas hembras.***

GENOTOXICIDAD: En 2020, ANSES revisó los resultados de una prueba de Ames, una prueba de micronúcleos y un ensayo de cometas en TMBPF que fueron patrocinados por un fabricante de TMBPF. Su conclusión para la prueba de Ames fue que TMBPF no era mutagénico *in vitro*. La prueba de micronúcleos *in vitro* mostró aumentos estadísticamente significativos relacionados con la dosis en los micronúcleos de los linfocitos humanos en ausencia y presencia de activación metabólica. La ANSES concluyó que el TMBPF era clastogénico/anueugenésico *in vitro*. El ensayo *in vivo* del cometa mostró resultados equívocos para uno de los órganos diana (estómago glandular) y tuvo una serie de desviaciones en el protocolo (es decir, no hay datos históricos de control para el yeyuno; superposición de datos históricos de control negativos y positivos para otros órganos diana). Sin embargo, la ANSES concluyó que el ensayo del cometa sugería una probable ausencia de *genotoxicidad in vivo*. En conclusión, se observaron resultados mixtos para los ensayos de genotoxicidad y el estado de genotoxicidad de TMBPF aún es incierto.

CITOTOXICIDAD Y DESARROLLO ALTERADO DE CÉLULAS GRASAS: En 2021, dos estudios publicados *in vitro* revisados por pares informaron que la exposición a TMBPF mató células madre humanas y animales (Harnett et al., 2021a) y el desarrollo alterado de las células grasas (Cohen et al., 2021). Los autores de estos dos artículos científicos indicaron que el TMBPF debe agruparse con otros análogos del BPA como sustitutos inapropiados del BPA debido a los mayores efectos citotóxicos del TMBPF que del BPA y a un efecto mecanicista único en el desarrollo de las células grasas. Proponen que el TMBPF sea estudiado más a fondo por laboratorios independientes (no financiados por los fabricantes del TMBPF), que se establezcan reglamentos, que se concientice más al público y que se desarrollen productos químicos sostenibles más seguros.

ENVEJECIMIENTO PREMATURO, EFECTOS REPRODUCTIVOS Y DE DESARROLLO: La exposición a TMBPF demuestra un acortamiento de la vida útil de un organismo y un aumento de los cambios relacionados con la edad en las neuronas (Hyun et al., 2021). Se evaluaron los efectos sobre el envejecimiento de TMBPF, BPA y otros análogos de BPA utilizando un *modelo in vivo de Caenorhabditis elegans*, un modelo animal (nematodo) comúnmente utilizado para evaluar los efectos de las exposiciones ambientales y las células de *fibroblastos (neuronales) de mamíferos cultivadas in vitro*. El estudio *in vivo* indicó que el TMBPF retrasó el desarrollo e impactó en la reproducción de los nematodos, lo que también se observó con la exposición al BPA. El estudio *in vitro* de células neuronales demostró que TMBPF indujo la muerte celular más potente a bajas concentraciones y fue el único bisfenol probado que causó un aumento significativo en las especies reactivas de oxígeno (ROS) mitocondriales y la apertura de poros de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP), marcadores de envejecimiento. Los autores concluyen que los análogos del bisfenol causaron diversos grados de cambios en el desarrollo, el envejecimiento, la integridad neuronal, la viabilidad celular y la homeostasis mitocondrial. El BPA causó el mayor número de efectos tóxicos en comparación con el TMBPF, que anteriormente se consideraba una alternativa relativamente menos estudiada y más segura. Sin embargo, TMBPF causó retraso en el desarrollo, reducción de la reproducción, apoptosis significativa (muerte celular), disfunción mitocondrial y envejecimiento. Los resultados sugieren que la exposición a casi todos los compuestos seleccionados del grupo de los bisfenoles puede conducir a riesgos para la salud y el envejecimiento.

IMPACTO ADVERSO EN LA SALUD ESQUELÉTICA: Un reciente estudio *in vitro* sobre TMBPF (Kim et al., 2021) investigó los efectos sobre la homeostasis ósea mediante la evaluación de la diferenciación de osteoclastos utilizando una línea celular precursora de osteoclastos de ratón. El estrógeno juega un papel importante en la homeostasis ósea que es mantenida por los osteoblastos que son responsables de la formación ósea y los osteoclastos que son responsables de la resorción ósea. En este estudio, TMBPF mejoró drásticamente la diferenciación de osteoclastos y activó la expresión de genes diana relacionados con osteoclastos en comparación con el BPA, que mostró solo un efecto mínimo. Los autores afirman que sus hallazgos sugieren que TMBPF ejerce una actividad relacionada con el endocrino, lo que resulta en un impacto negativo en la remodelación ósea y la homeostasis esquelética.

AUSENCIA DE DATOS: *En el expediente de la ECHA no se notificó información sobre el TMBPF en cuanto a toxicidad para la reproducción, toxicidad para el desarrollo en mamíferos o carcinogenicidad.*

Perfil Ambiental.

DISRUPCIÓN TIROIDEA EN ANFIBIOS: Se realizó un ensayo de detección de metamorfosis de anfibios de 21 días con la rana de uñas africana en TMBPF (que se encuentra en el sitio web del fabricante, pero no en el expediente de la ECHA) (Informe del estudio Valspar b, no publicado).⁵ El propósito de este estudio es determinar si la sustancia interfiere con el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (HPT). Se encontró que la exposición a TMBPF aumentó significativamente el peso corporal en el punto de tiempo de 7 días para el grupo de 310 µg/L (es decir, la concentración de exposición más alta). Los hallazgos histopatológicos observados para la glándula tiroides fueron un aumento en la incidencia y gravedad de la hiperplasia de células foliculares, un aumento en la gravedad de la hipertrofia de células foliculares y un aumento en la incidencia de hipertrofia tiroidea. En el día 21, también se observó una reducción estadísticamente significativa (basada en varios parámetros) en la etapa de desarrollo de los renacuajos expuestos a la concentración de exposición más alta (310 µg/L). El informe del estudio declaró: "Por lo tanto, la histopatología tiroidea, junto con las respuestas apicales de los puntos finales, demuestra perturbaciones en el eje HPT como resultado de la exposición a TMBPF en ranas de uñas africanas". ***Se observaron efectos indicativos de alteración endocrina en anfibios expuestos a TMBPF durante 21 días.***

EFFECTOS SOBRE LOS SISTEMAS ENDOCRINOS RELACIONADOS CON LA TIROIDES Y LA HORMONA DEL CRECIMIENTO EN PECES: Kim y Ji (2022) investigaron los efectos de la exposición a TMBPF en el sistema endocrino de embriones y larvas de pez cebra. El pez cebra se utiliza ampliamente como organismo modelo para examinar los efectos reproductivos y del desarrollo (Selderslaghs et al., 2009; Sipes et al., 2011; Yang et al., 2009), así como la disrupción endocrina (Dang et al., 2021). En concreto, se evaluó el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (HPT) y el eje hormona de crecimiento/factores de crecimiento similares a la insulina (GH/IGF), ya que el desarrollo embrionario de los peces y el crecimiento larval-juvenil están controlados predominantemente por la regulación de estos ejes (Dang et al., 2018; Hou et al., 2017). También se evaluó la transcripción de genes implicados en la regulación positiva y negativa de estos ejes. El diseño de este estudio se basó en la Guía de Pruebas TG 212 de la OCDE (OCDE, 1998); TG 212 se considera una prueba de cribado para TG 210 (OCDE, 2013) que se incluye en el Marco Conceptual para la Prueba y Evaluación de Disruptores Endocrinos de la OCE (2018). La exposición a la concentración más alta de 500 µg/L de TMBPF dio lugar a una disminución de la incubabilidad, el peso corporal y una supervivencia larvaria muy baja, así como un aumento de los embriones coagulados y las malformaciones. La supervivencia larvaria y el peso corporal también disminuyeron a 50 µg/L. A concentraciones de exposición superiores a 5 µg/L, el nivel de la hormona tiroidea triyodotironina (T3) aumentó significativamente y el nivel de hormona del crecimiento (GH) disminuyó significativamente. Además, se observó la transcripción anormal de genes implicados en los ejes HPT y GH/IGFs a 50 µg/L. Estos cambios fueron similares a los observados con el BPA y otros bisfenoles que utilizan el mismo protocolo (Lee et al., 2019). Los autores concluyeron que los efectos observados en el desarrollo del pez cebra expuesto a TMBPF pueden atribuirse al aumento de T3, la disminución de la hormona del crecimiento y la transcripción anormal de los genes implicados en los ejes HPT y GH/IGF. Además, los autores indicaron que el BPA y otros bisfenoles produjeron resultados comparables, lo que puede deberse a la similitud de sus estructuras moleculares.

⁵[Ensayo de metamorfosis de rana TMBPF](#)

En embriones y larvas de peces se observaron efectos en el desarrollo, cambios en los niveles de hormonas tiroideas y de crecimiento, y la transcripción anormal de genes implicados en los ejes HTP y GH/IGF; estos efectos fueron similares a los observados con BPA.

RESPUESTA ESTROGÉNICA ANTIANDROGÉNICA Y AGONÍSTICA EN PECES: Un estudio de reproducción a corto plazo con pececillos de cabeza gorda (que no se encuentra en el expediente de la ECHA) mostró una disminución estadísticamente significativa de la fecundidad (número de huevos producidos por las hembras por día) y del éxito de la fertilización (el número de embriones frente al número de huevos) para pececillos hembra expuestos a 190 µg/L (la concentración de exposición más alta) (Informe del estudio Valspar d, Inédito).⁶ La fecundidad en los controles fue de 46 huevos/hembra/día frente a 22 huevos/hembra/día para el grupo de 190 µg/L. El éxito de la fertilización para los controles fue del 99,7% frente al 99,5% para el grupo de 190 µg/L. Se observó un aumento estadísticamente significativo de la vitelogenina en los varones tanto en el grupo de 32 µg/L como en el de 190 µg/L. Los cambios histopatológicos incluyeron un aumento de la incidencia de células intersticiales (Leydig) en los testículos en los hombres del grupo de 190 µg/L y un aumento de la incidencia de atresia de ovocitos en los ovarios para las mujeres del grupo de 190 µg/L. Se ha demostrado que los aumentos de las células de Leydig en los testículos son el resultado de sustancias que interrumpen la esteroidogénesis de los andrógenos produciendo una respuesta antiandrogénica (Dietrich y Krieger, 2009a; Jensen et al., 2004). El aumento de la concentración de vitelogenina en los peces machos es una respuesta bien reconocida a los agonistas de los receptores de estrógeno (Borgert et al., 2014). Se ha demostrado que la atresia de ovocitos en peces hembra es una respuesta relacionada con cambios hormonales (Dietrich y Krieger, 2009b), pero pueden ser posibles otros modos de acción. ***Los efectos observados en el estudio de reproducción de los peces sugieren respuestas antiandrogénicas y estrogénicas agonísticas, lo que indica que puede producirse una alteración endocrina en los organismos ambientales.***

TÓXICO PARA EL MEDIO ACUÁTICO: Los datos de toxicidad aguda facilitados en el expediente de la ECHA, derivados de la información modelizada, de la comparación de sustancias, eran indicativos de una elevada toxicidad para *Daphnia magna*. ECOSAR (versión 1.1 de EpiSuite) predijo un valor de CL₅₀ para TMBPF de 0,346 mg/l durante 48 horas. Sobre la base de este valor, se puede concluir que la sustancia se considera tóxica para el medio acuático con una clasificación de toxicidad acuática aguda 1 (es decir, muy tóxica para la vida acuática) según los criterios del reglamento CLP. Un estudio de toxicidad aguda no publicado en peces, dafnias y algas, realizado según las directrices de BPL y la OCDE, no indicó toxicidad para peces, *Daphnia magna* o algas a 3,77 mg/L. Sin embargo, este estudio se llevó a cabo con una exposición estática y sin determinación analítica de la concentración de exposición.

No hay estudios de toxicidad por exposición repetida en peces, *Daphnia magna* o algas. Utilizando modelos, se determinó que las especies más sensibles al TMBPF para exposiciones repetidas eran los peces. Los resultados de ECOSAR predijeron una concentración sin efectos observados (NOEC) de 0,036 mg/L para una exposición de 28 días. De acuerdo con los criterios del CLP y según lo propuesto por los solicitantes de registro, el TMBPF justifica una clasificación como toxicidad acuática crónica 1 (es decir, muy tóxica para la vida acuática con efectos duraderos).

Los resultados de la modelación predicen que la sustancia será peligrosa para los organismos acuáticos en bajas concentraciones, tanto para exposiciones agudas como crónicas. De acuerdo con los criterios CLP y según lo propuesto por los fabricantes de TMBPF (es decir, los solicitantes de registro en el expediente de la ECHA), esta sustancia justifica una clasificación como toxicidad acuática crónica 1 (es decir, muy tóxica para la vida acuática con efectos duraderos tanto para exposiciones agudas como repetidas).

⁶[Estudio de reproducción de peces TMBPF](#)

Los estudios (conformes a las BPL y a la OCDE) que utilizan exposiciones de flujo continuo y mediciones analíticas de las concentraciones de exposición pueden proporcionar claridad adicional sobre el potencial de toxicidad para las especies acuáticas.

PERSISTENCIA.

Hidrólisis: Según el Dossier de la ECHA (2021a), sobre la base de los resultados de los estudios y un enfoque de peso de la evidencia, se puede concluir que la sustancia es estable y no sufre hidrólisis en el medio ambiente.

Biodegradación en el agua: Sobre la base de los resultados de los modelos, se estimó que la vida media del TMBPF en el agua era de **37,5 días** y, por lo tanto, sobre la base de este valor, no se esperaría que fuera persistente en el agua (Dossier de la ECHA, 2021a). También se estimó que el 5,86 % del producto químico se dividirá en agua cuando se libere en el medio ambiente (US EPA, 2018). Sin embargo, un estudio de evolución del CO₂ (utilizando la directriz 301B de la OCDE) realizado sobre TMBPF y TMBPF-DGE no mostró producción neta de CO₂ durante el estudio (Informe de estudio de Valspar e, no publicado).⁷ Por lo tanto, se determinó que ambas sustancias no son fácilmente biodegradables en un medio acuoso aeróbico e indican el potencial de que TMBPF persista en el agua.

Biodegradación en el suelo: En lo que respecta al suelo, se estima que la vida media del TMBPF es de **75 días** y el 61,8 % del producto químico se dividirá en este compartimento. El Convenio de Estocolmo sobre COP exige una vida media superior a 6 meses (180 días) para que se considere persistente. Sin embargo, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA, por sus siglas en inglés) considera que las sustancias con vidas medias superiores a 2 meses (60 días) son motivo de preocupación y necesitan más investigación (Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos, 2012).

Biodegradación en sedimentos: Se estima que la vida media de TMBPF en sedimentos es de **337,5 días** para sedimentos. Sobre la base de este valor de vida media, se espera que el TMBPF sea persistente en los sedimentos. El coeficiente de adsorción del suelo (es decir, log K_{oc}) se estimó en 5,03 utilizando el programa EPI Suite KOCWIN (v. 2,0). Este valor indica que el producto problema tiene una fuerte adsorción tanto en el suelo como en los sedimentos.

La Herramienta de Coordinación Pública de la ECHA (2021b) indica que la agencia está llevando a cabo actualmente un Análisis de Opciones de Gestión Regulatoria (RMOA) sobre TMBPF con el fin de determinar posibles medidas regulatorias. El motivo de la evaluación se debe a la preocupación por la persistencia del TMBPF, así como por otros criterios de valoración de peligro y exposición (es decir, la alteración endocrina, la toxicidad reproductiva y el uso generalizado de la sustancia química). La autoridad francesa ANSES (2017) inició la evaluación del RMOA para la ECHA y declaró lo siguiente sobre la persistencia del TMBPF:

⁷[Estudio de biodegradación de TMBPF](#)

Modelisation half-lives for environmental compartments show controversy results especially for the sediment compartment. According to data from *PBT profiler*, TMBPF exhibits a half-life of 38 days in water and 340 days in sediments, but results from *Danish QSAR data base* show a half-life of 15 days in water and 135 days in sediments. Results in soil indicate a half-life of 75 days (*PBT profiler*) and 61.17 days (*QSAR toolbox*).

According to registration dossier TMBPF presents an estimate adsorption coefficient (log K_{oc}) of 5.03 (*KOCWIN Program v2.00*) but taking into account the log K_{ow} of 1.21 reported in their dossier, this parameter is estimated to 1.92. Considering the value of 5.03, it is expected a tendency of adsorption of TMBPF onto suspended solids and sediments. Clarifications of this parameter are needed in order to have a reliable interpretation.

Taking all these data into consideration suggest an alert regarding P/vP criteria of TMBPF especially in the sediment compartment and further information from standardized tests would be necessary for clarifications of aquatic biodegradation.

Si bien los datos del modelo indican que el TMBPF no persistirá en el agua (sobre la base de una vida media calculada), una evaluación del peso de la evidencia concluyó que el TMBPF es estable y no sufre hidrólisis en el agua. Además, un estudio de biodegradación conforme a la OCDE mostró que el TMBPF y el TMPBF-DGE no son fácilmente biodegradables en un medio acuoso. Toda esta información sugiere que el TMBPF puede ser persistente en ambientes acuosos. Los datos de modelación en el expediente de la ECHA también indican que el TMPBF absorberá fuertemente el suelo y el sedimento y probablemente persistirá en el sedimento debido a una vida media de 337,5 días. Se necesita más investigación para aclarar la persistencia en el suelo. La ECHA (a través de ANSES) está evaluando este criterio de valoración para la gestión de riesgos, ya que la persistencia se considera una preocupación para el TMBPF.

BIOACUMULACIÓN: El valor estimado del factor de bioconcentración (BCF) en el expediente de la ECHA sobre TMBPF se declaró en 1340 (US EPA, 2018) y el coeficiente de reparto de agua octanol (log K_{ow}) se estimó en 3,75. La estimación del log K_{ow} utilizando la base de datos QSAR danesa en 2021 fue de 5,24. Sin embargo, un estudio de la Guía de la EPA determinó que el log K_{ow} era de 4,18 (Informe del estudio de Valspar f, no publicado),⁸ que es ligeramente inferior a los criterios de selección de 4,5 para la preocupación por la bioacumulación de organismos acuáticos.

EVALUACIÓN DE PBT: *Para una evaluación persistente, bioacumulativa y tóxica (PBT), TMBPF cumple con los criterios de persistencia (P) en el sedimento con posibles preocupaciones de persistencia en el suelo y el agua. La sustancia también cumple los criterios de toxicidad (T) debido a la toxicidad acuática. El TMBPF no parece cumplir el criterio de bioacumulación (B) debido al valor estimado de BCF y al valor logarítmico de K_{ow} de 4,18. Si bien no parece cumplirse el criterio de bioacumulación, la persistencia (P) y la toxicidad acuática (T) del TMBPF son motivo de preocupación para esta sustancia de gran volumen.*

EXPOSICIÓN HUMANA AL TMBPF: En 2017, Soto et al. informaron que no se detectó TMBPF en migrantes extraídos de paneles metálicos recubiertos con resina epoxi TMBPF en el límite de detección (LOD) de 0,2 ppb (equivalente a 0,03 µg/dm²). El estudio no menciona la evaluación de ningún otro emigrante de TMBPF o posibles productos de degradación. En un estudio más reciente publicado en 2020, Zhang et al. evaluaron cuatro latas de metal diferentes y sus tapas revestidas con diferentes recubrimientos en contacto con alimentos que sustituyen al BPA, incluido un recubrimiento de TMBPF.

⁸ [Coeficiente de partición TMBPF](#)

Las pruebas de migración se llevaron a cabo utilizando simulantes alimentarios y las condiciones de uso correspondientes a las aplicaciones previstas y a las directrices reglamentarias de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos. Los extractos se analizaron mediante cromatografía de gases, espectrometría de masas (GC-MS) y GC-MS de alta resolución. Se identificaron migrantes de tipo bisfenol, incluidos el tetrametilbisfenol F (TMBPF), el tetrametilbisfenol F diglicidil éter (TMBPF-DGE), el bisfenol F (BPF), el bisfenol C (BPC) y otros monómeros u oligómeros relacionados. TMBPF y TMBPF-DGE se encontraron en niveles entre 0,78 µg/dm² y 5,10 µg/dm², lo que equivale aproximadamente a 5 ppb y 30 ppb, respectivamente. Los autores sugieren que los niveles de TMBPF y migrantes epoxi de TMBPF detectados pueden verse afectados por las diferencias en la aplicación del recubrimiento a las latas de metal (por ejemplo, espesor del recubrimiento, temperaturas de aplicación, tiempo de curado). Además, el recubrimiento epoxi TMBPF mostró significativamente más migrantes, así como niveles más altos de migrantes que lo observado con los recubrimientos de poliéster que se evaluaron.

Se realizaron estudios adicionales de migración en resinas epoxi TMBPF y fueron revisados por un grupo de trabajo de expertos de ANSES (2020). En el análisis de las muestras de migración se observaron dieciocho sustancias (oligómeros de TMBPF, DGE o sustancias de degradación). Se desconoce la identidad y la cantidad de estos NIAS y es necesario determinarlas. ANSES (2020) también afirmó que, en función de los posibles niveles de exposición de algunos de los migrantes, se necesita información toxicológica para garantizar la seguridad.

Se detectaron TMBPF, TMBPF-DGE y varias NIAS en muestras de migración de recubrimientos epoxi de TMBPF. Por lo tanto, se esperaría que el TMBPF y otros migrantes epoxi del TMBPF se encontraran en los productos alimenticios y, potencialmente, en el medio ambiente cuando se desecharan. Otro motivo de preocupación es el elevado volumen de la sustancia fabricada e importada en la UE. La sustancia está registrada en virtud de REACH en ≥ 1.000 a ≤ 10.000 toneladas, lo que indica la posibilidad de una amplia distribución y exposición. Desafortunadamente, no se identificaron programas de monitoreo biológico para esta sustancia en la literatura.

Preocupaciones regulatorias.

La ECHA (2021b) está llevando a cabo actualmente una evaluación exhaustiva de los estudios presentados en el expediente y está a la espera de estudios adicionales sobre TMBPF y TMBPF-DGE (tetrametilbisfenol F diglicidil éter; Cas N° 93705-66-9), un producto de reacción de TMBPF. La ECHA (2021b) ha incluido el TMBPF en su lista de evaluación de disruptores endocrinos (DE) y en 2022 se está llevando a cabo una evaluación de los DE.

Como parte de la Estrategia Nacional Francesa sobre Alteradores Endocrinos, la Autoridad Competente francesa solicitó que la Agencia Nacional de Salud, Alimentación y Medio Ambiente y Seguridad Ocupacional (ANSES) revisara el perfil toxicológico del TMBPF para determinar si debían iniciarse opciones de gestión reglamentaria para esta sustancia en el marco de REACH. La agencia concluyó que no se puede descartar el carácter potencial de alteración endocrina para los seres humanos y el medio ambiente para TMBPF (ANSES, 2017). Además, la ANSES afirmó: "Se necesitan datos experimentales para aclarar las preocupaciones sobre la persistencia, la bioacumulación y la toxicidad para los organismos ambientales".

Además, el Instituto Nacional de Salud Pública y Medio Ambiente (RIVM) de los Países Bajos realizó una revisión de los análogos del bisfenol A que incluía el TMBPF (Braver-Sewradj et al., 2020). Las autoridades neerlandesas también indicaron que "se necesitan más estudios [para el TMBPF] para evaluar el potencial de toxicidad para la reproducción y el desarrollo".

La ECHA (2021b) ha incluido el TMBPF en su lista de evaluación de disruptores endocrinos (DE) y se está llevando a cabo un estudio adicional para fundamentar esta evaluación. ANSES denunció específicamente la falta de información sobre la disrupción endocrina para el medio ambiente y señaló que el modelado computacional (Leadscope y SciQSAR en la base de datos danesa QSAR) de TMBPF predijo que esta sustancia tendría una respuesta antiandrogénica. El RIVM indicó que "se necesitan más estudios [para el TMBPF] para evaluar el potencial de toxicidad para la reproducción y el desarrollo".

Conclusiones generales.

Los resultados de las pruebas de toxicidad actualmente disponibles en TMBPF demuestran el potencial de alteración endocrina. Una evaluación del peso de la evidencia de los modelos predictivos de toxicología computacional, *los estudios in vitro e in vivo* muestran un patrón de actividad antiandrogénica en estudios con roedores. Otros hallazgos relacionados con el sistema endocrino asociados con la exposición a TMBPF fueron: Múltiples respuestas tiroideas (ensayo puberal *in vivo*) e inducción de estradiol y testosterona a la concentración no citotóxica más alta (*estudio de esteroideogénesis in vitro*). La exposición embrionaria temprana a TMBPF dio lugar a efectos significativos dependientes de la dosis en el desarrollo, el crecimiento y la supervivencia de los embriones de pollo. En este estudio también se observaron efectos teratogénicos que incluyeron malformaciones oculares y craneofaciales graves que ocurrieron a bajas concentraciones de exposición. Otros criterios de valoración toxicológicos preocupantes incluyeron una mayor incidencia y gravedad de quistes ováricos y proliferación epitelial del timo en ratas hembras en el estudio dietético de 90 días. Los estudios *in vitro* sobre TMBPF mostraron citotoxicidad mayor que BPA, alteración en el desarrollo de células grasas, efectos desfavorables sobre el envejecimiento prematuro y un efecto adverso sobre la salud ósea observado en *estudios in vitro y/o in vivo*. El potencial de alteración endocrina en el medio ambiente se observó en base a los cambios histopatológicos en la tiroides y la reducción de la etapa de desarrollo en ranas expuestas a TMBPF en un estudio de metamorfosis de anfibios de 21 días. La exposición a TMBPF en un estudio de embriones/larvas de peces produjo efectos en el desarrollo y cambios en los sistemas endocrinos relacionados con la tiroides y la hormona del crecimiento. Se observaron efectos antiandrogénicos y estrogénicos agonísticos en un estudio de reproducción de peces. Los datos de los modelos computacionales, los datos leídos y los estudios del expediente de la ECHA indican que la sustancia es tóxica para los organismos acuáticos tanto en exposiciones agudas como crónicas a niveles bajos. Otro criterio de valoración ambiental preocupante es la persistencia, ya que el TMBPF es estable, no sufre hidrólisis, no es fácilmente biodegradable y tiene una larga vida media. La persistencia de TMBPF junto con los indicios de alteración endocrina en peces y ranas sugieren una gran preocupación por el medio ambiente. Además, se identificó una vía de exposición humana y ambiental con la detección de TMBPF, TMBPF-DGE y NIAS que migran de los recubrimientos epoxi de TMBPF que recubren latas y tapas de alimentos. Las autoridades reguladoras francesas y holandesas han pedido más investigación para llenar los vacíos de datos con el fin de comprender mejor el potencial endocrino y el impacto ambiental. El TMBPF se encuentra actualmente en proceso de revisión regulatoria por alteración endocrina por parte de la ECHA. Se están llevando a cabo estudios toxicológicos de nivel superior que proporcionarán una comprensión adicional de los criterios de valoración preocupantes y el riesgo para la salud humana y el medio ambiente.

Referencias.

ANSES. (2017) Análisis de la opción de gestión de riesgos más adecuada (RMOA). Nombre de la sustancia: 4,4'-metilenebis (2,6-dimetilfenol (TMBPF). 9 de diciembre de 2017. http://www.consultations-publiques.developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/rmoa_tmbpf_public.pdf

ANSES. (2020) Dictamen de la ANSES sobre la inocuidad para la salud humana del TMBPF (utilizado como precursor) y el TMBPF-DGE (utilizado para fabricar una resina de tipo epoxi en contacto con productos alimenticios, en sustitución de BADGE) y, en su caso, de las impurezas, los productos de degradación y los oligómeros del TMBPF y el TMBPF-DGE. 29 de septiembre de 2020.

Borgert, C. J., Stuchal, L. D., Mihaich, E. M., Becker, R. A., Bentley, K. S., Brausch, J. M. (2014) Ponderación de relevancia de los criterios de valoración de detección endocrina de nivel 1 por orden de clasificación. *Defecto congénito Res B*, 101, 90-113.

Braver-Sewradj, S. P. den, van Spronsen, R., Hessel, E. V. S. (2020) Sustitución del bisfenol A: una revisión de la carcinogenicidad, la toxicidad reproductiva y el potencial de alteración endocrina de las sustancias alternativas. *Crit Rev Toxicol*. Feb; 50(2):128-147.

Cohen, I. C., Cohenour, E. R., Harnett, K. G., Schuh, S. M. (2021) BPA, BPAF y TMBPF alteran la adipogénesis y la acumulación de grasa en células madre mesenquimales humanas, con implicaciones para la obesidad. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 5363. <https://doi.org/10.3390/ijms22105363>

Dang, Y., Wang, F., Liu, C. (2018) Matriz de PCR en tiempo real para estudiar los efectos de los productos químicos en el eje de la hormona de crecimiento / factores de crecimiento similares a la insulina (GH / IGF) de embriones / larvas de pez cebra. *Quimiosfera*, 207, p. 365-376. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.05.102>

Dang, Z., Arena, M., Kienzler, A. (2021) Pruebas de toxicidad de peces para la identificación de sustancias químicas que alteran la tiroides. *Contaminación Ambiental*, 284, 117374. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117374>.

Dietrich, D. R., Krieger, H. O. (2009a) Análisis histológico de los efectos disruptivos endocrinos en pequeños peces de laboratorio. John Wiley & Sons., Inc., Hoboken, NJ. págs. 129.

Dietrich D. R., Krieger H. O. (2009b) Análisis histológico de los efectos disruptivos endocrinos en pequeños peces de laboratorio. John Wiley & Sons., Inc., Hoboken, NJ. págs. 121-122.

ECHA. (2017) Guía sobre requisitos de información y evaluación de la seguridad química, capítulo R.11: Evaluación PBT/mPmB, versión 3.0, junio de 2017. https://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r11_en.pdf/a8cce23f-a65a-46d2-ac68-92fee1f9e54f

ECHA. (2021a) Dossier REACH sobre TMBPF: 4,4'-metilenebis (2,6-dimetilfenol (CASRN 5384-21-4) consultado el 15 de enero de 2021. <https://echa.europa.eu/substance-information/-/substanceinfo/100.023.980>.

ECHA. (2021b) Herramienta de Coordinación de Actividades Públicas consultada el 25 de julio de 2021.

https://echa.europa.eu/pact?p_p_id=disspact_WAR_disspactportlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column1&p_p_col_pos=1&p_p_col_count=2&disspact_WAR_disspactportlet_substanceId=100.023.980&disspact_WAR_disspactportlet_jspPage=%2Fhtml%2Fportlet%2Fdisspact%2FdetailsPage%2Fview_detailsPage.jsp

Exponente. (2017) Una evaluación de los ensayos de detección endocrina del epoxi ValPure NBPA de Valspar. Informe interno.

Harnett, K. G., Chin, A., Schuh, S. M., (2021a) BPA y alternativas de BPA, BPS, BPAF y TMBPF, inducen citotoxicidad y apoptosis en células madre humanas y de rata. *Ecotox. Medio ambiente. Seguridad.* 216 112210. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352340921004674?via%3Dihub>

Harnett, K. G., Moore, L. G., Chin, A., Cohen, I. C., Lautrup, R. R., Schuh, S. M. (2021b) Teratogenicidad y toxicidad de la nueva alternativa de BPA TMBPF, y BPA, BPS y BPAF en el desarrollo embrionario de pollos. *Curr. Res. Toxicol.* 2:399-410. doi: 10.1016/j.crtox.2021.11.001. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2666027X21000396?via%3Dihub>

Hou, J., Su, Y., Lin, W., Guo, H., Xie, P., Chen, J., Gu, Z., Li, L. (2017) La microcistina-LR retrasa la maduración gonadal al interrumpir el sistema de factores de crecimiento similares a la insulina / hormona de crecimiento de la hormona del crecimiento en el pez cebra. *Ecotoxicol. Medio ambiente. Saf.*, 139, 27-35. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.019>

Hyun, M., Rathor, L., Kim, H. J., McElroy, T., Hwang, K. H., Wohlgemuth, S., Curry, S., Xiao, R., Leeuwenburgh, C., Heo, J.D., Han S.M. (2021) Toxicidades comparativas de BPA, BPS, BPF y TMBPF en el nematodo *Caenorhabditis elegans* y células de fibroblastos de mamíferos. *Toxicología* 461, 152924.

Jensen, K. M., Kahl, M. D., Makynen, E. A., Korte, J. J., Leino, R. L., Butterworth, B. C., Ankley, G. T. (2004) Caracterización de las respuestas al antiandrógeno flutamida en un ensayo de reproducción a corto plazo con el pececillo gordo. *Aquat. Toxicol.* 70: 99-110.

Kim H., Ji K. (2022) Efectos del tetrametilbisfenol F en los sistemas endocrinos relacionados con la tiroides y la hormona del crecimiento en larvas de pez cebra. *Ecotoxicol. Medio ambiente. Saf.*, 237, 113516. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113516>

Kim, H. M., Lee, S. M., Choi, J., Soung, N. K., Heo, J. D. (2021) Efectos del bisfenol A y sus alternativas, bisfenol F y tetrametilbisfenol F en la diferenciación de osteoclastos. *Moléculas* 26 (20) de octubre: 6100. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8539477/>

Lee, S., Kim, C., Shin, H., Kho, Y., Choi, K., (2019) Comparación de los potenciales de disrupción de la hormona tiroidea por bisfenoles A, S, F y Z en pez cebra embriolarvario. *Quimiosfera* 221, 115–123. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.019>

Maffini, M. V., Canatsey, R. D. (2020) Un perfil toxicológico ampliado del tetrametilbisfenol F (TMBPF), un precursor de un nuevo recubrimiento de envases metálicos en contacto con alimentos. *Toxicol químico de los alimentos.* Ene; Artículo 135.

OCDE (1998) Directrices de la OCDE para el ensayo de sustancias químicas. Directriz de ensayo (TG 212) Pescado, ensayo de toxicidad a corto plazo en las fases embrionaria y de alevines en saco. Directrices de la OCDE para el ensayo de sustancias químicas. Editorial OCDE, París. <https://doi.org/10.1787/9789264070141-en>

OCDE (2013) Directrices de la OCDE para el ensayo de sustancias químicas. Directriz de ensayo (TG 210) Peces, ensayo de toxicidad en las primeras etapas de la vida. Directrices de la OCDE para el ensayo de sustancias químicas. Editorial OCDE, París.

<https://doi.org/10.1787/20745761>

OCDE (2018) Revised Guidance Document 150 on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption (Documento de orientación revisado 150 sobre directrices de ensayo estandarizadas para la evaluación de sustancias químicas para la disrupción endocrina). Páginas 20 y 265.

<https://doi.org/10.1787/9789264304741-en>

Rochester, J. R., Bolden, A. L. (2015) Bisfenol S y F: una revisión sistemática y comparación de la actividad hormonal de los sustitutos del bisfenol A. *Medio ambiente. Perspectiva de la salud*. Jul; 123(7):643-50.

Selderslaghs, I., Van Rompay, A., De Coen, W., Witters, H. (2009) Desarrollo de un ensayo de detección para identificar productos químicos teratogénicos y embriotóxicos utilizando el embrión de pez cebra, *Toxicología reproductiva*, 28 (3), 308-320. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2009.05.004>

Sipes, N.S., Padilla, S., Knudsen, T.B. (2011) El pez cebra como modelo integrador para las pruebas de toxicidad del siglo XXI. *Defectos congénitos Res C Embryo Today*, 93, 256–267.

Soto, A. M., Schaeberle, C., Maier, M. S., Sonnenschein, C., Maffini, M. V. (2017) Evidencia de ausencia: evaluación de la estrogenicidad de un nuevo recubrimiento en contacto con alimentos y el bisfenol utilizado en su síntesis. *Medio Ambiente. Sci. Technol.* 7 de febrero; 51(3):1718-1726.

Szafran, A. T., Stossi, F., Mancini, M. G., Walker, C. L., Mancini, M. A. (2017) Caracterización de las propiedades de los análogos de bisfenol sustituidos no estrogénicos mediante microscopía de alto rendimiento y análisis de imágenes. *PLoS ONE* 12(7).

Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA, por (2012) Futuros Sostenibles / Manual Marco P2 EPA-748-B12-001 7. Estimación de la persistencia, bioacumulación y toxicidad utilizando el perfilador de PBT. <https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-05/documents/07.pdf>

Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA, por (2018) Suite™ de interfaz de programas de estimación (EPI) para Microsoft® Windows, v 4.1, modelo de fugacidad de nivel III.

Informe del estudio Valspar (a). 4-[(4-hidroxi-3,5-dimetilfenil)-2,6-dimetilfenol (CASN 5384-21-4), también conocido como tetrametilbisfenol F (TMBPF) - Evaluación del desarrollo puberal y la función tiroidea en ratas macho y hembra juveniles. *Informe de laboratorio inédito*. El estudio se puede localizar en el siguiente enlace: <https://sherwin-williams.app.box.com/s/yf7t38ohj95zfonbtojddwgblbduw4dw/file/647416299794>

Informe del estudio de Valspar (b). 4-[(4-hidroxi-3,5-dimetilfenil) metil]-2,6-dimetilfenol (CASN 5384-21-4), también conocido como tetrametilbisfenol F (TMBPF) - Ensayo de metamorfosis de anfibios con rana de uñas africana (*Xenopus laevis*). *Informe de laboratorio inédito*. El estudio se puede localizar en el siguiente enlace: <https://sherwin-williams.app.box.com/s/yf7t38ohj95zfonbtojddwgblbduw4dw/file/647420175195>

Informe del estudio Valspar (c). 4-[(4-hidroxi-3,5-dimetilfenil) metil]-2,6-dimetilfenol (CASN 5384-21-4), también conocido como tetrametilbisfenol F (TMBPF); Estudio de toxicidad dietética de 90 días en ratas Sprague Dawley con un período de recuperación de 28 días. *Informe de laboratorio inédito*. El estudio se puede localizar en el siguiente enlace: <https://sherwin-williams.app.box.com/s/yf7t38ohj95zfonbtojddwgblbduw4dw/file/647401528672>

Informe del estudio Valspar (d). 4-[(4-hidroxi-3,5-dimetilfenil)-2,6-dimetilfenol (CASN 5384-21-4), también conocido como tetrametilbisfenol F (TMBPF) – Ensayo de reproducción a corto plazo con pececillo de cabeza gorda (*Pimephales promelas*). *Informe de laboratorio inédito*. El estudio se puede localizar en el siguiente enlace: <https://sherwin-williams.app.box.com/s/yf7t38ohj95zfonbtojddwgblbduw4dw/file/647377099397>

Informe del estudio de Valspar (e). 4-[(4-hidroxi-3,5-dimetilfenil) metil]-2,6-dimetilfenol (CASN 5384-21-4), también conocido como tetrametilbisfenol F (TMBPF); Ensayo de biodegradación. *Informe de laboratorio inédito*. El estudio se puede localizar en el siguiente enlace: <https://sherwin-williams.app.box.com/s/yf7t38ohj95zfonbtojddwgblbduw4dw/file/647384258104>

Informe del estudio de Valspar (f). 4-[(4-hidroxi-3,5-dimetilfenil) metil]-2,6-dimetilfenol (CASN 5384-21-4), también conocido como tetrametilbisfenol F (TMBPF); Determinación del coeficiente de reparto n-octanol/agua utilizando la columna del generador. *Informe de laboratorio inédito*. El estudio se puede localizar en el siguiente enlace: <https://sherwin-williams.app.box.com/s/yf7t38ohj95zfonbtojddwgblbduw4dw/file/647384262904>

Yang, L., Ho, N. Y., Alshut, R., Legradi, J., Weiss, C., Reischl, M., Mikut, R., Liebel, U., Muller, F., Strahle, U. (2009) Embriones de pez cebra como modelos para los efectos embriotóxicos y teratológicos de los productos químicos. *Reprod Toxicol*, 28, 245–253.

Zhang, N., Scarsella, J. B., Hartman, T. G. (2020) Estudios de identificación y cuantificación de migrantes de recubrimientos alternativos de latas metálicas en contacto con alimentos con BPA. *Polímeros* (Basilea) 29 de noviembre; 12(12):2846.

Traducción al español del texto original (inglés).

**A Comprehensive Review of Potential Health & Environmental Effects
of Tetramethyl Bisphenol F
(TMBPF; 4,4'-methylenebis (2,6-dimethylphenol); Cas No. 5384-21-4).**

Executive Summary.

In recent years, TMBPF was identified as a possible substitute for Bisphenol A (BPA) in the manufacture of epoxy coatings used to line food and beverage cans. In 2017, initial TMBPF toxicity studies focused on identifying whether this substance had estrogenic activity similar to BPA. A lack of estrogenic bioactivity observed from these assays led to the promotion of TMBPF as a “green” replacement for BPA. However, estrogenic effects are only one hazardous endpoint of concern for endocrine disruption and endocrine disruption is only one hazardous endpoint of a complete toxicity profile. More recent studies conducted on TMBPF demonstrate a toxicity profile that is different from BPA, although it is a profile that contains hazards. For human health, the weight-of-evidence demonstrates endocrine related responses based on results from computational, *in vitro*, and *in vivo* studies. These studies showed anti-androgenic activity and effects on steroidogenesis with disruption of both hormones, estradiol and testosterone. Results from an *in vivo* pubertal study showed changes in circulating levels of thyroid hormones and histopathological changes in the thyroid. Additionally, a 90-day TMBPF dietary study in rats reported an increased incidence and severity of epithelial proliferation on the thymus and follicular ovarian cysts in female rats. A study conducted in 2021 showed dose-dependent impairment of development, growth, and survival of chicken embryos exposed to TMBPF at low, environmentally relevant concentrations. These findings included severe morphological effects on the eye and craniofacial structures. The authors of this study concluded that TMBPF might be more teratogenic, potent, and toxic than BPA. Other recent *in vitro* peer-reviewed studies indicate that TMBPF has a greater cytotoxicity response than BPA, alters fat-cell development, shortens an organism’s lifespan, and increases age-related changes in neurons as well as potential to disrupt bone homeostasis and increase bone resorption. Data gaps for TMBPF are present for numerous other toxicity endpoints such as reproductive toxicity, developmental toxicity, and carcinogenicity. Concerning environmental hazards, the potential for TMBPF to produce endocrine disruption was also observed. In a 21-day amphibian metamorphosis study, histopathological changes in the thyroid and a developmental stage reduction were noted in frogs. A study in fish embryos/larvae exposed to TMBPF showed developmental effects that were attributed to the observed hyperthyroidism, decreased growth hormone, and abnormal transcription of genes associated with the thyroid and growth hormone-related endocrine systems. Changes in reproductive parameters indicative of anti-androgenic effects and estrogen agonist effects were also observed in a fish reproduction study. Another endpoint of environmental concern is persistence as results from environmental fate studies and modeling show TMBPF to be highly stable, does not undergo hydrolysis, not readily biodegradable in aqueous medium, and has long half-lives in soil and sediment with strong binding potential to both. The diglycidyl ether form of TMBPF (i.e., TMBPF-DGE) was also not readily biodegradable in aqueous medium. The persistence of TMBPF (and potentially TMBPF-DGE) along with indications of endocrine disruption in fish and frogs suggest high concern for the environment. The ECHA dossier registrants classified TMBPF as very toxic to the aquatic environment for both acute and chronic exposures. In a recent peer-reviewed 2020 publication, TMBPF and TMBPF-DGE were detected migrating from TMBPF coatings lining food cans, which provides a plausible route-of-exposure to humans and the environment. Studies have also shown numerous *NIAS (Non-Intentionally Added Substances) of unknown identity and quantity migrating from TMBPF epoxy coatings*. Additionally, the European Union (EU) REACH dossier lists the highest tonnage band ($\geq 1,000$ tonnes to $\leq 10,000$ tonnes) for the manufacture and importation of TMBPF suggesting widespread use of this substance in the EU. Several EU regulatory bodies completed reviews of TMBPF stating that additional studies are

warranted to discount possible human and environmental effects observed from the existing body-of-evidence. In 2017, France's National Agency for Health, Food, Environment, and Occupational Safety (ANSES) reviewed the available scientific literature on TMBPF and determined that endocrine disrupting ability for humans and the environment cannot be ruled out. ANSES further stated "Experimental data are needed [for TMBPF] to clarify concerns about persistence, bioaccumulation, and toxicity for environmental organisms". In 2020, the National Institute for Public Health and the Environment (RIVM) of the Netherlands also indicated, "further studies are needed to evaluate reproductive and developmental toxicity potential for TMBPF". ECHA is evaluating TMBPF for endocrine disruption and has requested the registrants to conduct higher tier studies in order to better understand the hazards. In conclusion, publicly available data generated thus far identify hazards from TMBPF exposure that suggest human health concerns as well as high environmental concerns that include the potential for persistence and endocrine disruption in fish and frogs.

Toxicological Profile.

ANTI-ANDROGENIC RESPONSE: The first reported study on TMBPF included results from the following assays: Estrogen Receptor (ER) Transactivation Assay, Uterotrophic Assay, and Male/Female Pubertal Assay (Soto et al., 2017). Results from an E-screen on migrants from a TMBPF epoxy resin was also reported in this study. These endocrine disruptor screening assays were mostly designed to evaluate estrogenic activity. The Pubertal Assay also included the evaluation of several androgenic and thyroid endpoints. While the results of these assays indicated a lack of estrogenic activity, there were however, findings related to androgen dependent tissues. A dose-dependent decreasing trend in the weight of the dorso-lateral prostate, ventral prostate, and the seminal vesicles (with coagulating gland) were observed in male rats exposed to TMBPF. These results were located in the supplemental data of the published article (Soto et al., 2017) and in a laboratory study report (Valspar Study Report a, Unpublished)⁹ but were not mentioned in the body of the publication, likely due to the lack of statistical significance. **However, the dose-dependent trend of decreasing weight of these androgenic sensitive tissues are suggestive of an endocrine response.**

Utilizing multiple cell-based models, Szafran et al. (2017) evaluated TMBPF and other compounds (e.g., TMBPF diglycidyl ether; TMBPF-DGE) which are part of the manufacturing process for the TMBPF epoxy resin. Included in these cell-based models was a high-throughput microscopy-based platform that allowed for determination of estrogen and androgen activity (both agonism and antagonism). The findings from this study do not indicate estrogenic or androgenic agonistic activity. **However, TMBPF demonstrated both anti-estrogenic and anti-androgenic activity. The anti-androgenic activity for TMBPF was described as “strong” by the study authors because the level of response from TMBPF was similar to the anti-androgenic positive controls (i.e., MDV3100 and CDX) used in the study (see figure below; purple circle).**

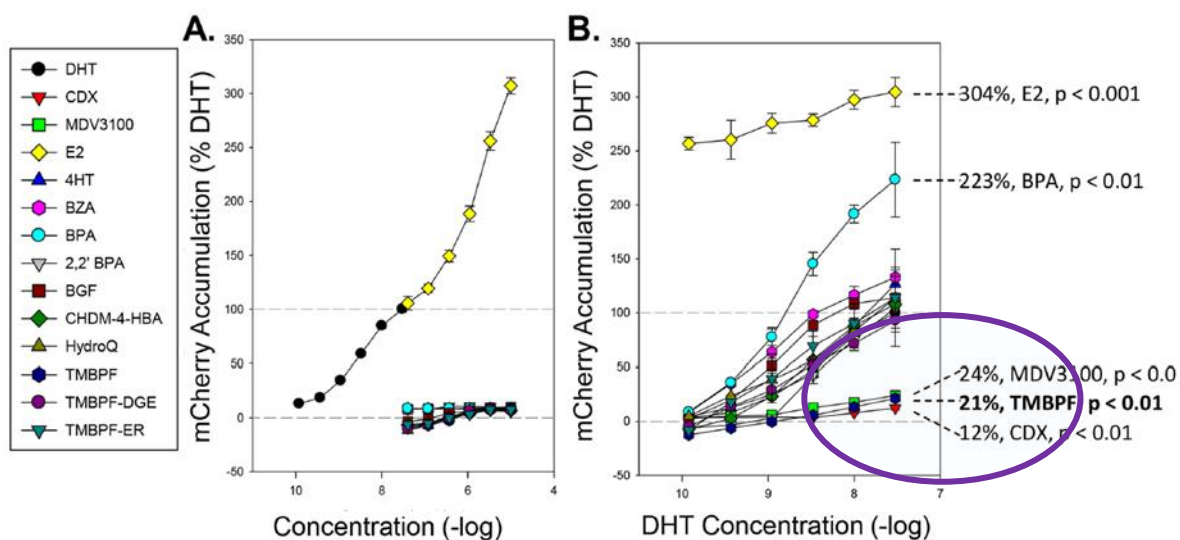


Fig 5. Chemical compound effect on an integrated ARE-containing probasin-mCherry-NLS reporter in the AR responsive LNCaP cell line. The nuclear accumulation of mCherry fluorescent protein in 2PB-mCherry-NLS:LNCaP cells treated with indicated compounds either alone at concentrations from 50 pM to 5 μM (A) or at 5 μM with DHT at ranging from 0.1 nM to 30 nM (B) for 48 hours. Compounds that induced either a significant androgen-like or anti-androgen-like response in the presence of DHT are indicated. All data represent mean of 3 experiments ± standard deviation.

(Figure reproduced from Szafran et al., 2017; Purple circle added to highlight the anti-androgenic TMBPF response)

[⁹TMBPF Pubertal Development/Thyroid Function in Rats Study](#)

In 2020, Maffini and Canatsey, reported results from an *in vitro* aromatase inhibition assay, *in vitro* steroidogenesis assay, and *in vivo* androgen agonism/antagonism studies. The results from a 90-day dietary toxicity study were also reported in this article. No effects were observed in the *in vitro* aromatase inhibition study. **However, the *in vitro* steroidogenesis study demonstrated statistically significant increases in estradiol and testosterone at the highest non-cytotoxic concentration level. The *in vivo* Hershberger assay on TMBPF demonstrated *anti-androgenic* activity at the highest exposure dose level due to statistically significant decreases in the weight of two male reproductive tissues (i.e., seminal vesicles and the levator ani-bulbocavernosus [LABC] muscle).**

In summary, the findings from these three studies (Soto et al., 2017; Szafran et al., 2017; Maffini and Canatsey, 2020) demonstrate a pattern of anti-androgenic activity as shown in Table 1 below.

Table 1. Observed TMBPF Response on the Androgenic System

Type of Evaluation	Study	Activity or Effect Noted	Species & Sex or Cell Line	Dose Levels of Effects	Reference
Computational	QSAR Modeling (Leadscope and SciQSAR)	Anti-androgenic activity predicted	Not Applicable	Not Applicable	Danish QSAR Database, 2021
<i>In Vitro</i>	Integrated Probasin-mCherry-NLS Reporter and High Throughput Microscopy-Based Screening	Anti-androgenic response: 79% ↓ in DHT induced response (Known anti-androgens CDX and DV3100 ↓ response by 88 and 76%, respectively)	Androgen responsive LNCaP prostate cancer cell line	5 μM	Szafran et al., 2017
<i>In Vitro</i>	Steroidogenesis Assay	Induced testosterone	H295R human adrenocortical carcinoma cell line	1 μM**, 3 μM** and 10 μM**	Maffini and Canatsey, 2020
<i>In Vivo</i>	Pubertal Assay	↓ in weight of: <ul style="list-style-type: none"> • seminal vesicles (with coagulating gland)* • prostate (ventral)* • prostate (dorso-lateral)* 	Male Rats	200 mg/kg-bw/day and 600 mg/kg-bw/day	Soto et al., 2017 (Supplemental Information); (Valspar Study Report a)
<i>In Vivo</i>	Hershberger Assay	↓ in weight of: <ul style="list-style-type: none"> • seminal vesicles • LABC muscle* 	Male Rats	100 mg/kg-bw/day, 300 mg/kg-bw/day, and 1000 mg/kg-bw/day**	Maffini and Canatsey, 2020

*Dose-dependent response

** Statistically significant change from experimental controls

THYROID DISRUPTION: Exponent (2017), a scientific consulting firm, conducted a review of the laboratory reports that were the basis for the Soto et al. (2017) publication. In reviewing the male and female pubertal assay, Exponent noted a statistically significant reduction in circulating thyroxine (T4) levels for both male and female rats at 200 mg/kg/day and 600 mg/kg/day. Additionally, statistically significant increases in thyroid-stimulating hormone (TSH) levels in females (600 mg/kg/day), statistically significant increases in thyroid organ weights in both males and females (600 mg/kg/day) and increases in thyroid follicular cell height (an indicator of increased thyroid gland activity) were observed in both males and females (200 mg/kg/day and 600 mg/kg/day). Statistically significant increased liver and kidney weights were also noted for females at 600 mg/kg/day and for males at 200 mg/kg/day and 600 mg/kg/day when compared to controls. The thyroid findings from the pubertal assay were not discussed in the Soto et al. (2017) article nor were these findings included in the supplemental data for the article. However, these findings were noted in the original laboratory study report (Valspar Study Report a, Unpublished)¹⁰.

Exponent theorized that the thyroid findings noted in the pubertal study may be a result of liver enzyme induction. The increased liver weight and hepatocyte hypertrophy observed in a 90-day dietary study on TMBPF (Maffini and Canatsey, 2020) may support this hypothesis but it does not preclude TMBPF interaction with the thyroid hormone endocrine pathway.

Thyroid effects were also noted in frogs exposed to TMBPF in an amphibian metamorphosis assay. The purpose of the 21-day screening assay was to identify whether exposure to a substance result in interference with the hypothalamus-pituitary-thyroid (HPT) axis. Histopathological findings in the thyroid from the amphibian metamorphosis assay (Valspar Study Report b, Unpublished)¹¹ are similar to the results in rats from the pubertal study (above). These thyroid findings included an increase in the incidence and severity of follicular cell hyperplasia, an increase in the severity of follicular cell hypertrophy, and an increase in the incidence of thyroid hypertrophy. Additional information on this study is provided in the *Thyroid Disruption* section of the *Environmental Profile*. ***The multiple thyroid responses noted with TMBPF exposure are suggestive of an endocrine effect.***

TERATOGENICITY: The effects of TMBPF, as well as BPA and other BPA analogs, were evaluated in a chicken embryotoxicity screening study conducted by Harnett et al. (2021b). Exposure to TMBPF produced significant dose-dependent effects on embryo development, growth, and survival. The most notable developmental defects included extreme eye and craniofacial malformations. Growth was also severely reduced in the TMBPF exposed embryos averaging half the size and weight of control embryos. Importantly, the developmental effects noted in this study occurred at low, environmentally relevant concentrations (nM or ppb levels). ***Based on the study results, the authors concluded TMBPF was much more teratogenic, potent, and toxic than BPA and the second most toxic of all BPA analogs evaluated.***

OVARIAN CYSTS AND THYMUS RESPONSE: As mentioned previously, the results of a 90-day dietary toxicity study were reported in a scientific article by Maffini and Canatsey (2020) and the original study report (Valspar Study Report c, Unpublished)¹². Microscopic findings related to TMBPF exposure included an increased incidence and severity of ovarian cysts and epithelial proliferation of the thymus for female rats in the highest dose group. Also noted in this study were

¹⁰[TMBPF Pubertal Development in Rats Study](#)

¹¹[TMBPF Frog Metamorphosis Assay](#)

¹² [TMBPF Ninety-Day Study in Rats Report](#)

increased kidney weights and an increased incidence of tubular dilation and/or hypertrophy for male and female rats at the highest dose level. A renal cell carcinoma was observed in one high dose male rat. Liver weights were increased in males and females (≥ 100 mg/kg-bw/d) along with an increased incidence of hepatocellular hypertrophy. ***This in vivo study revealed a dose-dependent increase in the incidence and severity of ovarian cysts as well as epithelial proliferation of the thymus for female rats.***

GENOTOXICITY: In 2020, ANSES reviewed the results of an Ames test, micronucleus test, and comet assay on TMBPF that were sponsored by a manufacturer of TMBPF. Their conclusion for the Ames test was that TMBPF was not mutagenic *in vitro*. The *in vitro* micronucleus test showed statistically significant dose-related increases in micronuclei in human lymphocytes in the absence and presence of metabolic activation. ANSES concluded that TMBPF was clastogenic/aneugenic *in vitro*. The *in vivo* comet assay showed equivocal results for one of the target organs (glandular stomach) and had a number of protocol deviations (i.e., no historical control data for the jejunum; overlapping negative and positive historical control data for other target organs). However, ANSES concluded that the comet assay suggested a likely absence of *in vivo* genotoxicity. In conclusion, mixed results were observed for the genotoxicity assays and the genotoxicity status of TMBPF is still uncertain.

CYTOTOXICITY AND ALTERED FAT-CELL DEVELOPMENT: In 2021, two *in vitro* peer-reviewed published studies reported that exposure to TMBPF killed human and animal stem cells (Harnett et al. 2021a) and altered fat-cell development (Cohen et al., 2021). The authors of these two scientific articles indicated that TMBPF should be grouped with other BPA-analogs as inappropriate replacements to BPA due to greater cytotoxic effects from TMBPF than from BPA and a unique mechanistic effect on fat-cell development. They propose that TMBPF should be further studied by independent laboratories (not funded by manufacturers of TMBPF), that regulations be established, more public awareness be made, and that safer sustainable chemicals should be developed.

PREMATURE AGING, REPRODUCTIVE AND DEVELOPMENTAL EFFECTS: Exposure to TMBPF demonstrates a shortening of an organism's lifespan and increased age-related changes in neurons (Hyun et al., 2021). TMBPF, BPA, and other BPA analogs were evaluated for effects on aging using an *in vivo Caenorhabditis elegans* animal (nematode) model commonly used to evaluate effects from environmental exposures and *in vitro* cultured mammalian fibroblast (neuronal) cells. The *in vivo* study indicated that TMBPF delayed development and impacted reproduction in nematodes which was also observed with exposure to BPA. The *in vitro* neuronal cell study demonstrated that TMBPF induced the most potent cell death at low concentrations and was the only bisphenol tested that caused a significant increase in mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and **mitochondrial** permeability transition pore (**mPTP**) opening, markers of aging. The authors conclude that bisphenol analogs caused varying degrees of changes in development, aging, neuronal integrity, cell viability, and mitochondrial homeostasis. BPA caused the greatest number of toxic effects compared to TMBPF, previously considered a relatively less studied and safer alternative. However, TMBPF caused delayed development, reduced reproduction, significant apoptosis (cell-death), mitochondrial dysfunction, and aging. The results suggest that exposure to almost all the selected compounds of the bisphenol group can lead to health and aging risk.

ADVERSE IMPACT ON SKELETAL HEALTH: A recent *in vitro* study on TMBPF (Kim et al., 2021) investigated the effects on bone homeostasis by evaluating osteoclast differentiation using a mouse osteoclast precursor cell line. Estrogen plays an important role in bone homeostasis that is maintained by osteoblasts that are responsible for bone formation and osteoclasts that are responsible for bone resorption. In this study, TMBPF dramatically enhanced osteoclast differentiation and activated the expression of osteoclast-related target genes in comparison to BPA which showed only a minimal effect. The authors state their findings suggest that TMBPF exerts endocrine related activity, which results in a negative impact on bone remodeling and skeletal homeostasis.

DATA GAPS: ***No information on TMBPF for mammalian reproductive toxicity, mammalian developmental toxicity, or carcinogenicity were reported in the ECHA dossier.***

Environmental Profile

THYROID DISRUPTION IN AMPHIBIANS: A 21-day amphibian metamorphosis screening assay with the African clawed frog was conducted on TMBPF (located on the manufacturer’s website but not in the ECHA dossier) (Valspar Study Report b, Unpublished)¹³. The purpose of this study is to determine whether the substance interferes with the hypothalamus-pituitary-thyroid (HPT) axis. Exposure to TMBPF was found to significantly increase body weight at the 7-day time point for the 310 µg/L group (i.e., the highest exposure concentration). Histopathological findings noted for the thyroid gland were an increase in the incidence and severity of follicular cell hyperplasia, an increase in the severity of follicular cell hypertrophy, and an increase in the incidence of thyroid hypertrophy. At day 21, a statistically significant reduction (based across several parameters) in the development stage of tadpoles exposed to the highest exposure concentration (310 µg/L) was also observed. The study report stated, “Therefore, the thyroid histopathology, in conjunction with the apical endpoint responses, demonstrates perturbations in the HPT axis as a result of TMBPF exposure in African clawed frogs.” ***Effects indicative of endocrine disruption were noted in amphibians exposed to TMBPF for 21 days.***

EFFECTS ON THYROID AND GROWTH HORMONE-RELATED ENDOCRINE SYSTEMS IN FISH: Kim and Ji (2022) investigated the effects of TMBPF exposure on the endocrine system of zebrafish embryos and larvae. Zebrafish are widely utilized as a model organism to examine reproductive and developmental effects (Selderslaghs et al., 2009; Sipes et al., 2011; Yang et al., 2009) as well as endocrine disruption (Dang et al., 2021). Specifically, the hypothalamus-pituitary-thyroid (HPT) axis and the growth hormone/insulin-like growth factors (GH/IGFs) axis were evaluated since fish embryo development and larval-juvenile growth are predominantly controlled by the regulation of these axes (Dang et al., 2018; Hou et al., 2017). Transcription of genes involved in upregulation and downregulation of these axes were also evaluated. The design for this study was based on OECD Test Guideline TG 212 (OECD, 1998); TG 212 is considered to be a screening test for TG 210 (OECD, 2013) which is included in the OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disruptors (2018). Exposure to the highest concentration of 500 µg/L of TMBPF resulted in a decrease in hatchability, body weight, and very low larval survival as well as an increase in coagulated embryos and malformations. Larval survivability and body weight was also decreased at 50 µg/L. At exposure concentrations greater than 5 µg/L, the level of thyroid hormone triiodothyronine (T3) was significantly increased and the level of growth hormone (GH) was significantly decreased. In addition, the abnormal transcription of genes involved in the HPT and GH/IGFs axes was observed at 50 µg/L. These changes were similar to that observed with BPA and other bisphenols utilizing the same protocol (Lee et al., 2019). The authors concluded that the observed developmental effects in zebrafish exposed to TMBPF may be attributed to increased T3, decreased growth hormone, and abnormal transcription of genes involved in the HPT and GH/IGFs axes. Furthermore, the authors indicated that BPA and other bisphenols produced comparable results, which may be due to the similarity of their molecular structures. ***Developmental effects, changes in the levels of thyroid and growth hormones, and the abnormal transcription of genes involved in the HTP and GH/IGF axes were observed in fish embryos/larvae; these effects were similar to that observed with BPA.***

ANTI-ANDROGENIC AND AGONISTIC ESTROGENIC RESPONSE IN FISH: A short-term reproduction study with Fathead minnows (not found in the ECHA dossier), showed a statistically significant decrease in fecundity (number of eggs produced by females per day) and fertilization success (the number of embryos versus the number of eggs) for female minnows exposed

¹³[TMBPF Frog Metamorphosis Assay](#)

to 190 µg/L (the highest exposure concentration) (Valspar Study Report d, Unpublished)¹⁴. Fecundity in controls was 46 eggs/female/day versus 22 eggs/female/day for the 190 µg/L group. Fertilization success for controls was 99.7% versus 99.5% for the 190 µg/L group. A statistically significant increase in vitellogenin was noted for males in both the 32 µg/L group and the 190 µg/L group. Histopathological changes included an increased incidence of interstitial (Leydig) cells in the testis in males of the 190 µg/L group and an increased incidence of oocyte atresia in the ovaries for females in the 190 µg/L group. Increases in Leydig cells in the testis have been shown to be a result of substances that interrupt androgen steroidogenesis producing an anti-androgenic response (Dietrich and Krieger, 2009a; Jensen et al., 2004). The increase in vitellogenin concentration in male fish is a well-recognized response to estrogen receptor agonists (Borgert et al., 2014). The oocyte atresia in female fish has been shown to be a response related to hormonal changes (Dietrich and Krieger, 2009b) but other modes of action may be possible. ***Effects noted in the fish reproduction study suggest both anti-androgen and agonistic estrogenic responses indicating endocrine disruption may occur in environmental organisms.***

TOXIC TO AQUATIC ENVIRONMENT: The acute toxicity data provided in the ECHA dossier, derived from modelled information, read-across substances, were indicative of high toxicity to *Daphnia magna*. ECOSAR (version 1.1 of EpiSuite) predicted an LC₅₀ value for TMBPF of 0.346 mg/l for 48 hrs. Based on this value, it can be concluded that the substance is considered to be toxic to the aquatic environment with a classification of Aquatic Acute 1 (i.e., Very toxic to aquatic life) per the criteria in the CLP regulation. An unpublished acute toxicity study on fish, daphnia, and algae, conducted by GLP and OECD guidelines, indicated no toxicity for fish, *Daphnia magna*, or algae at 3.77 mg/L. However, this study was conducted with a static exposure and no analytical determination of the exposure concentration.

There are no repeated exposure toxicity studies on fish, *Daphnia magna*, or algae. Utilizing modeling, the most sensitive species to TMBPF for repeated exposures was determined to be fish. ECOSAR results predicted a No Observed Effect Concentration (NOEC) of 0.036 mg/L for a 28-day exposure. According to the CLP criteria and as proposed by the registrants, TMBPF warrants a classification as Aquatic Chronic 1 (i.e., Very toxic to aquatic life with long lasting effects).

Modelling results predict that the substance will be hazardous to aquatic organisms at low concentrations for both acute and chronic exposures. According to the CLP criteria and as proposed by the manufacturers of TMBPF (i.e., ECHA dossier registrants), this substance warrants a classification as Aquatic Chronic 1 (i.e., Very toxic to aquatic life with long lasting effects for both acute and repeated exposures. Studies (GLP and OECD compliant) utilizing flow-through exposures and analytical measurement of exposure concentrations may provide additional clarity on the toxicity potential to aquatic species.

PERSISTENCE

Hydrolysis: According to the ECHA Dossier (2021a), based on the results of studies and a weight of evidence approach, it can be concluded that the substance is stable and does not undergo hydrolysis in the environment.

Biodegradation in Water: Based on modeling results, the half-life of TMBPF in water was estimated to be **37.5 days** and thus, based on this value would not be expected to be persistent in water (ECHA Dossier, 2021a). It was also estimated that 5.86 % of the chemical will partition into water when released into the environment (US EPA, 2018). However, a CO₂ Evolution study (utilizing OECD guideline 301B) conducted on TMBPF and TMBPF-DGE showed no net production of CO₂ during the study (Valspar Study Report e, Unpublished)¹⁵.

¹⁴[TMBPF Fish Reproduction Study](#)

¹⁵[TMBPF Biodegradation Study](#)

Therefore, both substances were determined not to be readily biodegradable in an aerobic aqueous medium and indicate the potential for TMBPF to persist in water.

Biodegradation in Soil: Concerning soil, the half-life of TMBPF is estimated to be **75 days** and 61.8 % of the chemical will partition into this compartment. The Stockholm Convention on POPs requires a half-life greater than 6 months (180 days) to be considered persistent. However, US EPA considers substances with half-lives greater than 2 months (60 days) to be a concern and needing further investigation (US EPA, 2012).

Biodegradation in Sediment: The half-life of TMBPF in sediment is estimated to be **337.5 days** for sediment. Based on this half-life value, TMBPF is expected to be persistent in sediment. The soil adsorption coefficient (i.e., log Koc) was estimated to be 5.03 using the EPI Suite KOCWIN Program (v. 2.0). This value indicates that test chemical has strong adsorption to both soil and sediment.

ECHA's Public Coordination Tool (2021b) indicates that the agency is currently conducting a Regulatory Management Option Analysis (RMOA) on TMBPF for the purpose of determining possible regulatory action. The reason for the evaluation is due to concern about TMBPF's persistence as well as other hazard and exposure endpoints (i.e., endocrine disruption, reproductive toxicity, and widespread use of the chemical). France's ANSES authority (2017) initiated the RMOA evaluation for ECHA and stated the following about the persistence of TMBPF:

Modelisation half-lives for environmental compartments show controversy results especially for the sediment compartment. According to data from PBT profiler, TMBPF exhibits a half-life of 38 days in water and 340 days in sediments, but results from Danish QSAR data base show a half-life of 15 days in water and 135 days in sediments. Results in soil indicate a half-life of 75 days (PBT profiler) and 61.17 days (QSAR toolbox).

According to registration dossier TMBPF presents an estimate adsorption coefficient (log Koc) of 5.03 (KOCWIN Program v2.00) but taking into account the log Kow of 1.21 reported in their dossier, this parameter is estimated to 1.92. Considering the value of 5.03, it is expected a tendency of adsorption of TMBPF onto suspended solids and sediments. Clarifications of this parameter are needed in order to have a reliable interpretation.

Taking all these data into consideration suggest an alert regarding P/vP criteria of TMBPF especially in the sediment compartment and further information from standardized tests would be necessary for clarifications of aquatic biodegradation.

While modeling data indicates that TMBPF will not persist in water (based on a calculated half-life), a weight of evidence evaluation concluded that TMBPF is stable and does not undergo hydrolysis in water. Additionally, an OECD compliant biodegradation study showed that TMBPF and TMBPF-DGE are not readily biodegradable in an aqueous medium. All of this information suggests that TMBPF may be persistent in aqueous environments. The modeling data in the ECHA dossier also indicates that TMBPF will strongly adsorb to soil and sediment and likely persist in the sediment due to a half-life of 337.5 days. Further investigation is needed to clarify persistence in soil. ECHA (through ANSES) is evaluating this endpoint for risk management as persistence is considered a concern for TMBPF.

BIOACCUMULATION: The estimated Bioconcentration Factor (BCF) value in the ECHA Dossier on TMBPF was stated to be 1340 (US EPA, 2018) and the octanol water partition coefficient (log K_{ow}) was estimated to be 3.75. The estimate of the log K_{ow} utilizing the Danish QSAR Database in 2021 was 5.24. However, an EPA Guideline study determined the log K_{ow} to be 4.18 (Valspar Study Report f, Unpublished)¹⁶ which is slightly less than the screening criteria of 4.5 for bioaccumulation concern of aquatic organisms.

PBT EVALUATION: *For a Persistent, Bioaccumulative, and Toxic (PBT) evaluation, TMBPF fulfils the criteria for both persistence (P) in the sediment with possible concerns for persistence in soil and water. The substance also fulfills the criteria for toxicity (T) due to aquatic toxicity. TMBPF does not appear to meet the criterion for bioaccumulation (B) due to the estimated BCF value and the log K_{ow} value of 4.18. While the bioaccumulation criteria does not appear to be met, the persistence (P) and aquatic toxicity (T) of TMBPF are of concern for this high volume substance.*

HUMAN EXPOSURE TO TMBPF: In 2017, Soto et al. reported that TMBPF was not detected in migrants extracted from TMBPF epoxy resin coated metal panels at the limit of detection (LOD) of 0.2 ppb (equivalent to 0.03 $\mu\text{g}/\text{dm}^2$). The study does not mention evaluating any other TMBPF epoxy migrants or potential degradation products. In a more recent study published in 2020, Zhang et al. evaluated four different metal cans and their lids lined with different BPA-replacement food-contact coatings including a TMBPF coating. Migration tests were conducted using food simulants and conditions of use corresponding to the intended applications and regulatory guidance from the U.S. Food and Drug Administration. Extracts were analyzed by gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) and high-resolution GC-MS. Bisphenol-type migrants including tetramethyl bisphenol F (TMBPF), tetramethyl bisphenol F diglycidyl ether (TMBPF-DGE), bisphenol F (BPF), bisphenol C (BPC), and other related monomers or oligomers were identified. TMBPF and TMBPF-DGE were found at levels between 0.78 $\mu\text{g}/\text{dm}^2$ and 5.10 $\mu\text{g}/\text{dm}^2$ which is approximately equivalent to 5 ppb and 30 ppb, respectively. The authors suggest that the levels of TMBPF and TMBPF epoxy migrants detected may be impacted by differences in the application of the coating to the metal cans (e.g., thickness of the coating, temperatures for application, curing time). Additionally, the TMBPF epoxy coating showed significantly more migrants as well as higher levels of migrants than what was observed with the polyester coatings that were evaluated.

Additional migration studies were conducted on TMBPF epoxy resins and reviewed by an ANSES expert workgroup (2020). Eighteen substances (oligomers of TMBPF DGE or degradation substances) were observed from the analysis of migration samples. The identity and quantity of these NIAS are unknown and need to be determined. ANSES (2020) also stated that based on potential exposure levels of some of the migrants, toxicology information is needed to ensure safety.

TMBPF, TMBPF-DGE, and numerous NIAS were detected in migration samples from TMBPF epoxy coatings. Thus, TMBPF and other TMBPF epoxy migrants would be expected to be found in food products and potentially the environment when discarded. A further concern is the high volume of the substance manufactured and imported in the EU. The substance is registered under REACH at $\geq 1,000$ to $\leq 10,000$ tonnes indicating the possibility of widespread distribution and exposure. Unfortunately, no biological monitoring programs for this substance were identified in the literature.

Regulatory Concerns

ECHA (2021b) is currently conducting a comprehensive evaluation of studies submitted in the dossier and is awaiting additional studies on TMBPF and TMBPF-DGE (tetramethyl bisphenol F diglycidyl ether; Cas No. 93705-66-9), a reaction product of TMBPF. ECHA (2021b) has included TMBPF on their endocrine disruptor (ED) assessment list and an ED evaluation is ongoing in 2022.

¹⁶ [TMBPF Partition Coefficient](#)

As part of the French National Strategy on Endocrine Disruptors, the French Competent Authority requested that the National Agency for Health, Food, and Environment, and Occupational Safety (ANSES) review the toxicological profile of TMBPF to determine whether regulatory management options should be initiated for this substance under REACH. The agency concluded that the endocrine disrupting potential character for humans and the environment cannot be ruled out for TMBPF (ANSES, 2017). Furthermore, ANSES stated, “Experimental data are needed to clarify concerns about persistence, bioaccumulation, and toxicity for environmental organisms”.

Additionally, the National Institute for Public Health and the Environment (RIVM) in the Netherlands conducted a review of Bisphenol A analogues that included TMBPF (Braver-Sewradj et al., 2020). The Dutch authorities also indicated, “further studies [for TMBPF] are needed to evaluate reproductive and developmental toxicity potential”.

ECHA (2021b) has included TMBPF on their endocrine disruptor (ED) assessment list and an additional study to inform this evaluation is ongoing. ANSES specifically called out the lack of information on endocrine disruption for the environment and noted that computational modeling (Leadscope and SciQSAR in the Danish QSAR database) of TMBPF predicted this substance to have an anti-androgenic response. RIVM indicated “further studies [for TMBPF] are needed to evaluate reproductive and developmental toxicity potential”.

Overall Conclusions

Results from currently available toxicity testing on TMBPF demonstrate the potential for endocrine disruption. A weight of evidence evaluation of computational toxicology predictive models, *in vitro*, and *in vivo* studies show a pattern of anti-androgenic activity in rodent studies. Other endocrine related findings associated with TMBPF exposure included: multiple thyroid responses (*in vivo* Pubertal Assay) and induction of estradiol and testosterone at the highest non-cytotoxic concentration (*in vitro* Steroidogenesis Study). Early embryonic exposure to TMBPF resulted in significant dose-dependent effects on chick embryo development, growth, and survival. Teratogenic effects were also observed in this study and included severe eye and craniofacial malformations that occurred at low exposure concentrations. Other toxicological endpoints of concern included an increased incidence and severity of ovarian cysts and epithelial proliferation of the thymus for female rats in the dietary 90-day study. *In vitro* studies on TMBPF showed cytotoxicity greater than BPA, alteration in fat-cell development, unfavorable effects on premature aging, and an adverse effect on bone health noted in *in vitro* and/or *in vivo* studies. The potential for endocrine disruption in the environmental was noted based on histopathological changes in the thyroid and developmental stage reduction in frogs exposed to TMBPF in a 21-day amphibian metamorphosis study. Exposure to TMBPF in a fish embryo/larvae study produced developmental effects and changes in the thyroid and growth hormone-related endocrine systems. Anti-androgenic and agonistic estrogenic effects were observed in a fish reproduction study. Computational modeling data, read across, and studies in the ECHA dossier indicates that the substance is toxic to aquatic organisms for both acute and chronic exposures at low levels. Another environmental endpoint of concern is persistence as TMBPF is stable, does not undergo hydrolysis, is not readily biodegradable, and has long half-lives. The persistence of TMBPF along with indications of endocrine disruption in fish and frogs suggest high concern for the environment. Furthermore, a human and environmental exposure pathway was identified with the detection of TMBPF, TMBPF-DGE, and NIAS migrating from TMBPF epoxy coatings lining food cans and lids. French and Dutch regulatory authorities have called for additional research to fill data gaps in order to further understand the endocrine potential and environmental impact. TMBPF is currently undergoing regulatory review for endocrine disruption by ECHA. Higher tier toxicological studies are underway that will provide additional understanding of the endpoints of concern and the risk to human health and the environmental.

References

- ANSES. (2017) Analysis of the most appropriate risk management option (RMOA). Substance name: 4,4'-methylenebis (2,6-dimethylphenol (TMBPF). 9 Dec. 2017. http://www.consultations-publiques.developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/rmoa_tmbpf_public.pdf
- ANSES. (2020) ANSES Opinion on the harmlessness for human health of TMBPF (used as a precursor) and TMBPF-DGE (used to manufacture an epoxy-type resin in contact with foodstuffs, replacing BADGE), and if applicable impurities, degradation products and oligomers of TMBPF and TMBPF-DGE. 29 Sept. 2020.
- Borgert, C. J., Stuchal, L. D., Mihaich, E. M., Becker, R. A., Bentley, K. S., Brausch, J. M. (2014) Relevance weighting of Tier 1 endocrine screening endpoints by rank order. *Birth Defect Res B*, 101, 90-113.
- Braver-Sewradj, S. P. den, van Spronsen, R., Hessel, E. V. S. (2020) Substitution of bisphenol A: a review of the carcinogenicity, reproductive toxicity, and endocrine disruption potential of alternative substances. *Crit Rev Toxicol*. Feb;50(2):128-147.
- Cohen, I. C., Cohenour, E. R., Harnett, K. G., Schuh, S. M. (2021) BPA, BPAF and TMBPF Alter Adipogenesis and Fat Accumulation in Human Mesenchymal Stem Cells, with Implications for Obesity. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 5363. <https://doi.org/10.3390/ijms22105363>
- Dang, Y., Wang, F., Liu, C. (2018) Real-time PCR array to Study the Effects of Chemicals on the Growth Hormone/Insulin-like Growth Factors (GH/IGFs) Axis of Zebrafish Embryos/Larvae. *Chemosphere*, 207, p. 365-376. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.05.102>
- Dang, Z., Arena, M., Kienzler, A. (2021) Fish Toxicity Testing for Identification of Thyroid Disrupting Chemicals. *Environmental Pollution*, 284, 117374. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117374>.
- Dietrich, D. R., Krieger, H. O. (2009a) Histological Analysis of Endocrine Disruptive Effects in Small Laboratory Fish. John Wiley & Sons., Inc., Hoboken, NJ. pp. 129.
- Dietrich D. R., Krieger H. O. (2009b) Histological Analysis of Endocrine Disruptive Effects in Small Laboratory Fish. John Wiley & Sons., Inc., Hoboken, NJ. p. 121-122.
- ECHA. (2017) Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment Chapter R.11: PBT/vPvB assessment, Version 3.0, June 2017. https://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r11_en.pdf/a8cce23f-a65a-46d2-ac68-92fee1f9e54f
- ECHA. (2021a) REACH Dossier on TMBPF: 4,4'-methylenebis (2,6-dimethylphenol (CASRN 5384-21-4) accessed on January 15, 2021. <https://echa.europa.eu/substance-information/-/substanceinfo/100.023.980>.

ECHA. (2021b) Public Activities Coordination Tool accessed on July 25, 2021.

https://echa.europa.eu/pact?p_p_id=disspact_WAR_disspactportlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_pos=1&p_p_col_count=2&disspact_WAR_disspactportlet_substanceId=100.023.980&disspact_WAR_disspactportlet_jspPage=%2Fhtml%2Fportlet%2Fdisspact%2FdetailsPage%2Fview_detailsPage.jsp

Exponent. (2017) An Evaluation of the Endocrine Screening Assays of Valspar's ValPure NBPA Epoxy. Internal report.

Harnett, K. G., Chin, A., Schuh, S. M., (2021a) BPA and BPA alternatives BPS, BPAF, and TMBPF, induce cytotoxicity and apoptosis in rat and human stem cells. *Ecotox. Environ. Safety.* 216 112210. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352340921004674?via%3Dihub>

Harnett, K. G., Moore, L. G., Chin, A., Cohen, I. C., Lautrup, R. R., Schuh, S. M. (2021b) Teratogenicity and toxicity of the new BPA alternative TMBPF, and BPA, BPS, and BPAF in chick embryonic development. *Curr. Res. Toxicol.* 2:399-410. doi: 10.1016/j.crtox.2021.11.001. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2666027X21000396?via%3Dihub>

Hou, J., Su, Y., Lin, W., Guo, H., Xie, P., Chen, J., Gu, Z., Li, L. (2017) Microcystin-LR retards gonadal maturation through disrupting the growth hormone/insulin-like growth factors system in zebrafish. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 139, 27-35. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.019>

Hyun, M., Rathor, L., Kim, H. J., McElroy, T., Hwang, K. H., Wohlgemuth, S., Curry, S., Xiao, R., Leeuwenburgh, C., Heo, J.D., Han S.M. (2021) Comparative toxicities of BPA, BPS, BPF, and TMBPF in the nematode *Caenorhabditis elegans* and mammalian fibroblast cells. *Toxicology* 461, 152924.

Jensen, K. M., Kahl, M. D., Makynen, E. A., Korte, J. J., Leino, R. L., Butterworth, B. C., Ankley, G. T. (2004) Characterization of responses to the antiandrogen flutamide in a short-term reproduction assay with the fathead minnow. *Aquat. Toxicol.* 70: 99-110.

Kim H., Ji K. (2022) Effects of Tetramethyl Bisphenol F on Thyroid and Growth Hormone-Related Endocrine Systems in Zebrafish Larvae. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 237, 113516. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113516>

Kim, H. M., Lee, S. M., Choi, J., Soung, N. K., Heo, J. D. (2021) Effects of Bisphenol A and Its Alternatives, Bisphenol F and Tetramethyl Bisphenol F on Osteoclast Differentiation. *Molecules* Oct. 26(20): 6100. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8539477/>

Lee, S., Kim, C., Shin, H., Kho, Y., Choi, K., (2019) Comparison of Thyroid Hormone Disruption Potentials by Bisphenols A, S, F, and Z in Embryo-larval Zebrafish. *Chemosphere* 221, 115–123. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.019>

Maffini, M. V., Canatsey, R. D. (2020) An expanded toxicological profile of tetramethyl bisphenol F (TMBPF), a precursor for a new food-contact metal packaging coating. *Food Chem. Toxicol.* Jan; 135.

OECD (1998) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Test Guideline (TG 212) Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-fry Stages. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264070141-en>

OECD (2013) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Test Guideline (TG 210) Fish, Early Life-Stage Toxicity Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/20745761>

OECD (2018) Revised Guidance Document 150 on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Pages 20 & 265.

<https://doi.org/10.1787/9789264304741-en>

Rochester, J. R., Bolden, A. L. (2015) Bisphenol S and F: A Systematic Review and Comparison of the Hormonal Activity of bisphenol A Substitutes. *Environ. Health Perspect.* Jul;123(7):643-50.

Selderslaghs, I., Van Rompay, A., De Coen, W., Witters, H. (2009) Development of a Screening Assay to Identify Teratogenic and Embryotoxic Chemicals using the Zebrafish Embryo, *Reproductive Toxicology*, 28(3), 308-320.

<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2009.05.004>

Sipes, N.S., Padilla, S., Knudsen, T.B. (2011) Zebrafish as an Integrative Model for Twenty-First Century Toxicity Testing. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 93, 256–267.

Soto, A. M., Schaeberle, C., Maier, M. S., Sonnenschein, C., Maffini, M. V. (2017) Evidence of Absence: Estrogenicity Assessment of a New Food-Contact Coating and the Bisphenol Used in Its Synthesis. *Environ. Sci. Technol.* Feb 7;51(3):1718-1726.

Szafran, A. T., Stossi, F., Mancini, M. G., Walker, C. L., Mancini, M. A. (2017) Characterizing properties of non-estrogenic substituted bisphenol analogs using high throughput microscopy and image analysis. *PLoS ONE* 12(7).

US EPA. (2012) Sustainable Futures / P2 Framework Manual EPA-748-B12-001 7. Estimating Persistence, Bioaccumulation, and Toxicity Using the PBT Profiler. <https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-05/documents/07.pdf>

US EPA. (2018) Estimation Programs Interface (EPI) Suite™ for Microsoft® Windows, v 4.1, Level III Fugacity Model.

Valspar Study Report (a). 4-[(4-hydroxy-3,5-dimethylphenyl) methyl]-2,6-dimethylphenol (CASN 5384-21-4), also known as Tetramethyl Bisphenol F (TMBPF) – Assessment of Pubertal Development and Thyroid Function in Juvenile Male and Female Rats. *Unpublished Laboratory Report*. The study can be located at the following link: <https://sherwin-williams.app.box.com/s/yf7t38ohj95zfonbtoiddwgblbduw4dw/file/647416299794>

Valspar Study Report (b). 4-[(4-hydroxy-3,5-dimethylphenyl) methyl]-2,6-dimethylphenol (CASN 5384-21-4), also known as Tetramethyl Bisphenol F (TMBPF) - Amphibian Metamorphosis Assay with African Clawed Frog (*Xenopus laevis*). *Unpublished Laboratory Report*. The study can be located at the following link: <https://sherwin-williams.app.box.com/s/yf7t38ohj95zfonbtoiddwgblbduw4dw/file/647420175195>

Valspar Study Report (c). 4-[(4-hydroxy-3,5-dimethylphenyl) methyl]-2,6-dimethylphenol (CASN 5384-21-4), also known as Tetramethyl Bisphenol F (TMBPF); 90-Day Dietary Toxicity Study in Sprague Dawley Rats with a 28-Day Recovery Period. *Unpublished Laboratory Report*. The study can be located at the following link: <https://sherwin-williams.app.box.com/s/yf7t38ohj95zfonbtoiddwgblbduw4dw/file/647401528672>

Valspar Study Report (d). 4-[(4-hydroxy-3,5-dimethylphenyl) methyl]-2,6-dimethylphenol (CASN 5384-21-4), also known as Tetramethyl Bisphenol F (TMBPF) – Short-Term Reproduction Assay with Fathead Minnow (*Pimephales promelas*). *Unpublished Laboratory Report*. The study can be located at the following link: <https://sherwin-williams.app.box.com/s/yf7t38ohj95zfonbtoiddwgblbduw4dw/file/647377099397>

Valspar Study Report (e). 4-[(4-hydroxy-3,5-dimethylphenyl) methyl]-2,6-dimethylphenol (CASN 5384-21-4), also known as Tetramethyl Bisphenol F (TMBPF); Biodegradation Test. *Unpublished Laboratory Report*. The study can be located at the following link:

<https://sherwin-williams.app.box.com/s/yf7t38ohj95zfonbtojddwglbduw4dw/file/647384258104>

Valspar Study Report (f). 4-[(4-hydroxy-3,5-dimethylphenyl) methyl]-2,6-dimethylphenol (CASN 5384-21-4), also known as Tetramethyl Bisphenol F (TMBPF); Determination of the *n*-Octanol/Water Partition Coefficient Using the Generator Column. *Unpublished Laboratory Report*. The study can be located at the following link:

<https://sherwin-williams.app.box.com/s/yf7t38ohj95zfonbtojddwglbduw4dw/file/647384262904>

Yang, L., Ho, N. Y., Alshut, R., Legradi, J., Weiss, C., Reischl, M., Mikut, R., Liebel, U., Muller, F., Strahle, U. (2009) Zebrafish Embryos as Models for Embryotoxic and Teratological Effects of Chemicals. *Reprod Toxicol*, 28, 245–253.

Zhang, N., Scarsella, J. B., Hartman, T. G. (2020) Identification and Quantitation Studies of Migrants from BPA Alternative Food-Contact Metal Can Coatings. *Polymers* (Basel) Nov 29;12(12):2846.