Podstawy i Metody Oceny Środowiska Pracy 2026, nr 3(129), s. 51–81 DOI: 10.54215/PiMOSP/2.129.2026
Nadesłano: 24.11.2025 r.
Przyjęto do druku: 12.06.2026 r.
https://www.ciop.pl/pimosp_strona PRACA PRZEGLĄDOWA

D-limonen
Dokumentacja proponowanych wartości dopuszczalnych wielkości narażenia zawodowego[1,2]

D-limonene
Documentation of proposed values of occupational exposure limits (OELs)

MAGDALENA PONICKA
https://orcid.org/0009-0006-2651-1986
e-mail: magdalena.ponicka@imp.lodz.pl
prof. dr hab. JOANNA JUREWICZ
https://orcid.org/0000-0001-9645-0134

Instytut Medycyny Pracy im. prof. dr. med. Jerzego Nofera w Łodzi
Nofer Institute of Occupational Medicine, Łódź, Poland

NDS	60 mg/m^3
NDSCh	120 mg/m^3
NDSP	nie ustalono
DSB	nie ustalono
I	substancja drażniąca
Skóra	wchłanianie substancji przez skórę może być tak samo istotne, jak przy narażeniu drogą oddechową

Data zatwierdzenia przez Zespół Ekspertów: 24-26.09.2025 r.
Data zatwierdzenia przez Komisję ds. NDS i NDN: 18.06.2026 r.

Streszczenie

D-limonen jest związkiem organicznym należącym do grupy monoterpenów. Jest cieczą o charakterystycznym cytrusowym zapachu, bardzo słabo rozpuszczalną w wodzie, natomiast dobrze rozpuszczalną w tłuszczach oraz rozpuszczalnikach organicznych. D-limonen otrzymuje się ze skórek owoców cytrusowych metodą destylacji z parą wodną lub ekstrakcji z użyciem rozpuszczalników organicznych. Stanowi surowiec szeroko wykorzystywany w przemyśle kosmetycznym, spożywczym, poligraficznym oraz elektronicznym. Ze względu na zdolność rozpuszczania tłuszczów jest składnikiem profesjonalnych preparatów do czyszczenia rąk, stosowanych m.in. w warsztatach samochodowych. W warunkach narażenia zawodowego kontakt z D-limonenem może następować drogą inhalacyjną oraz przez skórę. D-limonen został zaklasyfikowany jako substancja działająca drażniąco i uczulająco na skórę oraz stwarzająca zagrożenie związane z aspiracją. Wyniki badań wskazują na stosunkowo niską toksyczność ostrą D-limonenu. Przewlekłe podawanie D-limonenu drogą pokarmową powodowało u szczurów obu płci powiększenie wątroby, natomiast u samców rozwój nefropatii związanej z odkładaniem α2μ-globuliny. U psów rasy Beagle również stwierdzono zmiany w nerkach, jednak nie miały one charakteru nefropatii α2μ-globulinowej. U pracowników narażonych zawodowo na D-limonen opisywano przypadki podrażnienia skóry oraz alergicznego kontaktowego zapalenia skóry. Dostępne dane nie wskazują na działanie rakotwórcze,

[1] Wartość NDS D-limonenu została w dniu 18.06.2026 r. przyjęta na 114. posiedzeniu Międzyresortowej Komisji ds. Najwyższych Dopuszczalnych Stężeń i Natężeń Czynników Szkodliwych dla Zdrowia w Środowisku Pracy i następnie została przedłożona ministrowi właściwemu ds. pracy (wniosek nr 130) w celu jej wprowadzenia do rozporządzenia w załączniku nr 1 w części A wykazu najwyższych dopuszczalnych stężeń i natężeń czynników szkodliwych w środowisku pracy.

[2] Zrealizowano na podstawie wyników VI etapu programu wieloletniego pn. „Rządowy Program Poprawy Bezpieczeństwa i Warunków Pracy", finansowanego w zakresie badań naukowych i prac rozwojowych ze środków Narodowego Centrum Badań i Rozwoju. Projekt nr III PN.04 pt.: „Opracowanie dokumentacji dopuszczalnych poziomów narażenia zawodowego dla 30 czynników chemicznych szkodliwych dla zdrowia, w tym rakotwórczych". Koordynator programu: Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy.

mutagenne ani reprotoksyczne D-limonenu u ludzi. Zmiany nowotworowe związane z mechanizmem zależnym od α2μ-globuliny obserwowano wyłącznie u samców szczurów i nie są one uznawane za istotne z punktu widzenia oceny ryzyka dla ludzi. Za skutek krytyczny działania D-limonenu uznano podrażnienie sensoryczne górnych dróg oddechowych. Uwzględniono również działanie hepatotoksyczne i nefrotoksyczne obserwowane w badaniach na zwierzętach. Na podstawie wyników przeprowadzonych obliczeń oraz analizy obowiązujących wartości normatywów higienicznych w innych krajach zaproponowano przyjęcie wartości NDS na poziomie 60 mg/m³ oraz wartości NDSCh wynoszącej 120 mg/m³. Ze względu na możliwość wchłaniania D-limonenu przez skórę zaproponowano oznaczenie substancji notacją „skóra" oraz adnotacją „I", wskazującą na jej działanie drażniące. Zakres tematyczny artykułu obejmuje zagadnienia związane ze zdrowiem oraz bezpieczeństwem i higieną pracy, będące przedmiotem badań w obszarze nauk o zdrowiu oraz inżynierii środowiska.

Słowa kluczowe: *D*-limonen, narażenie zawodowe, najwyższe dopuszczalne stężenie (NDS), środowisko pracy, podrażnienie sensoryczne, alergia kontaktowa.

Abstract

D-limonene is an organic compound belonging to the monoterpene group. It is a liquid with a characteristic citrus odour, sparingly soluble in water but easily soluble in fats and organic solvents. D-limonene is obtained from citrus peels by steam distillation or solvent extraction. It is widely used in the cosmetic, food, printing and electronics industries. Owing to its excellent fat-dissolving properties, it is a component of professional hand-cleaning products used, among others, in automotive workshops. Occupational exposure to D-limonene may occur by inhalation and through dermal contact. D-limonene is classified as a skin irritant, skin sensitiser and aspiration hazard. Research findings indicate that D-limonene has relatively low acute toxicity. Repeated oral administration in rats resulted in liver enlargement in both sexes and α2μ-globulin-associated nephropathy in males. Renal changes were also observed in Beagle dogs; however, these were not characteristic of α2μ-globulin nephropathy. Cases of skin irritation and allergic contact dermatitis have been reported in workers occupationally exposed to D-limonene. The available evidence does not indicate carcinogenic, mutagenic or reproductive toxicity in humans. Neoplastic lesions associated with the α2μ-globulin mechanism have been observed only in male rats and are not considered relevant to human health risk assessment. Sensory irritation of the upper respiratory tract was identified as the critical effect of D-limonene exposure. Hepatotoxic and nephrotoxic effects observed in animal studies were also taken into consideration. Based on the calculations performed and an analysis of the occupational exposure limits established in other countries, an occupational exposure limit (OEL) of 60 mg/m³ and a short-term exposure limit (STEL) of 120 mg/m³ were proposed. Owing to the potential for dermal absorption, assignment of the "skin" notation and the "I" notation (irritant substance) was also recommended. The scope of the article covers issues related to health and occupational safety and hygiene, which are the subject of research in the fields of health sciences and environmental engineering.

Keywords: D-limonene, occupational exposure, occupational exposure limit (OEL), working environment, sensory irritation, allergic contact dermatitis.

Adres do korespondencji/Contact details: Magdalena Ponicka, Instytut Medycyny Pracy im. prof. dr. med. Jerzego Nofera, 91-348 Łódź, ul. Świętej Teresy od Dzieciątka Jezus 8, e-mail: magdalena.ponicka@imp.lodz.pl

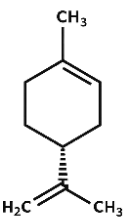
CHARAKTERYSTYKA SUBSTANCJI, ZASTOSOWANIE, NARAŻENIE ZAWODOWE

Ogólna charakterystyka substancji

D-limonen jest związkiem organicznym należącym do grupy monoterpenów.

Ogólna charakterystyka D-limonenu:

- nazwa chemiczna (R)-*p*-menta-1,8-dien
- wzór sumaryczny $C_{10}H_{16}$
- wzór strukturalny



- masa cząsteczkowa 136,23 g/mol
- numer CAS 5989-27-5
- numer WE 227-813-5
- numer indeksowy 601-096-00-2

– synonimy: D-limonene; (+)-Limonene; (R)-(+)-Limonene; (R)-(+)-para-mentha-1,8-diene; (+)-Dipentene; (R)-4-isopropenyl-1-methyl-1-cyclohexene

nazwy handlowe: D-limonen; D-limonene; Orange Terpenes; Aceite de limoneno de naranja; Citrus Terpenes; CLEARON M105; Piccolyte C115; YS RESIN PX1150

– nazwa wg IUPAC (4R)-1-methyl-4-(prop-1-en-2-yl)cyclohex-1-ene (ECHA 2023).

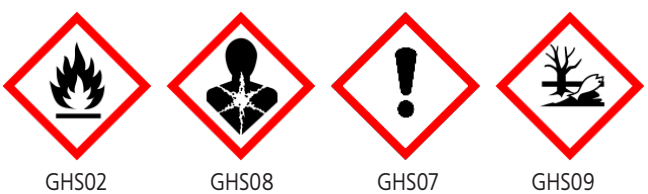
Zgodnie z rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmieniającym i uchylającym dyrektywy 67/548/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniającym rozporządzenie (WE) nr 1907/2006 (Dz. Urz. UE L 353 z 31.12.2008, ze zm.), D-limonen posiada zharmonizowaną klasyfikację zgodnie z tabelą 3 załącznika VI do tego rozporządzenia. Zharmonizowaną klasyfikację i oznakowanie D-limonenu, zgodnie z tabelą 3 załącznika VI do rozporządzenia (WE) nr 1272/2008, przedstawiono w tabeli 1 oraz na rycinie 1.

Tabela 1. Zharmonizowana klasyfikacja oraz oznakowanie D-limonenu zgodnie z rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008
Table 1. Harmonised classification and labelling of D-limonene according to Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council

Nazwa chemiczna	Klasyfikacja		Oznakowanie	
	klasa zagrożenia i kody kategorii	kody zwrotów wskazujących rodzaj zagrożenia	piktogramy, kody haseł ostrzegawczych	kody zwrotów wskazujących rodzaj zagrożenia
(R)-*p*-menta-1,8-dien; D-limonen	Flam. Liq. 3	H226	GHS02	H226
	Skin Irrit. 2	H315	GHS07	H315
	Skin Sens. 1B	H317	GHS08	H317
	Asp. Tox. 1	H304	GHS09	H304
	Aquatic Acute 1	H400	Dgr	H410
	Aquatic Chronic 3	H412		

Objaśnienia:

Flam Liq. 3	Substancja ciekła łatwopalna, kategoria zagrożenia 3.
H226	Łatwopalna ciecz i pary.
Skin Irrit. 2	Działanie drażniące na skórę, kategoria zagrożenia 2.
H315	Działa drażniąco na skórę.
Skin Sens. 1B	Działanie uczulające na skórę, kategoria zagrożenia 1B.
H317	Może powodować reakcję alergiczną skóry.
Asp. Tox. 1	Zagrożenie spowodowane aspiracją, kategoria zagrożenia 1.
H304	Połknięcie i dostanie się przez drogi oddechowe może grozić śmiercią.
Aquatic Acute 1	Stwarzające zagrożenie dla środowiska wodnego, kategoria zagrożenia 1.
H400	Działa bardzo toksycznie na organizmy wodne.
Aquatic Chronic 3	Stwarzające zagrożenie dla środowiska wodnego, kategoria zagrożenia 3.
H412	Działa szkodliwie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki.
Dgr	hasło ostrzegawcze „niebezpieczeństwo".



GHS02 GHS08 GHS07 GHS09

Rycina 1. Piktogramy określone w załączniku do rozporządzenia WE nr 1272/2008 (CLP) mają czarny symbol na białym tle z czerwonym obramowaniem (Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady nr 1272/2008)
Figure 1. Pictograms specified in the Annex to Regulation (EC) No 1272/2008 (CLP) consist of a black symbol on a white background with a red border (Regulation No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council)

Właściwości fizykochemiczne substancji

Właściwości fizykochemiczne D-limonenu (ECHA 2023; PubChem 2025):

- wygląd: ciecz
- kolor: bezbarwna do jasnożółtej
- zapach: cytrusowy
- temperatura wrzenia: 176°C (101 325 Pa)
- temperatura topnienia: -74°C (101 325 Pa)
- temperatura zapłonu: 51°C (101 325 Pa)
- temperatura samozapłonu: 245°C (101 325 Pa)
- gęstość (w temp. 20°C): 0,844 g/cm^3
- prężność par (w temp. 25°C): 2 hPa
- współczynnik podziału oktanol/woda (log Kow) (w temp. 25°C): 4,38
- rozpuszczalność w wodzie (w temp. 25°C): 5,59 mg/L
- lepkość dynamiczna (w temp. 25°C): 0,846 mPa · s
- współczynnik załamania światła (w temp. 25°C): 1,472
- współczynniki przeliczeniowe: 1 ppm ≈ 5,653 mg/m^3; 1 mg/m^3 ≈ 0,177 ppm (20°C, 101,3 kPa) (SCOEL 2017).

Otrzymywanie, zastosowanie i narażenie zawodowe

Otrzymywanie

D-limonen występuje w ponad 300 gatunkach roślin na całym świecie. Jest, obok α-pinenu, jednym z najbardziej rozpowszechnionych terpenów występujących w przyrodzie. Stanowi główny składnik olejków eterycznych otrzymywanych ze skórek owoców cytrusowych, przede wszystkim pomarańczy, ale także grejpfrutów, cytryn i mandarynek. Ponadto D-limonen występuje m.in w olejku pozyskiwanych z kminku i selera (*Ravichandran* i in. 2018; *Trytek* i in. 2003).

Na skalę przemysłową D-limonen otrzymywany jest głównie ze skórek pomarańczy, stanowiących produkt odpadowy przemysłu przetwórstwa owocowego. Zawartość D-limonenu w olejku pomarańczowym jest bardzo wysoka i wynosi około 95 ÷ 97%. Do głównych metod pozyskiwania D-limonenu ze skórek cytrusów należą: destylacja z parą wodną, ekstrakcja rozpuszczalnikami oraz tłoczenie na zimno (*Gawarecka* i in. 2015; *Ravichandran* 2018).

D-limonen został po raz pierwszy pozyskany na skalę przemysłową na Florydzie w sezonie cytrusowym 1941–1942, z kondensatu pary wodnej powstającego podczas produkcji melasy cytrusowej (*Ravichandran* i in. 2018).

Znane są również inne, mniej konwencjonalne metody otrzymywania D-limonenu, takie jak piroliza zużytych opon samochodowych. D-limonen powstaje w wyniku termicznego rozkładu poliizoprenu w temperaturze ok. 440 ÷ 510°C oraz przy obniżonym ciśnieniu ok. 20 kPa (*Gawrecka* i in 2015; *Malko, Wróblewska* 2016; *Pakdel* i in. 2001).

D-limonen może być również otrzymywany metodami biotechnologicznymi. Głównymi mikroorganizmami, wykazującymi zdolność do biosyntezy limonenu są *Escherichia coli* oraz *Saccharomyces cerevisiae* (*Alonso-Gutierrez* i in. 2013; *Jongedijk* i in. 2016; *Ravichandran* i in. 2018). Mikrobiologiczna produkcja D-limonenu jest możliwa z wykorzystaniem szerokiej gamy surowców stosowanych do wytwarzania biomasy, nie tylko odpadów pochodzących z przemysłu cytrusowego (*Jongedijk* i in. 2016). Dostępność odnawialnych surowców oraz postęp w dziedzinie inżynierii genetycznej sprawiają, że mikrobiologiczne metody produkcji D-limonenu stanowią potencjalną alternatywę dla obecnie stosowanych technologii. Metody te pozostają jednak nadal na etapie badań laboratoryjnych (*Sun* i in 2020).

Do największych producentów D-limonenu należą m.in. Stany Zjednoczone (głównie Floryda i Kalifornia), Brazylia, Indie, Japonia, Australia, Hiszpania, Holandia, Wielka Brytania (*Juyal* 2024; WHO 1998). Według raportu WHO z 1998 r. światowa roczna produkcja D-limonenu i olejku pomarańczowego (oleju esencjonalnego zawierającego ok. 95% D-limonenu) w 1991 roku wynosiła ok. 45 tys. ton (Florida Chemical Co. 1991; WHO 1998).

Zastosowanie

D-limonen, ze względu na przyjemny cytrusowy zapach, jest szeroko wykorzystywany w przemyśle kosmetycznym i perfumeryjnym oraz jako substancja aromatyzująca w żywności i napojach (Danish Ministry... 2013). D-limonen został uznany za substancję bezpieczną (GRAS, ang. *Generally*

Recognized As Safe) przez Amerykańskie Stowarzyszenie Producentów Aromatów i Ekstraktów (FEMA, ang. *Flavor and Extract Manufactures Association*), (*Adams* i in. 2011) oraz dopuszczony do stosowania przez Agencję Żywności i Leków Stanów Zjednoczonych (FDA 2011).

W przemyśle kosmetycznym D-limonen jest składnikiem m.in. perfum, mydeł, dezodorantów i innych środków higieny osobistej (*Kim* i in. 2013; Danish Ministry... 2013; *Ravichandran* i in. 2018). Badania produktów zapachowych przeprowadzone w Niderlandach wykazały obecność D-limonenu w 71% spośród 300 testowanych kosmetyków (*de Groot, Frosch* 1997; *Kim* i in. 2013). Z kolei badania produktów kosmetycznych przeprowadzone we Francji wykazały, że spośród 280 rodzajów perfum i 150 dezodorantów D-limonen występował odpowiednio w 95% perfum i 69% dezodorantów (*Dornic* i in. 2018).

D-limonen jest również obecny w produktach stosowanych w gospodarstwie domowym, takich jak detergenty do prania, odświeżacze powietrza, płyny do mycia naczyń oraz preparaty do czyszczenia różnych powierzchni, np. podłóg (*Ravichandran* i in. 2018). Według raportu WHO, na podstawie danych zgromadzonych przez Szwedzki Inspektorat Chemiczny, w Szwecji w 1994 r. zastosowano od 69 do 80 ton D-limonenu w 48 produktach, w tym w 15 produktach przeznaczonych dla konsumentów (WHO 1998).

D-limonen jest doskonałym rozpuszczalnikiem i stanowi alternatywę dla węglowodorów chlorowanych, węglowodorów chlorofluorowych (CFC, ang. *chlorofluorocarbons*) oraz innych rozpuszczalników organicznych. W stężeniach od 30% do 100% może być stosowany do odtłuszczania metali przed malowaniem, a także jako środek odtłuszczający i czyszczący w przemyśle drukarskim i elektronicznym oraz jako rozpuszczalnik w farbach. (Danish Ministry… 2013; IARC 1993; *Karlberg, Lindell* 1993; *Malko, Wróblewska* 2016; *Ravichandran* i in. 2018).

Pod koniec lat 90. XX wieku rozpoczęto stosowanie D-limonenu do usuwania wycieków ropy naftowej na lądzie w celu rozpuszczenia bardziej opornych frakcji ropy oraz zwiększenia ich dostępności do degradacji bakteryjnej (bioremediacji). Związek ten wykorzystywano również jako środek odtłuszczający do czyszczenia kadłubów łodzi. Podczas awarii platformy wiertniczej Deepwater Horizon w Zatoce Meksykańskiej w 2010 r., w wyniku której doszło do rozległego wycieku ropy naftowej, D-limonen stosowano jako środek wspomagający procesy bioremediacji (*Pagliaro* i in. 2023).

D-limonen jest ponadto wykorzystywany w produkcji żywic, jako środek zwilżający i dyspergujący, a także pomocniczo jako biocyd w zwalczaniu kontroli owadów (Danish Ministry... 2013; IARC 1993; IARC 1999; *Karlberg, Lindell* 1993; NTP 1990).

W zastosowaniach medycznych D-limonen był stosowany do rozpuszczania zalegających po zabiegach chirurgicznych kamieni żółciowych zawierających cholesterol, ze względu na zdolność do rozpuszczania cholesterolu (IARC 1993; *Kim* i in 2013; *Malko, Wróblewska* 2016).

D-limonen oraz jego metabolit – alkohol perylowy – znajdują się obecnie w fazie badań klinicznych dotyczących możliwości zastosowania w leczeniu raka piersi i innych nowotworów. Rozważane są również badania nad potencjalnym wykorzystaniem tych związków w chemoprewencji (*Gould* 1995; *O'Shaughnessy* 1996; *Vigushin* in. 1998; *Malko, Wróblewska* 2016).

Narażenie zawodowe

Według danych Europejskiej Agencji Chemikaliów (ECHA) D-limonen jest zarejestrowany w ilości 1 000 ÷ 10 000 ton rocznie. W Europie zarejestrowano 62 dostawców D-limonenu, w tym dwa podmioty z Polski: 3M Wrocław Sp. z.o.o. oraz FSZ POLLENA AROMA Sp. z o.o. (ECHA 2023).

Zgodnie z danymi WHO (1998), w Stanach Zjednoczonych w 1983 r. liczba zakładów przemysłowych zajmujących się produkcją D-limonenu wynosiła 87, a szacowana liczba pracowników narażonych na działanie tego związku wynosiła 140 000.

Ponieważ D-limonen nie miał dotychczas ustalonej wartości normatywu higienicznego w Polsce, brak jest danych Głównego Inspektoratu Sanitarnego (GIS) dotyczących liczby pracowników narażonych na działanie tej substancji. Według danych GIS jedna ze stacji sanitarno-epidemiologicznych w ramach działalności laboratoryjnej przeprowadziła w latach 2023–2024 pomiary stężeń D-limonenu. Pomiary przeprowadzono w zakładach pracy należących do PKD 27.2 – produkcja baterii i akumulatorów oraz PKD 85.3 – szkoły ponadpodstawowe i placówki kształcenia policealnego. Analizy przeprowadzono techniką GC/MS (chromatografia gazowa). Ze względu na brak ustalonego normatywu higienicznego nie było możliwe określenie, czy zmierzone stężenia substancji były dopuszczalne w środowisku pracy (GIS 2025).

Narażenie zawodowe na D-limonen występuje przede wszystkim podczas jego produkcji, a także w trakcie przepakowywania lub formulacji mieszanin zawierających tę substancję. Inne potencjalne źródła narażenia obejmują transport i magazynowanie substancji chemicznej oraz utylizację skażonych pojemników. Narażenie może również wystąpić podczas użytkowania wyrobów zawierających D-limonen, takich jak kosmetyki i detergenty (ECHA 2023; NICNAS 2002).

Na działanie D-limonenu mogą być narażeni pracownicy:

- przemysłu kosmetycznego oraz chemicznego, w którym D-limonen jest stosowany jako składnik kompozycji zapachowych, m.in. w kosmetykach, detergentach i środkach czystości,
- salonów kosmetycznych i gabinetów pielęgnacyjnych, w których stosowane są preparaty zawierające D-limonen jako składnik zapachowy,
- przemysłu spożywczego, w którym D-limonen jest wykorzystywany jako substancja aromatyzująca,
- przemysłu poligraficznego i farbiarskiego, w którym D-limonen jest stosowany jako rozpuszczalnik,
- przemysłu elektronicznego, w którym D-limonen jest składnikiem profesjonalnych środków czyszczących,
- firm świadczących usługi sprzątania, stosujących środki czyszczące zawierające D-limonen,
- warsztatów samochodowych oraz zakładów produkcyjnych, w których stosowane są profesjonalne preparaty do mycia rąk zawierające D-limonen,
- laboratoriów i instytutów badawczych, w których D-limonen jest wykorzystywany do celów badawczych i analitycznych,
- rolnicy oraz pracownicy sezonowi zatrudnieni przy zbiorach owoców cytrusowych (ECHA 2023; *Kim* i in 2013; NICNAS 2002; *Pesosen* i in. 2014; *Topham, Wakelin* 2003).

Głównymi drogami narażenia na D-limonen są narażenie skórne oraz inhalacyjnie. Narażenie drogą doustną na D-limonen w środowisku pracy jest mało prawdopodobne i może wystąpić głównie w wyniku nieprzestrzegania podstawowych zasad higieny na stanowisku pracy (NICNAS 2002). Kontakt skóry z D-limonenem występuje najczęściej podczas różnego rodzaju operacji manualnych związanych z produkcją tego związku i wyrobów go zawierających, a także podczas bezpośredniego stosowania na skórę wyrobów gotowych zawierających tę substancję (NICNAS 2002). Szczególnie narażeni na działanie D-limonenu są m.in. mechanicy samochodowi, malarze, pracownicy utrzymania ruchu oraz monterzy pojazdów, którzy wykonują tzw. prace brudne i stosują do mycia rąk profesjonalne preparaty, najczęściej w postaci past lub emulsji, zawierające D-limonen jako składnik rozpuszczający tłuszcze (*Pesonen* i in. 2014; *Topham, Wakelin* 2003). Narażenie drogą inhalacyjną może wystąpić podczas stosowania D-limonenu lub produktów zawierających tę substancję w zamkniętych lub ograniczonych przestrzeniach, w warunkach słabej wentylacji, podczas procesów obejmujących mieszanie na gorąco lub szybkie mieszanie mechaniczne, a także w przypadku rozpylania preparatów zawierających D-limonen na powierzchnie (NICNAS 2002).

Narażenie populacji ogólnej

Ekspozycja populacji ogólnej na D-limonen związana jest głównie ze stosowaniem kosmetyków oraz środków czyszczących, w których związek ten pełni rolę substancji zapachowej. D-limonen może być również spożywany przez ogół społeczeństwa, ponieważ jest stosowany jako substancja aromatyzująca w niektórych produktów spożywczych, takich jak napoje, słodycze i inne wyroby spożywcze. Narażenie na D-limonen może wystąpić także podczas stosowania niektórych preparatów biobójczych (*Kim* i in. 2013).

Badania stężeń D-limonenu w powietrzu atmosferycznym na obszarach miejskich, przeprowadzone w latach 1973–1990 w Europie, Stanach Zjednoczonych i Rosji, wskazały obecność tego związku na poziomie od 0,1 ppb do 2 ppb (0,6 ÷ 11,1 μg/m^3), (*Kim* i in. 2013; *Wallace* i in. 1991).

DZIAŁANIE TOKSYCZNE U LUDZI

Działanie ostre i krótkoterminowe

D-limonen wykazuje niską toksyczność po podaniu doustnym. Skutki działania D-limonenu po podaniu drogą doustną opisali japońscy naukowcy

w kontekście medycznego zastosowania tego związku do rozpuszczania kamieni żółciowych. Badaniu poddano 5 mężczyzn, którzy połknęli kapsułkę zawierającą 20 g D-limonenu. U wszystkich uczestników badania wystąpiła biegunka. Badania czynnościowe wątroby, nerek i trzustki oraz analiza moczu wykazały jedynie przejściowy, łagodnie nasilony białkomocz (*Igimi* i in. 1976).

W badaniu opisanym przez *Crowella* i in (1994) 7 osób spożyło jednorazowo D-limonen dodany do kremu budyniowego w dawce 100 mg/kg mc. Po tygodniowym okresie obserwacji nie stwierdzono u badanych żadnych objawów toksycznego działania związku (*Crowell* i in. 1994).

Skutki jednorazowego narażenia inhalacyjnego na wysokie stężenia D-limonenu u ludzi opisali *Falk-Filipsson* i in. (1993). W badaniu 8 zdrowych ochotników poddano 2-godzinnej ekspozycji na D-limonen w stężeniach: 10 mg/m^3; 225 mg/m^3 oraz 450 mg/m^3. Jako stężenie kontrolne przyjęto 10 mg/m^3 – poziom, przy którym uczestnicy byli w stanie wyczuć zapach rozpuszczalnika. Po narażeniu na najwyższe stężenie D-limonenu (450 mg/m^3) stwierdzono statystycznie istotne zmniejszenie pojemności życiowej płuc w porównaniu z wartością uzyskaną po ekspozycji na stężenie 10 mg/m^3 ($p < 0,01$). Zmniejszenie pojemności życiowej płuc wynosiło około 20%. Po ekspozycji na stężenie 225 mg/m^3 nie stwierdzono zmian parametrów czynnościowych płuc. U żadnego z uczestników badania nie zaobserwowano objawów podrażnienia ani objawów ze strony ośrodkowego układu nerwowego (*Falk-Filipsson* i in. 1993; MAK 2006; NICNAS 2002).

W publikacji *Larsena* i in. (2000) porównywano podrażnienie sensoryczne wywołane przez D-limonen u ludzi i myszy. W przeprowadzonym badaniu z zastosowaniem komory inhalacyjnej u ludzi nie stwierdzono podrażnienia zmysłowego przy stężeniu 81 ppm D-limonenu (458 mg/m^3). Oceniono, że podrażnienie zmysłowe u ludzi może wystąpić podczas wdychania powietrza znad czystego D-limonenu, którego nasycone stężenie par wynosi ok. 2000 ppm (11306 mg/m^3).

D-limonen wykazuje działanie drażniące na skórę i oczy. Działanie D-limonenu na skórę opisano w publikacji *York* i in. (1995). Badacze oceniali cztery systemy testów płatkowych z udziałem ochotników. D-limonen o jakości perfumeryjnej wywoływał silne reakcje skórne we wszystkich typach testów już po 10 ÷ 15 min ekspozycji. Podrażnienie skóry oceniano przed aplikacją plastra oraz bezpośrednio po jego usunięciu, a także po 1 h, 24 h, 48 h i 72 h. Bezpośrednio po usunięciu plastra obserwowano subiektywne objawy podrażnienia skóry, takie jak pieczenie, szczypanie i świąd, a także reakcje pokrzywkowe. Podrażnienie skóry utrzymywało się przez 24 h, a u wielu ochotników również po 48 h i 72 h (*Kim* i in. 2013; NICNAS 2002).

Dwugodzinny kontakt skóry z D-limonenem o stężeniu 98% wywołał u badanej osoby ból, świąd, uczucie pieczenia oraz utrzymującą się przez dłuższy czas purpurową wysypkę (*Falk* i in. 1991).

Działanie drażniące D-limonenu na oczy oceniano w 2-minutowym badaniu z udziałem 12 ochotników. Badanie wykazało, że próg wywołujący podrażnienie oczu dla D-limonenu wynosił ok. 1700 ÷ 3400 mg/m^3 (300 ÷ 600 ppm), (*Mølhave* i in. 2000).

Działanie przewlekłe (narażenie zawodowe)

W literaturze opisano przypadki występowania podrażnienia skóry oraz alergii kontaktowej związanych z zawodowym narażeniem na D-limonen.

Naukowcy z Fińskiego Instytutu Zdrowia Zawodowego przeprowadzili w latach 2008–2013 badania dermatologiczne w grupie 511 pacjentów narażonych na działanie D-limonenu (*Pesonen* i in. 2014). U badanej grupy pacjentów przeprowadzano testy płatkowe, które stanowią podstawową metodę diagnostyki alergii kontaktowej. Testy przeprowadzono zgodnie z rekomendacjami ICDRG (ang. *International Contact Dermatitis Research Group*; Międzynarodowa Grupa Badawcza ds. Kontaktowego Zapalenia Skóry), z zastosowaniem metody Finn Chamber. Do badań wykorzystano własnoręcznie przygotowany preparat utlenionego D-limonenu. Preparat otrzymano poprzez ekspozycję 50 ml D-limonenu na działanie powietrza w temperaturze pokojowej przez 10 tygodni. W tym czasie preparat mieszano cztery razy dziennie, każdorazowo przez 1 h. Co tydzień przygotowywano kolejne porcje preparatu przeznaczonego do testów. Analizy wykazały, że przygotowane preparaty zawierały ok. 25 ÷ 35% czystego D-limonenu oraz silnie uczulające produkty jego utleniania, takie jak tlenki limonenu, karweole, karwony i wodoronadtlenki limonenu. Preparat nanoszono w odpowiednich rozcieńczeniach (5%, 3%, 1% i 0,3%) na podłoże parafinowe (wazelinę). Po jednorazowej aplikacji testów płatkowych wyniki

oceniano dwu- lub trzykrotnie (w dniu 2., 3. i 4. lub w dniu 2., 3. i 6., albo w 2. i 5. dniu), w zależności od dnia tygodnia, w którym aplikowano testy płatkowe.

Dodatni wynik testu płatkowego, wskazujący na wystąpienie alergicznej reakcji skórnej na utleniony D-limonen, uzyskano u 21 spośród 511 badanych osób, co stanowiło około 4% analizowanej grupy. U 9 osób wystąpiły bardzo silne reakcje alergiczne, u 6 osób – silne reakcje alergiczne, natomiast u pozostałych 6 osób – słabe reakcje alergiczne.

U 14 pacjentów spośród grupy 21 osób uczulonych na D-limonen zdiagnozowano zawodowe kontaktowe zapalenie skóry wywołane przez ten związek. Naukowcy z Fińskiego Instytutu Zdrowia Zawodowego szczegółowo przeanalizowali grupę 14 pacjentów w celu identyfikacji źródeł zawodowego narażenia na D-limonen, który jest powszechnie stosowany jako substancja zapachowa oraz rozpuszczalnik w produktach czyszczących i kosmetykach (*Pesonen* i in. 2014).

W tabeli 2 przedstawiono wyniki testów płatkowych przeprowadzonych u pacjentów ze stwierdzonym zawodowym kontaktowym zapaleniem skóry wywołanym D-limonenem. Porównano reakcje pacjentów na preparaty utlenionego D-limonenu oraz na nieutleniony D-limonen. Wymieniono również preparaty zawierające D-limonen, na które byli narażeni pracownicy uczestniczący w badaniu, oraz wskazano produkty zawierające D-limonen stosowane w gospodarstwach domowych.

U wszystkich 5 spośród 14 pacjentów, którym zaaplikowano na skórę utleniony D-limonen o stężeniu 5%, wystąpiła reakcja alergiczna (u 4 osób była ona bardzo silna). Ze względu na silne działanie drażniące utlenionego D-limonenu o stężeniu 5% w latach 2012–2013 zrezygnowano ze stosowania tak wysokiego stężenia i aplikowano pacjentom utleniony D-limonen w stężeniu 3% lub niższym.

U 12 spośród 14 pacjentów, którym podano utleniony D-limonen o stężeniu 3%, wystąpiła bardzo silna lub silna reakcja alergiczna. Po aplikacji utlenionego D-limonenu w najniższym zastosowanym stężeniu (0,3%) bardzo silną reakcję alergiczną stwierdzono jedynie u 1 pacjenta z 9 badanych pacjentów (nr 13), natomiast u 1 pacjenta (nr 14) odnotowano silną reakcję alergiczną.

Dla porównania, spośród 8 pacjentów testowanych na działanie D-limonenu w postaci nieutlenionej, tylko u 1 pacjenta wystąpiła silna reakcja alergiczna (nr 14). Był to pracownik zatrudniony jako technik serwisu.

Badania wykazały, że czysty (nieutleniony) D-limonen jest znacznie słabszym sensybilizatorem w porównaniu z jego utlenioną formą. Spośród 8 pacjentów z pozytywną reakcją na utleniony D-limonen, tylko 1 pacjent wykazał dodatnią reakcję na nieutleniony D-limonen.

Wyniki badań płatkowych wykazały, że alergia na D-limonen najczęściej była związana z narażeniem na detergenty do czyszczenia maszyn, środki do mycia rąk, płyny do mycia naczyń oraz produkty kosmetyczne stosowane w pracy.

Wielu pracowników, u których stwierdzono alergię lub podrażnienie skóry, stosowało ten sam profesjonalny preparat do mycia rąk – Loctite™ 7850 w postaci ściernej emulsji zawierający D-limonen w stężeniu minimum 2,5% (*Pesonen* i in. 2014; *Topham, Wakelin* 2003).

Topharm i *Wakelin* (2003) opisali przypadek 30-letniego malarza i dekoratora wnętrz, u którego stwierdzono kontaktowe zapalenie skóry wywołane przez D-limonen obecny w stosowanych przez niego środkach do czyszczenia rąk. Mężczyzna od 4 lat cierpiał na egzemę rąk, która nasilała się podczas pracy. W wywiadzie stwierdzono również atopową egzemę w przeszłości, jednak wcześniejsze testy płatkowe z europejską serią standardową były ujemne.

Testy płatkowe powtórzono z zastosowaniem rozszerzonej brytyjskiej serii standardowej, 2% preparatu D-limonenu w wazelinie (Trolab[1], Hermal, Reinbeck, Niemcy) oraz serii dotyczącej tworzyw sztucznych i klejów (Chemotechnique Diagnostics, Malmö, Szwecja). Odczyty w dniach D3 i D4 wykazały silną reakcję dodatnią (++) na D-limonen. Stwierdzono również słabszą reakcję alergiczną (+) na alkohol lanolinowy (30% w wazelinie). Dalszy wywiad wykazał, że mężczyzna stosował w pracy bezwodne ręczniki do czyszczenia rąk Scrubs-in-a-bucket® oraz Swarfega orange®, zawierające D-limonen w stężeniach odpowiednio 7% i 1%. Zaprzestanie stosowania wymienionych produktów doprowadziło do poprawy stanu zdrowia, jednak nie do całkowitego ustąpienia egzemy rąk.

Autorzy ww. publikacji opisali również badanie przeprowadzone przez Oddział Dermatologii Szpitala św. Marii w Londynie na grupie 2273 pacjentów. W badaniach zastosowano testy płatkowe, w których pacjentom aplikowano

Tabela 2. Wyniki testów płatkowych u 14 pacjentów z zawodowym alergicznym kontaktowym zapaleniem skóry wywołanym D-limonenem (*Pesonen* i in. 2014)
Table 2. Results of patch tests in 14 patients with occupational allergic contact dermatitis caused by D-limonene (*Pesonen* et al. 2014)

Numer pacjenta, zawód (rok badania)	Reakcja na utleniony D-limonen w wazelinie				Reakcja na nieutleniony D-limonen 10% w wazelinie	Produkty zawierające D-limonen (narażenie zawodowe)
	5%	3%	1%	0,3%		
1 Drukarz (2008)	+++	+++	NT	NT	NT	detergent do czyszczenia maszyn (zawierający 3 ÷ 7% D-limonenu)
2 Drukarz (2008)	++	++	NT	NT	NT	detergenty do czyszczenia maszyn (zawierające D-limonen w stężeniach: 0,08, 0,26, 0,47, 0,60%); preparaty do mycia rąk (Loctite™ 7850 zawierający 2,5 ÷ 7,5% D-limonenu, preparat zawierający 0,24% D-limonenu)
3 Sprzątacz (2010)	+++	+++	NT	NT	p	preparaty do czyszczenia oraz kremy do rąk
4 Konserwator maszyn budowlanych (2010)	+++	+++	NT	NT	NT	preparat do mycia rąk (Loctite™ 7850 zawierający 2,5 ÷ 7,5% D-limonenu); olej do obróbki metali zawierający 0,005% D-limonenu; detergenty do czyszczenia maszyn zawierające 0,00023% lub 0,1% D-limonenu
5 Monter pojazdów (2010)	+++	+++	NT	NT	–	preparat do mycia rąk (Loctite™ 7850 zawierający 2,5 ÷ 7,5% D-limonenu); preparat do mycia rąk zawierający 5 ÷ 10% D-limonenu; preparat do mycia rąk zawierający <2,5% D-limonenu
6 Masażysta (2012)	NT	+++	++	+	–	płyn do podłóg, spray do czyszczenia powierzchni, płyn do czyszczenia powierzchni, płyn do mycia naczyń
7 Kucharz (2012)	NT	+++	++	+?	NT	płyn do mycia naczyń, płyn do czyszczenia powierzchni, płyn do rąk
8 Piekarz, kucharz (2012)	NT	++	++	–	–	płyn do czyszczenia powierzchni, płyn do mycia naczyń
9 Kucharz (2012)	NT	+?	+?	–	NT	płyn do mycia naczyń
10 Kosmetyczka (2012)	NT	+	–	–	–	różne kremy, płyny do oczyszczania skóry i inne produkty kosmetyczne stosowane w salonach piękności
11 Pracownik budowlany (2012)	NT	++	+	–	–	preparat do mycia rąk
12 Mechanik (2013)	NT	+++	++	+	–	preparat do mycia rąk (Loctite™ 7850 zawierający 2,5 ÷ 7,5% D-limonenu); inny preparat do mycia rąk
13 Fryzjerka (2013)	NT	+++	+++	+++	–	produkty do mycia i stylizacji włosów, farby do włosów, kremy do rąk
14 Technik serwisu (2013)	NT	+++	+++	++	++	preparat do mycia rąk (Loctite™ 7850 zawierający 2,5 ÷ 7,5% D-limonenu); detergent do czyszczenia maszyn zawierający 0,006% D-limonenu

Objaśnienia:
NT – nie testowano,
+++ – bardzo silna reakcja alergiczna,
++ – silna reakcja alergiczna,
+ – słaba reakcja alergiczna,
+? – wynik niejednoznaczy,
– – brak reakcji alergicznej.

utleniony D-limonen o stężeniu 3%. Preparat ten nie jest dostępny komercyjnie, a według aktualnej wiedzy wywołuje silniejsze reakcje alergiczne w porównaniu z nieutlenionym D-limonenem. Dodatni wynik testu płatkowego, świadczący o uczuleniu na utleniony D-limonen, stwierdzono u 2,8% badanych pacjentów. Większość pacjentów z alergią kontaktową na D-limonen stanowiły osoby wykonujące zawody takie jak pracownicy administracyjni, pielęgniarki i osoby prowadzące gospodarstwo domowe. W przypadku pielęgniarek ekspozycja mogła mieć charakter zawodowy i wynikać z częstego mycia rąk. U pozostałych osób przypuszczano, że narażenie nastąpiło w warunkach domowych, np. w wyniku kontaktu z olejem ze skórek owoców cytrusowych lub substancjami zapachowymi obecnymi w produktach codziennego użytku (*Topharm, Wakelin* 2003).

W raporcie NIOSH (*Klefer* i in. 1993) opisano przypadki wystąpienia dolegliwości związanych ze stosowaniem w miejscu pracy preparatów czyszczących na bazie D-limonenu: Citrikleen HD (zawierający 20 ÷ 30% D-limonenu) oraz 3M Natural Cleaner (zawierający 70 ÷ 80% D-limonenu).

Spośród 14 badanych pracowników 2 zgłosiło wystąpienie dolegliwości sugerujących alergiczne kontaktowe zapalenie skóry (objawy podobne do wysypki po kontakcie z trującym bluszczem) po ekspozycji na Citrikleen HD. Żaden z nich nie zgłosił się jednak po pomoc medyczną ani nie wykazywał objawów wysypki w momencie przeprowadzania wywiadu. U 1 pracownika rozwinęło się zapalenie skóry po umyciu zbiornika preparatem Citrikleen HD bez użycia rękawic ochronnych. Drugi pracownik doświadczył nawracających epizodów, dopóki nie odsunięto go od prac związanych z narażeniem na Citrikleen HD. Zauważono, że drażniący charakter preparatu Citrikleen HD (wysokie pH 11,2) również mógł przyczynić się do zgłaszanych objawów. Połowa z 14 badanych pracowników zgłosiła wzrost suchości skóry od czasu rozpoczęcia stosowania preparatów zawierających D-limonen, jednak nikt nie zgłosił tego jako objawu związanego z pracą. W warsztacie, w którym znajdował się otwarty zbiornik z Citrikleen HD, 4 z 12 pracowników zgłosiło nasilenie podrażnienia nosa lub gardła od czasu instalacji zbiornika. Kilku pracowników zauważyło nasilenie objawów podczas przebywania w pobliżu zbiornika (*Klefer* i in. 1993).

W ramach National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme (NICAS 2002) w 2001 r. przeprowadzono ankietę z udziałem formulatorów oraz użytkowników końcowych produktów zawierających D-limonen. Celem badania było określenie poziomu narażenia zawodowego i środowiskowego na D-limonen w Australii.

W ankiecie uczestniczyło ok. 80 firm wybranych z list klientów dostarczonych przez producentów i importerów D-limonenu. Z formulatorami oraz użytkownikami końcowymi skontaktowano się telefonicznie. Informacje zebrane podczas ankiety obejmowały m.in. dane dotyczące produktów, opisów procesów technologicznych, wykorzystywanych środków ochrony indywidualnej oraz wdrożonych środków ograniczających narażenie. Dane dotyczące zakresu zastosowań końcowych oraz potencjalnego narażenia były jednak ograniczone ze względu na stosunkowo niewielką liczbę respondentów reprezentujących użytkowników końcowych.

W ankiecie NICNAS odnotowano szereg skutków zdrowotnych zgłoszonych przez formulatorów i użytkowników D-limonenu. W tabeli 3 przedstawiono zgłoszone skutki zdrowotne związane z kontaktem z D-limonenem w wyniku narażenia zawodowego w różnych sektorach przemysłu, w zależności od stężenia D-limonenu w stosowanych produktach (NICNAS 2002).

Opisane w niniejszym rozdziale przypadki narażenia zawodowego na D-limonen pokazują, że związek w wysokich stężeniach (powyżej 5%) może działać drażniąco na skórę, oczy oraz drogi oddechowe. Działanie uczulające wykazują głównie produkty utleniania D-limonenu, takie jak wodoronadtlenki limonenu. Nieutleniony D-limonen jest słabszym alergenem kontaktowym niż jego utleniona forma. Zawodowa alergia kontaktowa na D-limonen jest najczęściej związana z częstym kontaktem z tym związkiem obecnym w detergentach do czyszczenia maszyn oraz profesjonalnych środkach do mycia rąk. Nasilenie reakcji alergicznych w warunkach zawodowych może być dodatkowo związane z codziennym stosowaniem kosmetyków zawierających D-limonen oraz środków czyszczących używanych w gospodarstwie domowym.

Badania epidemiologiczne

W literaturze, poza opisami przypadków, badaniami ochotników oraz retrospektywnymi analizami

Tabela. 3. Skutki zdrowotne narażenia zawodowego na D-limonen w różnych sektorach przemysłu (NICNAS 2002)
Table 3. Health effects of occupational exposure to *D*-limonene in different industrial sectors (NICNAS 2002)

Stężenie D-limonenu w produkcie	Sektor przemysłu lub zastosowanie	Zgłoszony skutek
100%	laboratorium histologiczne	ból głowy po użyciu, nawet przy pracy pod wyciągiem, u 1 pracownika wystąpiło podrażnienie oczu lub alergiczne zapalenie spojówek
100%	przemysłowe czyszczenie pojemników	jednorazowy przypadek lekkiego podrażnienia skóry podczas stosowania bez środków ochrony osobistej
100%	czyszczenie elementów samolotów	zapalenie skóry u pracownika z nadwrażliwością na wiele substancji chemicznych
100%	gemmologia	silny zapach wyczuwalny szczególnie podczas pracy pod mikroskopem, związany z nagrzewaniem się lampy
100%	usuwanie wosku z powierzchni w kosmetologii	wysuszenie skóry dłoni w przypadku niestosowania rękawic ochronnych
30%	usuwanie graffiti	zmęczenie wywołane silnym zapachem, wysuszenie skóry przy braku rękawic ochronnych
20%	odtłuszczanie tkanin	silny zapach podczas otwierania zbiornika powodował u niektórych osób zawroty głowy
12%	czyszczenie kabin prysznicowych, blatów, podłóg i innych intensywnie użytkowanych powierzchni (produkt po rozcieńczeniu)	rozpylanie preparatu powodowało świszczący oddech, kaszel, trudności w oddychaniu
5%	czyszczenie ogólnego zastosowania (odpływy, szamba itp.)	wysuszenie skóry

objawów występujących u pracowników, prowadzonymi na podstawie kwestionariuszy (opisanymi w poprzednim rozdziale), brak jest innych dostępnych badań epidemiologicznych dotyczących narażenia ludzi na D-limonen oraz skutków zdrowotnych wynikających z tego narażenia.

DZIAŁANIE TOKSYCZNE NA ZWIERZĘTA

Toksyczność ostra i krótkoterminowa

Opisane w literaturze badania przeprowadzone na zwierzętach wskazują na stosunkowo niską toksyczność ostrą D-limonenu po podaniu doustnym, dootrzewnowym, dożylnym, podskórnym, dermalnym oraz inhalacyjnym. Wartość LD_{50} po podaniu doustnym wynosi średnio 5g/kg (5000 mg/kg) u szczurów oraz 6 g/kg (6000 mg/kg) u myszy. Wartość LD_{50} po aplikacji dermalnej u królików wynosi powyżej 5 g/kg (5000 mg/kg), (MAK 1990).

W tabeli 4 przedstawiono dane dotyczące jednorazowych dawek śmiertelnych (LD_{50}) oraz maksymalnych dawek nieletalnych (DL_0) dla D-limonenu po narażeniu różnych gatunków zwierząt (myszy, szczurów i królików).

Narażenie drogą pokarmową

Dane dotyczące skutków krótkotrwałego podawania D-limonenu różnym gatunkom zwierząt drogą pokarmową (*per os* lub przez zgłębnik żołądkowy) przedstawiono w tabeli 5.

Badania wykazały, że zarówno u myszy, jaki i u szczurów po jednorazowym podaniu D-limonenu *per os* w dawce 3 ml/kg (co odpowiada ok. 2500 mg/kg) zaobserwowano objawy ze strony ośrodkowego układu nerwowego (OUN), m.in. zmniejszenie aktywności ruchowej (tab. 5), (*Tsui* i in 1974).

U samców szczurów rasy Wistar po jednorazowym podaniu D-limonenu w dawkach 800 mg/kg i 1200 mg/kg obserwowano zmiany w wątrobie. Przy dawce 800 mg/kg stwierdzono niewielkie obniżenie poziomu glikogenu w wątrobie, natomiast po podaniu dawki 1200 mg/kg zaobserwowano niewielki wzrost poziomu cytochromu P-450 oraz kwasu δ-aminolewulinowego w wątrobie. Po podaniu D-limonenu przez zgłębnik żołądkowy w dawkach 250 mg/kg i większych stwierdzono zależny od dawki wzrost sekrecji żółci.

Podobny efekt zaobserwowano u psów, którym jednorazowo podano D-limonen przez zgłębnik żołądkowy. Przy dawce 250 mg/kg stwierdzono ok. 70% wzrost sekrecji żółci (tab. 5), (*Kodama* 1976, *Kanerva* 1987).

U samców szczurów rasy F344/N, którym podawano D-limonen przez zgłębnik żołądkowy przez 5 dni w dawkach: 75 mg/kg, 150 mg/kg i 300 mg/kg, obserwowano zmiany w nerkach. Już przy dawce

Tabela 4. Wartości LD_{50} oraz LD_0 dla D-limonenu
Table 4. LD_{50} and LD_0 values for D-limonene

Gatunek (szczep), płeć	Droga podania	Wartość LD_{50}, g/kg mc.	Wartość LD_0, g/kg mc.	Piśmiennictwo
Mysz (Swiss), ♂	*p.o.*		3,50	*Le Bourhis, Soenen* 1973
Mysz (ddN), ♂	*p.o.*	5,6 (4,8 ÷ 6,5)		*Tsui* i in. 1975
Mysz (ddN), ♀	*p.o.*	6,6 (5,5 ÷ 7,9)		*Tsui* i in. 1975
Szczur (Wistar JCL), ♂	*p.o.*	4,4 (3,4 ÷ 5,9)		*Tsui* i in. 1975
Szczur (Wistar JCL), ♀	*p.o.*	5,2 (3,9 ÷ 7,0)		*Tsui* i in. 1975
Mysz (Swiss), ♂	*i.p.*		0,62	*Le Bourhis, Soenen* 1973
Mysz (ddN), ♂♀	*i.p.*	1,3 (1.2 ÷ 1,5)		Tsui i in. 1975
Szczur (Wistar JCL), ♂	*i.p.*	3,6 (2,7 ÷ 4,9)		Tsui i in. 1975
Szczur (Wistar JCL), ♀	*i.p.*	4,5 (3,4 ÷ 6,6)		*Tsui* i in. 1975
Szczur (nie określony), ♂	*i.v.*	0,125 (0,093 ÷ 0,168)		*Tsui* i in. 1975
Szczur (nie określony), ♀	*i.v.*	0,110 (0,104 ÷ 0,117)		*Tsui* i in. 1975
Mysz (ddN), ♂♀	*s.c.*	>41,5		*Tsui* i in. 1975
Szczur (Wistar JCL), ♂♀	*s.c.*	20,2		*Tsui* i in. 1975
Królik (nieokreślony)	dermalnie	>5		*Moreno* 1972; *Opdyke* 1975

Objaśnienia:
LD_{50} – dawka śmiertelna dla 50% populacji.
LD_0 – maksymalna dawka nieletalna.
♂ – samce.
♀ – samice.
p.o. – doustnie.
i.p. – dootrzewnowo.
i.v. – dożylnie.
s.c. – podskórnie.
dermalnie – na skórę.

75 mg/kg u części zwierząt stwierdzono uszkodzenie kanalików nerkowych lub miąższu nerek oraz tworzenie się kropel hialinowych w nerkach (tab. 5), (*Kanerva* 1987).

U myszy szczepu B6C3F1, którym podawano D-limonen przez zgłębnik żołądkowy 5 dni w tygodniu przez 16 dni, przy dawkach 1650 mg/kg i wyższych stwierdzono padnięcia zwierząt. Przy dawce 6000 mg/kg wszystkie samce padły w ciągu 1 dnia, a wszystkie samice w ciągu 2 dni.

U szczurów rasy F344/N w tym samym eksperymencie po podaniu dawki 1650 mg/kg zaobserwowano 10% redukcję masy ciała. Dawka 3300 mg/kg spowodowała padnięcie 5/5 samców i 3/5 samic w ciągu 2 dni. Po podaniu dawki 6000 mg/kg wszystkie samce i samice padły w ciągu 1 dnia (tab. 5), (NTP 1990).

Narażenie inhalacyjne

W badaniu opisanym przez *Larsena* i in. (2000) oceniono wpływ D-limonenu na reakcje oddechowe u samców myszy BALB/c. Zwierzęta (56 osobników) eksponowano na opary D-limonenu. D-limonen firmy Merc o czystości >96% odparowywano, mieszano z powietrzem i kierowano do komory ekspozycyjnej o objętości 2,3 l. Przepływ powietrza w komorze utrzymywano na poziomie 17 ÷ 25 l/min. Nominalne stężenie D-limonenu obliczano na podstawie szybkości dostarczania odparowanego związku oraz przepływu powietrza w komorze.

Zwierzęta eksponowano na stężenia D-limonenu w zakresie 197 ÷ 1599 ppm (1095 mg/m^3 ÷ 8890 mg/m^3). Badanie obejmowało 15-minutowy okres kontrolny, 30-minutowy okres ekspozycji oraz 15-minutowy okres rekonwalescencji. Analiza danych i ocenę efektów przeprowadzono z uwzględnieniem różnych przedziałów czasowych w trakcie 30-minutowej ekspozycji: 0 ÷ 10 min, 11 ÷ 20 min, 21 ÷ 30 min. Dodatkowo oceniano cały okres ekspozycji (0 ÷ 30 min) jako wartość średnią.

W badaniu parametry oddechowe, takie jak częstość oddechów (*f*), czas opóźnienia między zakończeniem wdechu a rozpoczęciem wydechu (*TB*), czas pauzy – okres od zakończenia wydechu do rozpoczęcia kolejnego wdechu (*Tp*), szybkość przepływu wydechowego (*VD*) oraz objętość oddechowa (*VT*), wyrażono jako procent wartości bazowej (100%). Trend zmian analizowano za pomocą dwukierunkowej analizy wariancji i analizy regresji.

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że głównym skutkiem działania D-limonenu na

Tabela 5. Toksyczność krótkoterminowa D-limonenu u zwierząt po podaniu doustnym
Table 5. Short-term toxicity of D-limonene in animals after oral administration

Gatunek, szczep, płeć, liczba zwierząt	Warunki narażenia (droga podania, rodzaj roztworu, dawka, czas)	Skutki narażenia	Piśmiennictwo
Myszy ddN, n.s., szczury Wistar JCL, n.s.	*per os*; D-limonen, n.s., 3 ml/kg mc., jednorazowo	depresja ośrodkowego układu nerwowego (OUN), zmniejszenie spontanicznej aktywności ruchowej, hipertermia	*Tsui* i in. 1974
Szczury Wistar, 4 ÷ 6, ♂	*per os*; D-limonen w roztworze gumy tragakantowej; 200, 400, 600, 800, 1200 mg/kg mc., jednorazowo	200, 400 i 600 mg/kg mc. – nie obserwowano efektów 800 mg/kg mc. – niewielka redukcja glikogenu w wątrobie 1200 mg/kg mc. – niewielki wzrost cytochromu P-450 i kwasu – aminolewulinowego w wątrobie	*Ariyoshi* i in. 1975
Szczury Wistar, 5 ♂/grupę	przez zgłębnik żołądkowy; D-limonen w roztworze gumy arabskiej; 0, 8,5, 25, 85, 250, 426, 850 mg/kg mc., jednorazowo	0 mg/kg mc. – grupa kontrolna 8,5 i 25 mg/kg mc. – nie obserwowano efektów 85, 250, 426, 850 mg/kg mc. – wzrost sekrecji żółci zależny od dawki	*Kodama* 1976
Psy mieszańce, 2 ♂/grupę	przez zgłębnik żołądkowy; D-limonen w roztworze gumy arabskiej; 0, 250 mg/kg mc., jednorazowo	0 mg/kg mc. – grupa kontrolna 250 mg/kg mc. – 70% wzrost sekrecji żółci	*Kodama* 1976
Szczury Wistar, n.s., ♂	*per os*; D-limonen w roztworze gumy tragakantanowej; 400 mg/kg mc., przez 2 ÷ 3 dni	nie obserwowano efektów	*Ariyoshi* i in. 1975
Szczury F344/N, 5 ♂/ grupę	przez zgłębnik żołądkowy; D-limonen w oleju kukurydzianym; 0, 75, 150, 300 mg/kg mc., 5 dni	0 mg/kg mc. – grupa kontrolna 75 i 150 i 300 mg/kg mc. – tworzenie kropel hialinowych w nerkach oraz przewlekłe uszkodzenie nerek	*Kanerva* 1987
Myszy B6C3F1, 5 ♂ + 5 ♀/ grupę	przez zgłębnik żołądkowy; D-limonen >99% w oleju kukurydzianym; 0, 413, 825, 1650, 3300 i 6000 mg/kg mc., 5 dni/tydz. przez 16 dni	0 mg/kg mc. – grupa kontrolna 413 i 825 mg/kg mc. – nie obserwowano efektów 1650 mg/kg mc. – padnięcie 1/5 ♂ i 1/5 ♀ po 3 dniach 3300 mg/kg mc. – padnięcie 4/5 ♂ i 5/5 ♀ po 3 dniach 6000 mg/kg mc. – padnięcie 5/5 ♂ po 1 dniu i 5/5 ♀ po 2 dniach	NTP 1990
Szczury F344/N, 5 ♂ + 5 ♀/ grupę	przez zgłębnik żołądkowy; D-limonen w oleju kukurydzianym; 0, 413, 825, 1650, 3300, 6000 mg/kg mc.; 5 dni/tydz. przez 16 dni	0 mg/kg mc. – grupa kontrolna 413 i 825 mg/kg mc. – nie obserwowano efektów 1650 mg/kg mc. – 10% redukcja masy ciała u ♂ 3000 mg/kg mc. – 8% redukcja masy ciała u ♀ oraz padnięcie 5/5 ♂ i 3/5 ♀ po 2 dniach 6000 mg/kg mc. – padnięcie wszystkich osobników w ciągu 1 dnia	NTP 1990

Objaśnienia:
♂ – samce.
♀ – samice.
n.s. – nie specyfikowano płci.

układ oddechowy było podrażnienie sensoryczne górnych dróg oddechowych. Podrażnienie czuciowe jest wywoływane przez stymulację zakończeń nerwu trójdzielnego w górnych drogach oddechowych i u myszy objawia się odruchowym zmniejszeniem częstości oddechów (*f*) oraz wydłużeniem czasu przerwy (*TB*). Ekspozycja na D-limonen powodowała zależny od stężenia spadek częstości oddechów (*f*) oraz wzrost czasu przerwy (*TB*). Efekt ten pojawiał się w ciągu pierwszych 10 min ekspozycji i utrzymywał się na stałym poziomie w dalszym przebiegu badania. Wartość RD_{50} (stężenie powodujące zmniejszenie częstości oddechów o 50%) wyniosło 1076 ppm (6082 mg/m^3). Badany związek nie wykazywał działania drażniącego na płuca. Nie stwierdzono wpływu na czas pauzy (*Tp*), co wskazuje na brak bezpośredniej stymulacji nerwów błędnych oraz brak objawów obrzęku płuc. Nie obserwowano również szybkiej, płytkiej reakcji oddechowej typowej dla tego typu stymulacji.

Wpływ D-limonenu na objętość oddechową (*VT*) nie jest jednoznaczny. Ani najniższe, ani dwa najwyższe stężenia nie wywołały istotnego wpływu na *VT*. Statystycznie istotny spadek zaobserwowano jednak przy stężeniach 793 ppm i 1255 ppm (4483 mg/m^3 i 7094,5 mg/m^3), co może wskazywać na zależność o kształcie litery U. Badany związek nie powodował spadku objętości oddechowej (*VT*) poniżej stężenia 629 ppm (3556 mg/m^3). Nie stwierdzono istotnego wpływu na ośrodkowy

układ nerwowy w badanym zakresie stężeń ani efektów znieczulenia ogólnego przy stężeniach poniżej 1599 ppm (9039 mg/m^3). Ekspozycja na D-limonen powodowała łagodny efekt bronchokonstrykcyjny przy stężeniach powyżej 1000 ppm (5653 mg/m^3). Poziom bez obserwowalnych efektów (NOEL) dla podrażnienia sensorycznego u myszy oszacowano na 100 ppm (565 mg/m^3), (*Larsen* i in 2000).

Autorzy badania sugerują, że myszy BALB/c i ludzie wykazują podobną wrażliwość na D-limonen. U ludzi próg podrażnienia sensorycznego wynosił powyżej 80 ppm (>452 mg/m^3). Myszy wykazywały jednak większą wrażliwość niż szczury. U szczurów progowe stężenie D-limonenu wywołujące odpowiedź elektrofizjologiczną w nerwach trójdzielnych wynosiło ok. 500 ppm (2826,5 mg/m^3). Przy założeniu, że szczury wykazują 10-krotnie mniejszą wrażliwość niż ludzie (na podstawie efektów wywołanych przez nikotynę na nerw trójdzielny), można przewidywać, że próg podrażnienia sensorycznego wywołanego przez D-limonen u ludzi wynosi ok. 50 ppm (283 mg/m^3). U salamandry tygrysiej próg pobudzenia nerwu trójdzielnego, tj. najniższe stężenie wywołujące odpowiedź zakończeń nerwu odpowiedzialnego za odczuwanie podrażnienia, wynosił ok. 430 ppm (2431 mg/m^3), co było wartością zbliżoną do uzyskanej u szczurów (*Larsen* i in. 2000).

Toksyczność dermalna

Działanie toksyczne D-limonenu na skórę zbadano w eksperymencie przeprowadzonym na kotach rasy domowej (5 grup po 5 samców i 5 samic w każdej). Kotom ogolono sierść na powierzchni 10 x 10 cm, a następnie zwilżono skórę wodnym roztworem preparatu zawierającego D-limonen. Do badań zastosowano preparat owadobójczy zawierający 78,2% D-limonenu. Preparat rozcieńczono zgodnie z zaleceniami producenta do stężenia ok. 9 ÷ 11 g/l wody. Przygotowano również roztwory o stężeniach 4 ÷ 16-krotnie większych od zalecanego.

U 1 z 8 kotów narażonych na działanie D-limonenu w stężeniu zalecanym przez producenta zaobserwowano nadmierne ślinienie, a u 2 osobników drżenie mięśni. U pozostałych zwierząt nie stwierdzono objawów niepożądanych. Nasilenie objawów obserwowano w grupach, w których zastosowano większe stężenia D-limonenu.

Przy stężeniu 15-krotnie przekraczającym zalecaną dawkę objawy kliniczne obejmowały nadmierne ślinienie trwające 15 ÷ 30 min, umiarkowaną do ciężkiej ataksję (niezborność ruchową) utrzymującą się przez 1 ÷ 5 h, drżenie mięśni przypominające dreszcze trwające 1 ÷ 4 h oraz hipotermię rozpoczynającą się krótko po podaniu i utrzymującą się przez 5 h. U samców dodatkowo obserwowano otarcia naskórka w okolicy moszny i krocza. Nie odnotowano padnięć ani trwałych skutków po zastosowaniu żadnej z badanych dawek (*Hooser* 1986; MAK 1990; MAK 2006).

W opracowaniu ekspertów niemieckich MAK (2006) zwrócono uwagę, że w opisanym badaniu nie można było wykluczyć narażenia zwierząt drogą pokarmową wskutek zlizywania preparatu z sierści, co mogło wpływać na obserwowane efekty.

Toksyczność podprzewlekła i przewlekła

Narażenie drogą pokarmową

Dane dotyczące skutków podawania D-limonenu różnym gatunkom zwierząt drogą pokarmową (*per os* lub przez zgłębnik żołądkowy) przedstawiono w tabeli 6.

Powyższe badania przeprowadzone u różnych gatunków zwierząt (tab. 6) wykazały, że D-limonen podawany drogą pokarmową powodował powiększenie wątroby u szczurów obu płci, proporcjonalnie do dawki i czasu narażenia. Badanie aktywności enzymów wątrobowych ALT, AST i ALP w surowicy u samców szczurów narażonych na D-limonen w dawce 75 mg/kg mc., opisane przez *Ramos* i in. (2018), nie wskazało na występowanie uszkodzenia wątroby. Zdaniem autorów dopiero trzykrotne przekroczenie wartości obserwowanych w grupie kontrolnej mogłoby świadczyć o istotnym działaniu hapatotoksycznym.

Zmiany w nerkach obserwowano wyłącznie u samców szczurów. Stwierdzono, że zwiększone tworzenie się kropli hialinowych, związane z akumulacją białka α2μ-globuliny, jest charakterystyczne dla samców tego gatunku. Wyniki te wskazują, że nefrotoksyczne działanie D-limonenu jest specyficzne dla samców szczurów i może nie mieć bezpośredniego przełożenia na ocenę ryzyka u ludzi.

Inne obserwowany u szczurów objawy obejmowały utratę masy ciała (zarówno u samców, jak i u samic) oraz szorstkość sierści, letarg i nadmierne łzawienie u samców po podaniu dawek przekraczających 1200 mg/kg mc. Dla samic szczurów przyjęto wartość NOAEL = 300 mg/kg mc, natomiast dla samców NOAEL = 5 mg/kg mc. ze względu na występowanie specyficznych zmian w nerkach.

Tabela 6. Toksyczność podprzewlekła i przewlekła D-limonenu u zwierząt po podaniu doustnym oraz przez zgłębnik żołądkowy
Table 6. Subchronic and chronic toxicity of *D*-limonene in animals after oral and gastric tube administration

Gatunek, szczep, płeć, liczba zwierząt	Warunki narażenia (droga podania, dawka, czas)	Skutki narażenia	Piśmiennictwo
Podanie *per os*			
Szczury Sprague Dawley-JCL, 10 ♂ + 10 ♀/grupę, 9 ♂ + 9 ♀/ grupę przy dawce 2770 mg/kg mc.	przez zgłębnik żołądkowy, D-limonen, n.s., w 1% roztworze Tween 80, 0, 227, 554, 1385, 2770 mg/kg mc., codziennie przez 4 tyg.	0 mg/kg mc. – grupa kontrolna 227, 554 i 1385 mg/kg mc. - u samców zaobserwowano ziarniste złogi w nerkach 2770 mg/kg mc. - u samców zaobserwowano zmniejszenie masy ciała oraz ziarniste złogi w nerkach - u samic nie stwierdzono żadnych zmian związanych z podawaniem związku	Tsui i in. 1975
Szczury F344, 10 ♂ + 10 ♀/grupę	przez zgłębnik żołądkowy, D-limonen, ♂ 75, 300 mg/kg mc. ♀ 150, 600 mg/kg mc. codziennie przez 7, 28 i 90 dni (5 dni/tydz.)	- powiększenie wątroby zarówno u samic i samców proporcjonalne do dawki i czasu podawania D-limonenu - u samców szczurów stwierdzono zmiany w nerkach już po 7 dniach podawania limonenu (tworzenie się kropel hialinowych, wzrost białka 2u-globuliny)	*Elcombe* i in. 2002
Szczury F344, 10 ♂/grupę	przez zgłębnik żołądkowy (sondę), D-limonen w oleju kukurydzianym, 0, 2, 5, 10, 30, 75 mg/kg mc. 5 dni/tydz. przez 13 tyg.	0 mg/kg mc. – grupa kontrolna 5 mg/kg mc. - nie obserwowano efektów (NOAEL – 5 mg/kg mc. dla samców szczurów – zmiany w nerkach) 10 mg/kg mc. - w badaniach histologicznych tkanki nerkowej stwierdzono zmiany charakteryzujące się kroplami hialinowymi, wałeczkami ziarnistymi na połączeniu korowo-rdzeniowym oraz licznymi zmianami korowymi, klasyfikowanymi łącznie jako przewlekła nefroza 30, 75 mg/kg - zależny od dawki wzrost masy nerek i wątroby (NOAEL – 30 mg/kg mc. dla samców szczurów – powiększenie wątroby)	*Webb* i in. 1989
Szczury F344N, 10 ♂ + 10 ♀/grupę	przez zgłębnik żołądkowy, D-limonen >99% w oleju kukurydzianym, 0, 150, 300, 600, 1200 i 2400 mg/kg mc., 5 dni/tydz. przez 13 tyg.	0 mg/kg mc. – grupa kontrolna 150 i 300 mg/kg mc. - nie obserwowano efektów u samic (NOAEL – 300 mg/kg mc. dla samic) 600 mg/kg mc. - u samców stwierdzono 6% redukcję masy ciała 1200 mg/kg mc. - u samców zaobserwowano 12% redukcję masy ciała, szorstką sierść, letarg oraz nadmierne łzawienie 2400 mg/kg mc. - u samców zaobserwowano 23% redukcję masy ciała, szorstką sierść, letarg oraz nadmierne łzawienie - u jednej z samic stwierdzono 11% redukcję masy ciała 150, 300, 600, 1200 i 2400 mg/kg mc. - we wszystkich grupach samców stwierdzono zależną od dawki nefropatię: degenerację nabłonka kanalików krętych, ziarniste odlewy w świetle kanalików, szczególnie w zewnętrznej części rdzenia nerki oraz tworzenie się kropel hialinowych w nerkach	NTP 1990

cd. tab. 6/table 6 cont.

Gatunek, szczep, płeć, liczba zwierząt	Warunki narażenia (droga podania, dawka, czas)	Skutki narażenia	Piśmiennictwo
Myszy B6CF1, 10 ♂ + 10 ♀/grupę	przez zgłębnik żołądkowy, *D*-limonen>99% w oleju kukurydzianym, 0, 125, 250, 500, 1000, 2000 mg/kg mc., 5 dni/tydz. przez 13 tyg.	0 mg/kg mc. – grupa kontrolna 125 i 250 mg/kg mc. - nie obserwowano efektów (NOAEL – 250 mg/kg mc.) 500 mg/kg mc. - padnięcie 1/10 samic w 5 tygodniu eksperymentu 1000 mg/kg mc. - zaobserwowano szorstkość sierści i zmniejszoną aktywność u wszystkich osobników 2000 mg/kg mc. - zaobserwowano szorstkość sierści i zmniejszoną aktywność u wszystkich osobników, - u samców stwierdzono 11% redukcję masy ciała, a u samic 2% - padnięcie 1/10 samców oraz 2/10 samic w 4 tygodniu eksperymentu - stwierdzono gruczolaka pęcherzykowego u 1 samicy	NTP 1990,
Psy Japońskie Beagle, 3 ♂ + 3 ♀/grupę	przez zgłębnik żołądkowy, *D*-limonen, n.s., 0, 0,4, 1,2, 3,6 ml/kg mc. (około 340, 1010, 3040 mg/kg mc.) codziennie przez 6 miesięcy	0 ml/kg mc. – grupa kontrolna 0,4 ml/kg mc. (340 mg/kg mc): - u wszystkich psów wystąpiły nudności i wymioty 1,2 ml/kg mc. (1010 mg/kg mc.): - u wszystkich osobników stwierdzono obecność białka w kanalikach nerkowych - u psów ( ) zaobserwowano zmniejszenie masy ciała 3,6 ml/kg (3040 mg/kg mc.): - u wszystkich osobników stwierdzono obniżenie poziomu cholesterolu i cukru we krwi - u psów (♂) zaobserwowano zmniejszenie masy ciała	*Tsui* i in. 1975b
Psy Japońskie Beagle, 5 ♂ + 5 ♀/grupę	przez zgłębnik żołądkowy (sondę), *D*-limonen, n.s., 0, 100, 1000 mg/kg mc. codziennie przez 6 miesięcy	0 ml/kg mc. – grupa kontrolna 100, 1000 mg/kg mc. - analizy regresji liniowej wskazały na zależną od dawki, tendencję do wzrostu masy nerek - nie stwierdzono zmian histopatologicznych w nerkach, które mogłyby być związane z narażeniem - nie stwierdzono akumulacji kropli szklistych ani żadnych innych objawów nefropatii (NOAEL – 100 mg/kg mc.) powyżej stężenia 100 mg/kg mc. u psów występowały nudności i wymioty	*Webb* i in. 1990

Objaśnienia:
♂– samce.
♀– samice
n.s. – nie określono (ang. *not specified*).
NOAEL – najwyższy poziom dawki, przy którym nie zaobserwowano szkodliwych efektów (ang. *No Observed Adverse Effect*).

U myszy obu płci po podaniu D-limonenu w stężeniu 1000 mg/kg mc. obserwowano szorstkość sierści oraz zmniejszoną aktywność. Przy dawkach przekraczających 2000 mg/kg mc. stwierdzono utratę masy ciała, a także padnięcie 1/10 samców i 2/10 samic w czwartym tygodniu eksperymentu. Wartość NOAEL dla myszy ustalono na poziomie 250 mg/kg mc.

U psów rasy japoński beagle obu płci po podaniu badanego związku w dawkach przekraczających 1010 mg/kg mc. stwierdzono obecność złogów białkowych w nerkach, jednak nie obserwowano kropelek hialinowych ani odczynów typowych dla α2μ-globulinowej nefropatii, co potwierdza, że psy nie są podatne na ten swoisty mechanizm toksyczny działania. Po podaniu dawek przekraczających 3040 mg/kg mc. u wszystkich osobników zaobserwowano zmniejszenie masy ciała oraz obniżenie stężenia cholesterolu i cukru we krwi. Wartość NOAEL dla psów ustalono na poziomie 100 mg/kg mc.

W innym badaniu, samcom szczurów NCI-Black-Reiter (NBR), które nie syntetyzują α2μ-globuliny, podawano 1650 mg D-limonenu/kg mc. dziennie przez 4 dni. Nie stwierdzono u nich α2μ-globuliny metodą immunohistochemiczną ani zmian w nerkach. W przeciwieństwie do tego, u samców szczurów F344, którym podawano lindan (kontrolna grupa pozytywna), wystąpiła typowa nefropatia α2μ-globulinowa (*Dietrich*, *Swanberg* 1991a).

Narażenie dermalne

D-limonen nanoszono na ogoloną skórę brzucha szczurów trzy razy dziennie i pozostawiano do wyschnięcia na powietrzu. Po ok. 10 aplikacjach (czas, stężenie i ilość nie zostały określone) związek wywołał wypryskowe zapalenie skóry, które początkowo pojawiało się w fałdach skórnych, a następnie stopniowo obejmowało całą traktowaną powierzchnię. W wyniku dalszego stosowania D-limonenu w podskórnej warstwie skóry rozwijały się strupy, a także obserwowano wyraźne rozszerzenie naczyń krwionośnych. Po 8 dniach po zakończeniu eksperymentu zmiany zapalne całkowicie ustąpiły (*Riedel* 1940).

Narażenie dotchawicze

Podawanie D-limonenu w postaci aerozolu bezpośrednio do tchawicy szczurów i chomików spowodowało uszkodzenie nabłonka oskrzeli oraz istotne zmiany w płucach. Wyniki badań przedstawiono w tabeli 7.

ODLEGŁE SKUTKI DZIAŁANIA TOKSYCZNEGO

Działanie mutagenne i genotoksyczne

W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono danych dotyczących działania mutagennego i genotoksycznego D-limonenu u ludzi.

W badaniach przeprowadzonych w warunkach in vitro na różnych szczepach bakterii oraz liniach komórkowych ssaków nie wykazano działania mutagennego D-limonenu. Związek nie wywoływał mutacji genowych w teście Amesa przeprowadzonym na szczepach bakterii *Salmonella* Typhimurium (TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA1538), zarówno w obecności, jak i w nieobecności frakcji S9, która symuluje metabolizm wątrobowy.

W komórkach CHO (komórkach wyizolowanych z jajnika chomika chińskiego) D-limonen nie powodował aberracji chromosomowych ani wymiany chromatyd siostrzanych, zarówno w obecności frakcji S9, jak i bez dodatku frakcji S9.

D-limonen nie indukował również oporności na trifluorotymidynę w badaniach przeprowadzonych na mysich komórkach chłoniaka L5178Y, zarówno z dodatkiem, jak i bez dodatku frakcji S9 (*Florin* 1980; NTP 1990*; Watabe* i in 1980; *Watabe* i in 1981).

Działania mutagennego i genotoksycznego D-limonenu nie wykazano również w badaniach przeprowadzonych w warunkach in vivo.

Mutagenność D-limonenu oceniano u myszy in vivo w teście plamkowym (*mammalian spot test*), który umożliwia wykrywanie mutacji w komórkach somatycznych zarodka. Podanie myszom C57BL/6J Han dootrzewnowo D-limonenu w dawce 215 mg/kg mc. w 9. ÷ 11. dniu ciąży dało negatywne wyniki w zakresie działania mutagennego (*Fahrig* 1982; *Styles, Penman* 1985).

W innym teście plamkowym oceniano wpływ mutagenu *N*-etylo-*N*-nitrozomocznika (ENU) w połączeniu z D-limonenem u samic myszy C57BL/6JHan. Zwierzętom podano 30 mg ENU wraz z 172 mg D-limonenu we wstrzyknięciu dootrzewnowym w 9. dniu ciąży, a następnie w 10. i 11. dniu podawano wyłącznie D-limonen w dawce 215 mg. Wyniki wykazały, że D-limonen wyraźnie zmniejszał skuteczność działania ENU, nawet o ok. 50% (*Fahrig* 1982; *Fahrig* 1985).

Powyższe badania wskazują, że D-limonen nie tylko nie wykazywał działania mutagennego, ale

Tabela 7. Wyniki badań toksyczności podprzewlekłej po dotchawiczym podaniu D-limonenu
Table 7. Results of subchronic toxicity studies of D-limonene following intratracheal administration

Gatunek, szczep, płeć, liczba zwierząt	Warunki narażenia (droga, dawka, czas)	Skutki narażenia	Piśmiennictwo
Szczury, n.s.	dotchawiczo: D-limonen, n.s. (aerozol), 1 raz w tygodniu, przez 6 tyg., 0,2 ml (168,8 mg)	0,2 ml: po 3 tyg. uszkodzenie nabłonka oskrzeli i oskrzelików z krwotokiem pęcherzykowym; po 6 tyg. powiększone, blade płuca; większość zwierząt padła	*Leroy* 1984
Chomiki, n.s.	dotchawiczo: D-limonen, n.s. (aerozol), 1 raz w tygodniu, przez 6 tyg., 0,2 ml (168,8 mg)	0,2 ml: uszkodzenie nabłonka oskrzeli i oskrzelików z krwotokiem pęcherzykowym; po 6 tyg. powiększone, blade, zwakualizowane płuca	*Leroy* 1984

Objaśnienie: n.s. – nie określono (ang. *not specified*).

również zmniejszał działanie mutagenne innej substancji – *N*-etylo-*N*-nitrozomocznika.

W innym badaniu in vivo 4 szczury i 4 myszy otrzymały doustnie, przez zgłębnik, 2000 mg/kg mc. Po 3 h, 8 h i 24 h przeprowadzono test kometowy na komórkach pochodzących z następujących narządów: żołądka, jelit, wątroby, nerek, pęcherza moczowego, płuc, mózgu i szpiku kostnego. W komórkach żadnego z badanych narządów D-limonen nie powodował uszkodzeń DNA, co potwierdza brak jego działania genotoksycznego (*Sekihashi* i in. 2002).

Działanie D-limonenu oceniano również w teście indukcji mutacji lacI. Samce szczurów rasy BigBlue™ przez 10 kolejnych dni otrzymywały D-limonen w diecie (w paszy) w dawce 10 000 ppm (360 ÷ 680 mg/kg mc.). Związek nie zwiększał częstości mutacji w wątrobie ani w nerkach szczurów. Wyniki te stanowią dodatkowe potwierdzenie niegenotoksycznego mechanizmu działania D-limonenu (MAK 2006; *Turner* i in. 2001).

Działanie rakotwórcze

Działanie rakotwórcze u ludzi

W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono danych dotyczących działania rakotwórczego D-limonenu u ludzi.

Działanie rakotwórcze u zwierząt

Działanie rakotwórcze D-limonenu badano u różnych gatunków myszy oraz u szczurów rasy F344 pod kątem możliwości wystąpienia nowotworów płuc, wątroby, nerek i skóry.

Wyniki badań dotyczących działania rakotwórczego D-limonenu u zwierząt przedstawiono w tabeli 8.

Przedstawione powyżej wyniki badań rakotwórczości u zwierząt (tab. 8) wskazały, że D-limonen powodował zmiany nowotworowe (gruczolaki i gruczolakoraki) w nerkach wyłącznie u samców szczurów, a ich występowanie zależało od zastosowanej dawki. U samic szczurów takich zmian nie obserwowano.

Powstawanie guzów nerek u samców szczurów wiąże się z obecnością specyficznego białka α2μ-globuliny (α2μG), syntetyzowanego w wątrobie i wtórnie wchłanianego w kanalikach nerkowych. U samców stężenie tego białka w moczu jest znacznie wyższe niż u samic (*Hard, Whysner* 1994; *Whysner, Williams* 1996).

U myszy nie stwierdzono istotnych statystycznie zmian nowotworowych związanych z działaniem D-limonenu, niezależnie od drogi podania. Po podaniu związku przez zgłębnik żołądkowy obserwowano natomiast nienowotworowe zmiany w wątrobie w postaci obecności wielojądrzastych hepatocytów.

W badaniu przesiewowym opartym na przyspieszonej indukcji guzów płuca u szczepu myszy A/He, wysoce podatnego na rozwój tego nowotworu, nie stwierdzono przypadków powstawania nowotworów płuca wywołanych przez D-limonen. Odsetek osobników, u których wystąpiły zmiany w płucach po podaniu D-limonenu, był mniejszy lub równy wartością obserwowanym w grupie kontrolnej, zarówno u samców, jak i samic. Zmian nowotworowych nie obserwowano również po aplikacji D-limonenu na skórę myszy.

W literaturze opisano szereg przypadków działania D-limonenu jako promotora lub supresora nowotworów. Przeprowadzone badania wykazały, że związek zmniejszał częstość występowania nowotworów płuca u samic 25 myszy, którym przez

Tabela 8. Działanie rakotwórcze D-limonenu u zwierząt w zależności od drogi podania
Table 8. Carcinogenicity of D-limonene in animals depending on the route of administration

Gatunek, szczep, płeć, liczba zwierząt	Warunki narażenia (droga, dawka, czas)	Obserwowane nowotwory	Piśmiennictwo
Szczury F344, 50 ♂ + 50 ♀/ grupę	zgłębnik żołądkowy: D-limonen (>99%) w oleju kukurydzianym; ♂ 0, 75, 150 mg/kg mc.; ♀ 0, 300, 600 mg/kg mc.; codziennie, 5 dni/tydz., 103 tyg.	zmiany w kanalikach nerkowych: ♂ 0 mg/kg mc. – grupa kontrolna – nie obserwowano zmian; ♂ 75 mg/kg mc. – hiperplazja 4/50, gruczolaki 4/50, gruczolakoraki 4/50; ♂ 150 mg/kg mc. – hiperplazja 7/50, gruczolaki 8/50, gruczolakoraki 3/50; ♀ 0 mg/kg mc. – grupa kontrolna – nie stwierdzono zmian; ♀ 300 mg/kg mc. i 600 mg/kg mc. nie obserwowano zmian	NTP 1990
Myszy A/He, 15 ♂ + 15 ♀/grupę; kontrola 80 ♂ + 80 ♀	dootrzewnowo: D-limonen (85 ÷ 99%) w trikaprylinie; 200, 1000 mg/kg mc., 3 razy/tydz. przez 8 tyg.; kontrola: trikaprylina 0,1ml; 3 razy/tydz. przez 8 tyg.; zakończenie eksperymentu 24 tyg. od pierwszej iniekcji	gruczolaki płuca: ♂ 0 mg/kg mc. – grupa kontrolna – 22/77 (28%); 200 mg/kg mc. – 1/15 (7%); 1000 mg/kg mc. – 3/15 (20%); ♀ 0 mg/kg mc. – grupa kontrolna – 15/77 (20%); 200 mg/kg mc. – 2/15 (13%), 1000 mg/kg mc. - 2/13 (20%)	IARC 1993; *Stoner* i in 1973
Myszy (B6C3F1), 50 ♂ + 50 ♀/ grupę	zgłębnik żołądkowy: D-limonen (>99%) w oleju kukurydzianym; ♂ 0, 250, 500 mg/kg mc.; ♀ 0, 500, 1000 mg/kg mc.; codziennie, 5 dni/tydz., 103 tyg.	wielojądrzaste hepatocyty: ♂ 0 mg/kg mc. – grupa kontrolna; 250 mg/kg mc. – 4/46; 500 mg/kg mc. – 32/50; ♀ – nie obserwowano zmian nowotworowych	NTP 1990
Myszy ICR/Ha Swiss, 50 ♀/grupę; kontrola 100 ♀	na ogoloną skórę: 10 mg D-limonenu w 0,1 ml acetonu, 3 razy/tydz. przez 440 dni	nie stwierdzono przypadków raka ani w grupie kontrolnej, ani w grupie myszy narażanych na D-limonen	*Van Duuren, Goldschmidt* 1976

Objaśnienia:
♂ – samce.
♀ – samice.

17 tygodni podawano paszę zawierającą 0,63% D-limonenu. Myszom wstrzyknięto dootrzewnowo 10 mmol 4-(metylnitrozamino)-1-(3-pirydylo)-1-butanonu (NNK) w 0,1 ml roztworu soli, co indukowało powstawanie nowotworów płuca. D- limonen znacząco zmniejszył liczbę guzów płucnych wywołanych przez NNK. Odsetek nowotworów płuca u myszy, którym podano NNK wynosił 8,1%, natomiast u myszy otrzymujących jednocześnie D-limonen w paszy – 2,4%. Sam D-limonen nie wykazał istotnego wpływu na częstość występowania nowotworów płuca (*El-Bayoumy* i in. 1996; MAK 2006).

W innym badaniu przeprowadzonym na samicach szczurów rasy Wistar Furth zwierzęta karmiono przez 2 tygodnie dietą zawierającą 5% D-limonenu. Po tym okresie zwierzętom podano pojedynczą dożylną dawkę 50 mg/kg mc. MNU (nitrozometylomocznika) – substancji indukującej powstawanie nowotworów gruczołu sutkowego. Grupa kontrolna samic szczurów kontynuowała dietę z dodatkiem D-limonenu przez kolejny tydzień, po czym zwierzęta powróciły do diety bazowej. Druga grupa samic, po otrzymaniu pojedynczej dawki MNU, była żywiona dietą zawierającą D-limonen do zakończenia eksperymentu, tj. do 23. tygodnia.

Podanie D-limonenu w grupie kontrolnej przez 2 tygodnie przed oraz 1 tydzień po podaniu MNU nie wpłynęło na częstość występowania ani liczbę guzów gruczołu sutkowego. U szczurów otrzymujących D-limonen do końca eksperymentu liczba guzów sutka była o połowę mniejsza niż u zwierząt z grupy kontrolnej (IARC 1993; *Maltzman* i in. 1989).

Eksperci z MAK (1989) opisali również przypadki działania D-limonenu jako promotora powstawania nowotworów, m.in. przedżołądka

u myszy Stock Albino po jednoczesnym podaniu dożołądkowym ftalanu dibutylu (DBP) i D-limonenu (50 µl DBP, 0,05 ml D-limonenu). Po 8 tygodniach od podania DBP wraz z D-limonenem stwierdzono 8 przypadków nowotworów przedżołądka w grupie 23 osobników. W grupie kontrolnej (17 osobników), której podano wyłącznie DBP, stwierdzono 2 przypadki nowotworów przedżołądka (*Field* i in. 1965).

Eksperci są zdania, że D-limonen może w określonych warunkach działać zarówno jako promotor, jak i supresor nowotworów (MAK 1990).

Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem (IARC) zaklasyfikowała D-limonen do grupy 3, co oznacza, że substancja ta nie jest klasyfikowana jako rakotwórcza dla ludzi. Klasyfikacja ta została oparta na dostępnych danych z badań eksperymentalnych na zwierzętach oraz na analizie mechanizmów działania substancji (IARC 1999).

Działanie na rozrodczość

Działanie na rozrodczość u ludzi

W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono danych dotyczących wpływu D-limonenu na rozrodczość u ludzi.

Działanie na rozrodczość u zwierząt

Działanie D-limonenu na rozrodczość u różnych gatunków zwierząt przedstawiono w tabeli 9.

Powyższe badania (tab. 9) wykazały, że D-limonen nie wykazuje szkodliwego działania na rozrodczość. W przypadku myszy i szczurów wartość NOAEL ustalona na poziomie 591 mg/kg mc. dla toksyczności matczynej i rozwojowej. U królików wartość NOAEL dla toksyczności matczynej wynosiła 250 mg/kg mc., natomiast dla toksyczności rozwojowej – 1000 mg/kg mc.

Po podaniu bardzo dużych dawek D-limonenu (>1000 mg/kg mc.) stwierdzono przypadki padnięć samic królików, natomiast po dawkach przekraczających 2000 mg/kg mc. – samic myszy i szczurów. U płodów obserwowano opóźnienia kostnienia kończyn, jednak występowały one wyłącznie po podaniu matkom najwyższych dawek D-limonenu.

TOKSYKOKINETYKA

Wchłanianie

D-limonen może wchłaniać się do organizmu człowieka drogą oddechową, przez skórę oraz drogą pokarmową.

D-limonen jest szybko wchłaniany przez płuca ze względu na jego wysoką rozpuszczalność we krwi. U ludzi poddanych ekspozycji na D-limonen w stężeniach: 10 mg/m^3; 225 mg/m^3 i 450 mg/m^3 przez 2 h, przy lekkiej aktywności fizycznej, średnie względne wchłanianie płucne wynosiło 63% przy najniższym stężeniu oraz 68% przy dwóch wyższych stężeniach. Po 2 h ekspozycji na D-limonen w stężeniu 10 mg/m^3 zmierzone stężenie związku we krwi wynosiło ok. 1,2 µmol/l (*Falk-Filipsson* i in 1993).

Wchłanianie D-limonenu przez skórę oceniano w eksperymencie, w którym rękę osoby badanej zanurzono w 98% D-limonenie przez 2h. Po zakończeniu ekspozycji dermalnej stężenie D-limonenu we krwi wynosiło 0,2 µmol/l, czyli było 6-krotnie mniejsze niż po ekspozycji inhalacyjnej. Ze względu na silnie drażniące działanie D-limonenu na skórę człowieka badanie przeprowadzono tylko jednokrotnie (*Falk* i in 1991).

Cal i in. (2001) ocenili przenikanie D-limonenu przez skórę w warunkach in vitro. Matryce poliuretanowe o średnicy 1,6 cm zanurzano w D-limonenie (≥97%, firmy Fluka) przez 24 h. Badania prowadzono w przepływowych celach dyfuzyjnych wykonanych z teflonu, o powierzchni dyfuzyjnej 0,65 cm^2, utrzymywanych w termostatowanym bloku w temperaturze 37°C.

W badaniach przenikalności wykorzystano ludzką skórę z klatki piersiowej, przechowywaną w stanie zamrożonym w temperaturze -20°C. Warstwy skóry (naskórek i skóra właściwa) izolowano techniką separacji cieplnej, zanurzając całą skórę w wodzie o temperaturze 60°C przez 45 s, a następnie ostrożnie usuwając naskórek. Analizę prowadzono za pomocą chromatografu gazowego wyposażonego w detektor płomieniowo-jonizacyjny.

Stwierdzono, że skóra właściwa nie stanowi bariery dla przenikania D-limonenu. Kinetyka przenikania związku przez skórę właściwą była bardzo podobna do kinetyki jego uwalniania bezpośrednio do płynu akceptorowego. Współczynnik przepuszczalności (*Kp*) dla D-limonenu przez skórę

Tabela 9. Działanie D-limonenu na rozrodczość u zwierząt
Table 9. Reproductive toxicity of D-limonene in animals

Gatunek, szczep, płeć, liczba zwierząt	Warunki narażenia (droga, dawka, czas)	Skutki narażenia	Piśmiennictwo
Szczury Wistar, 20 ciężarnych ♀/ grupę	zgłębnik żołądkowy: D-limonen; 0, 591, 2869 mg/kg mc.; codziennie od 9. do 15. dnia ciąży; 15 matek/grupę uśmiercono przed porodem; 5 matek/grupę odchowało potomstwo obserwowane do 7. tyg. życia	0 mg/kg mc – grupa kontrolna; 591 mg/kg mc – nie obserwowano efektów; NOAEL = 591 mg/kg mc. dla toksyczności matczynej i rozwojowej; 2869 mg/kg mc. – zmniejszenie masy ciała i zwiększona śmiertelność matek; u płodów opóźnienie kostnienia kości śródstopia i paliczków, bez innych wad rozwojowych; u potomstwa nieznacznie zmniejszony przyrost masy ciała oraz zmniejszona względna masa grasicy, śledziony, jajników	*Tsui* i in. 1975a
Myszy ICR, 20 ciężarnych ♀/ grupę	zgłębnik żołądkowy: D-limonen; 0, 591, 2363 mg/kg mc.; codziennie od 7. do 12. dnia ciąży; 15 matek/grupę uśmiercono przed porodem; 5 matek/grupę odchowało potomstwo obserwowane do 7. tyg. życia	0 mg/kg mc. – grupa kontrolna; 591 mg/kg mc. – nie obserwowano efektów; NOAEL = 591 mg/kg mc. dla toksyczności matczynej i rozwojowej; 2869 mg/kg mc. – zmniejszenie masy ciała matek; u płodów zwiększona częstość występowania dodatkowych i zrośniętych elementów żeber oraz opóźnienie kostnienia kończyn; u potomstwa nieznacznie zmniejszona względna masa narządów, bez innych nieprawidłowości	*Kodama* i in. 1977a
Króliki Japanese White, 10 ciężarnych ♀/ grupę lub 18 ciężarnych ♀/ grupę (najwyższa dawka)	drogą pokarmową: D-limonen w paszy; 0, 250, 500, 1000 mg/kg mc.; codziennie od 8. do 18. dnia ciąży	0 mg/kg mc. – grupa kontrolna; 250 mg/kg mc. –brak efektów; NOAEL = 250 mg/kg mc. dla toksyczności matczynej; 500 mg/kg mc. – zmniejszenie masy ciała matek i spożycia paszy, bez wpływu na parametry ciąży i potomstwo; 1000 mg/kg mc. – padnięcie 8/18 matek; u części płodów opóźnienie kostnienia kończyn, bez wpływu na masę ciała i masę narządów; NOAEL = 1000 mg/kg mc. dla toksyczności rozwojowej	*Kodama* i in. 1977b

Objaśnienia:
♂ – samce.
♀ – samice.
NOAEL – najwyższy poziom dawki, przy którym nie zaobserwowano szkodliwych efektów (ang. *No Observed Adverse Effect*).

właściwą wynosił 1,44 x 10^{-3} cm/h, a skumulowana ilość związku po 8 h wynosiła 1,23 mg/cm².

Naskórek stanowił barierę dla przenikania D-limonenu. Szybkość przenikania związku była wolniejsza w obecności naskórka. Współczynnik przenikalności D-limonenu przez naskórek wynosił 0,55 x 10^{-3} cm/h. Skumulowana ilość związku przenikającego przez naskórek po 8 h wynosiła 0,41 mg/cm², co stanowiło ok. 7,65% całkowitej dawki.

Duże ilości D-limonenu (ok. 1,5 mg/cm²) stwierdzono w warstwie rogowej naskórka, co wskazuje na wysokie powinowactwo związku do tej warstwy. Obliczony współczynnik log P dla D-limonenu wynosił 4,58 (±0,24), co potwierdza jego lipofilowy charakter.

Na podstawie uzyskanych wyników badań można stwierdzić, że D-limonen przenika przez skórę, wykazując szczególnie wysokie powinowactwo do warstwy rogowej naskórka, w której kumuluje się w znacznych ilościach (ok. 1,5 mg/cm²). Jednakże naskórek stanowi barierę dla przenikania D-limonenu, spowalniając ten proces w porównaniu z bezpośrednim uwalnianiem lub przenikaniem przez samą skórę właściwą.

Wchłanianie D-limonenu przez skórę badano również u myszy. Eksperyment przeprowadzony na tych zwierzętach wykazał znacznie szybsze wchłanianie dermalne D-limonenu w porównaniu obserwowanym u ludzi. Maksymalne stężenie związku we krwi u myszy po aplikacji dermalnej osiągnięto już po 10 minutach. Różnice te przypisuje się większej ilości krwi w stosunku do powierzchni skóry u myszy oraz większej gęstości mieszków włosowych w skórze myszy w porównaniu ze skórą ludzką (*Schäfer, Schäfer* 1982).

D-limonen po podaniu drogą pokarmową szybko wchłania się zarówno u ludzi, jak i u zwierząt.

U ludzi 52 ÷ 83% przyjętej dawki D-limonenu jest wydalane z moczem w ciągu 48 h. Biodostępność D-limonenu po podaniu doustnym wynosi ok. 43% (*Chen* i in. 1998; *Crowell* i in. 1992; *Igimi* i in. 1974; *Kim* i in. 2013; *Vigushin* i in 1998).

Dystrybucja

D-limonen jest szybko dystrybuowany do różnych tkanek organizmu i łatwo metabolizowany. Wysoka rozpuszczalność D-limonenu w tłuszczach wskazuje na jego szybkie rozmieszczenie do tkanki tłuszczowej po wchłonięciu.

Klirens D-limonenu z krwi u mężczyzn narażonych na działanie związku w stężeniu 450 mg/m^3 przez 2 h wynosił 1,1 L/kg/h (*Falk Filipsson* i in. 1993; MAK 2006; WHO 1998).

U szczurów Wistar obserwowano rozmieszczenie D-limonenu w organizmie po podaniu drogą pokarmową związku znakowanego izotopem promieniotwórczym węgla ^{14}C. Początkowo wysoką radioaktywność stwierdzano w wątrobie, nerkach i krwi, natomiast po 48 h jej ślady były znikome (*Igimi* i in. 1974 za: *Kim* i in. 2013). U szczurów Wistar–Furth D-limonen i jego metabolity pojawiały się w organizmie w ciągu 20 min od podania drogą pokarmową (*Crowell* i in. 1992; *Kim* i in. 2013).

U samców szczurów F344 stężenie D-limonenu było ok. trzykrotnie większe niż u samic, a ok. 40% związku było odwracalnie związane z α2μ-globuliną – specyficznym białkiem wykrywanym wyłącznie u samców szczurów (*Kim* i in. 2013; *Leman-McKeeman, Caudill* 1992; MAK 2006).

Metabolizm

D-limonen jest metabolizowany zarówno u ludzi, jak i u zwierząt. Głównymi metabolitami D-limonenu u szczurów są kwas perilowy oraz kwas dihydroperilowy. U ludzi D-limonen jest metabolizowany głównie do kwasu perilowego, kwasu dihydroperilowego oraz limonen-1,2 diolu.

Metabolity D-limonenu u ludzi zidentyfikowano w badaniu opisanym przez *Crowell* i in. (1994), w którym 7 osób spożyło 100 mg/kg D-limonenu dodanego do kremu budyniowego. Uczestnikom eksperymentu pobrano krew przed rozpoczęciem badania oraz po 4 h i 24 h w celu analizy metabolitów D-limonenu. Analiza metodą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC/MS) wykazała obecność co najmniej pięciu związków po 4 h, których nie obserwowano na początku badania.

Dwa główne piki zidentyfikowano jako metabolity D-limonenu występujące u szczurów: kwas dihydroperilowy oraz kwas perilowy. Dwa mniejsze piki odpowiadały estrom metylowym tych kwasów. Trzeci główny pik zidentyfikowano jako limonen-1,2-diol. Sam D-limonen występował w mniejszym stężeniu (*Crowell* i in. 1994).

U szczurów i myszy stwierdzono różnice w metabolizmie D-limonenu. Wykazano, że jeden z metabolitów pośrednich D-limonenu, D-limonen-1,2-oksyd, wiąże się z białkiem α2μ-globuliną w nerkach samców szczurów. Powstały kompleks jest wolniej rozkładany w lizosomach, co prowadzi do akumulacji α2μ-globuliny oraz powstawania charakterystycznych zmian nefropatycznych u samców szczurów.

D-limonen oraz D-limonen-1,2-diol również wiążą się z α2μ-globuliną u samców szczurów. U samic szczurów oraz u samców i samic myszy nie stwierdzono wiązania D-limonenu ani jego metabolitów z białkami moczu. U myszy białko podobne do α2μ-globuliny nie jest zwrotnie wchłaniane w nerkach, co wyjaśnia brak występowania analogicznej nefropatii (*Lehman* i in. 1992; MAK 2006; *Rodriguez* i in. 1991).

Wydalanie

U ludzi i szczurów biologiczny okres półtrwania D-limonenu mieści się w zakresie 12 ÷ 24 h, a wydalanie związku zachodzi głównie z moczem (*Crowell* i in. 1992; *Igimi* i in. 1974; *Kim* i in. 2013; *Kodama* i in. 1976).

U ludzi po inhalacyjnej ekspozycji na D-limonen jedynie niewielka część (1%) wchłoniętej dawki była wydychana w postaci niezmienionej, natomiast bardzo mała ilość (0,003%) była wydalana z moczem.

U samców szczurów po wielokrotnym podawaniu D-limonenu drogą pokarmową przez zgłębnik żołądkowy obserwowano zależny od dawki wzrost wydalania α2μ-globuliny z moczem (*Saito* i in. 1991).

Podsumowując, D-limonen jest dobrze wchłaniany drogą inhalacyjną, słabiej przez skórę, a po podaniu doustnym ulega znacznemu metabolizmowi. Związek wykazuje tendencję do rozmieszczania się w tkankach bogatych w lipidy. U samców szczurów specyficzny metabolizm oraz wiązanie z α2μ-globuliną w nerkach prowadzą do unikalnych

efektów toksykologicznych, które nie są obserwowane u innych gatunków ani u samic szczurów. Wydalanie zachodzi głównie z moczem w postaci metabolitów.

MECHANIZM DZIAŁANIA TOKSYCZNEGO

Najistotniejszym efektem działania D-limonenu jest jego działanie drażniące na skórę i błony śluzowe. Wynika ono z faktu, że D-limonen bardzo dobrze rozpuszcza się w tłuszczach, przez co przenika do warstwy lipidowej błon komórkowych oraz warstwy ochronnej śluzu. D-limonen w obecności tlenu i światła łatwo ulega utlenieniu do hydroperoksydów, karwonu i innych pochodnych. Produkty utlenienia D-limonenu wykazują silniejsze działanie drażniące niż czysty, nieutleniony D-limonen oraz mogą wywoływać reakcje alergiczne.

Produkty utlenienia D-limonenu mogą zwiększać stres oksydacyjny i nasilać aktywację receptorów czuciowych (TRP, ang. *Transient Receptor Potential*), m.in. TRPA1 i TRPV1, zlokalizowanych na zakończeniach nerwu trójdzielnego. Aktywacja receptorów TRP powoduje uczucie pieczenia, łzawienie, kichanie oraz ból, czyli typowe objawy podrażnienia (Kaimoto i in. 2016; *Rohr* i in. 2002).

Badania wskazują, że istotnym efektem działania D-limonenu jest również jego potencjalne działanie toksyczne na wątrobę. Biotransformacja D-limonenu zachodzi głównie z udziałem układu cytochromu P450. Proces ten prowadzi do powstawania szeregu hydroksylowanych i epoksydowych metabolitów. Powstałe metabolity są związkami o wysokiej reaktywności chemicznej, które mogą generować reaktywne formy tlenu. Te z kolei mogą uszkadzać mitochondria, prowadząc do upośledzenia β-oksydacji kwasów tłuszczowych, a w konsekwencji do akumulacji lipidów w wątrobie (*Ramos* i in 2018).

Innym efektem wywołanym przez D-limonen, istotnym jednak wyłącznie u samców szczurów, jest jego toksyczne działanie na nerki. Mechanizm powstawania guzów nerek u samców szczurów wiąże się z obecnością białka α2μ-globuliny (α2μ-G), syntetyzowanego w wątrobie i zwrotnie wchłanianego w kanalikach nerkowych. U samców stężenie tego białka w moczu jest znacznie wyższe niż u samic.

α2μ-G jest wolno degradowana w lizosomach, a po związaniu z niektórymi związkami chemicznymi, np. D-limonenem, tworzy trudno rozkładalne kompleksy. Kompleksy te gromadzą się w kanalikach nerkowych, powodując nefropatię charakteryzującą się powstawaniem kropli hialinowych, martwicą komórek i zwiększoną regeneracją nabłonka. Przewlekła proliferacja komórek prowadzi do rozwoju gruczolaków i gruczolakoraków nerek w sposób zależny od dawki. Ponieważ u ludzi nie stwierdzono istotnej produkcji α2μ-G, uznaje się, że mechanizm ten nie ma znaczenia dla zdrowia człowieka (*Hard*, *Whysner* 1994; *Whysner, Williams* 1996).

DZIAŁANIE ŁĄCZNE

Jednoczesne narażenie na D-limonen oraz inne substancje o działaniu drażniącym, np. detergenty, rozpuszczalniki organiczne czy inne substancje zapachowe, może nasilać działanie drażniące D-limonenu. Przypadki alergii kontaktowej wywołanej działaniem D-limonenu i innych czynników opisano w rozdziale: „Działanie toksyczne na ludzi – toksyczność przewlekła".

ZALEŻNOŚĆ EFEKTU TOKSYCZNEGO OD WIELKOŚCI EKSPOZYCJI

W tabeli 10 przedstawiono wartości NOAEL (ang. *No Observed Adverse Effect Level*), czyli poziomy dawek, przy których nie obserwowano działania szkodliwego, wyznaczone w badaniach na różnych gatunkach zwierząt po narażaniu drogą pokarmową, oraz wartości NOEL i RD_{50} określone w badaniach inhalacyjnych u myszy.

Przedstawione w tabeli 10 wyniki wskazują, że toksyczność D-limonenu zależy od wielkości i czasu narażenia, drogi podania, a także od gatunku i płci zwierząt. Po wielokrotnym narażeniu drogą pokarmową dominującymi efektami były zmiany w nerkach i wątrobie. Największą wrażliwość wykazywały samce szczurów, u których nefrotoksyczność obserwowano przy dawkach większych niż 5 mg/kg mc., a wartość NOAEL ustalono na poziomie 5 mg/kg mc. U innych gatunków zwierząt oraz u samic szczurów efekty toksyczne obserwowano dopiero po zastosowaniu znacznie większych dawek. W badaniach inhalacyjnych poziom bez obserwowanych efektów (NOEL) dla podrażnienia sensorycznego u myszy oszacowano na 100 ppm (565 mg/m^3), a wartość RD_{50} odpowiadającą za zmniejszenie częstości oddechów o 50% wyznaczono na poziomie 1076 ppm (6082 mg/m^3).

Tabela 10. Zależność efektów toksycznych od wielkości narażenia
Table 10. Relationship between exposure level and toxic effects

Gatunek, szczep, płeć i liczba zwierząt, droga podania, warunki narażenia, czas	Wartość NOAEC/NOAEL	Efekt	Piśmiennictwo
Narażenie drogą pokarmową			
Szczury F344; 10 ♂ / grupę; D-limonen w oleju kukurydzianym; przez zgłębnik żołądkowy; 0, 2, 5, 10, 30, 75 mg/kg mc.; 5 dni/tydz. przez 13 tyg.	NOAEL – 5 mg/kg mc. ♂ NOAEL – 30 mg/kg mc. ♂	działanie toksyczne na nerki u ♂ szczurów działanie toksyczne na wątrobę u ♂ szczurów	*Webb* i in. 1989
Szczury F344; 10 ♀/ grupę; D-limonen w oleju kukurydzianym; przez zgłębnik żołądkowy; 0, 150, 300, 600, 1200 i 2400 mg/kg mc.; 5 dni/tydz. przez 13 tyg.	NOAEL – 300 mg/kg mc. ♀	działanie toksyczne na wątrobę i nerki u ♀ szczurów	NTP 1990
Myszy B6CF1; 10 ♂ + 10 ♀/ grupę; D-limonen w oleju kukurydzianym; przez zgłębnik żołądkowy; 0, 125, 250, 500, 1000, 2000 mg/kg mc.; 5 dni/tydz. przez 13 tyg.	NOAEL – 250 mg/kg mc.	działanie toksyczne na wątrobę	NTP 1990
Psy Japońskie Beagle; 5 ♂ + 5 ♀/grupę; D-limonen przez zgłębnik żołądkowy; 0, 100, 1000 mg/kg mc., codziennie przez 6 miesięcy	NOAEL – 100 mg/kg mc.	działanie toksyczne na nerki u psów	*Webb* i in. 1990
Szczury Wistar; 20 ciężarnych ♀/ grupę; D-limonen; przez zgłębnik żołądkowy; 0, 591, 2869 mg/kg mc.; codziennie od 9.do 15. dnia ciąży	NOAEL – 591 mg/kg mc.	toksyczność matczyna i rozwojowa	*Tsui* i in. 1975a
Myszy ICR; 20 ciężarnych ♀/grupę; D-limonen; przez zgłębnik żołądkowy; 0, 591, 2363 mg/kg mc.; codziennie od 7. do 12.dnia ciąży	NOAEL – 591 mg/kg mc.	toksyczność matczyna i rozwojowa	*Kodama* i in. 1977a
Króliki Japanese White; 10 lub 18 ciężarnych ♀/grupę; D-limonen z paszą; 0, 250, 500, 1000 mg/kg mc.; codziennie od 8. do 18. dnia ciąży	NOAEL – 250 mg/kg mc.	toksyczność matczyna i rozwojowa	*Kodama* i in. 1977b
Narażenie inhalacyjne			
Myszy BALB/c; 56 ♂; komora inhalacyjna (10 ÷ 30 min); 197 ÷ 1599 ppm (1095 ÷ 8890 mg/m^3)	NOEL – 100 ppm (565 mg/m^3)	podrażnienie sensoryczne (wywołane przez substancję chemiczną) stymuluje receptory czuciowe (np. nerwy trójdzielne / zakończenia nerwowe w nosie, jamie nosowo-gardłowej, oczach), bez natychmiastowego uszkodzenia tkanek, ale wywołując subiektywne doznania, takie jak: pieczenie, szczypanie, łzawienie, kichanie, ból, uczucie duszności czy zmiany w zachowaniu oddechowym. U myszy podrażnienie sensoryczne objawia się jako spadek częstości oddechów oraz wzrost czasu pomiędzy zakończeniem wdechu a rozpoczęciem wydechu	*Larsen* i in 2000

cd. tab. 10/Table 10 cont.

Gatunek, szczep, płeć i liczba zwierząt, droga podania, warunki narażenia, czas	Wartość NOAEC/NOAEL	Efekt	Piśmiennictwo
Myszy BALB/c; 56 ♂; komora inhalacyjna (10 ÷ 30 min) 197 ÷ 1599 ppm (1095 mg/m^3 ÷ 8890 mg/m^3)	RD_{50} – 1076 ppm (6082 mg/m^3)	zmniejszenie częstości oddechów o 50%	*Larsen* i in 2000

Objaśnienia:
♂ – samce.
♀ – samice.
NOAEL – najwyższy poziom dawki, przy którym nie zaobserwowano szkodliwych efektów (ang. *No Observed Adverse Effect*).
NOEL – najwyższy poziom stężenia, przy którym nie obserwowano żadnych efektów (ang. *No Observed Effect Level*).
RD_{50} – stężenie powodujące zmniejszenie częstości oddechów o 50%.

NAJWYŻSZE DOPUSZCZALNE STĘŻENIE (NDS) W POWIETRZU NA STANOWISKACH PRACY ORAZ DOPUSZCZALNE STĘŻENIE W MATERIALE BIOLOGICZNYM (DSB)

Istniejące wartości NDS i DSB

W Polsce dotychczas nie ustalono wartości najwyższego dopuszczalnego stężenia (NDS) dla D-limonenu w powietrzu środowiska pracy.

Wartości normatywów higienicznych D-limonenu obowiązujące w innych krajach przedstawiono w tabeli 11.

Dopuszczalne poziomy narażenia zawodowego w innych krajach europejskich wahają się od 28 mg/m^3 (Niemcy) do ok. 170 mg/m^3 (AIHA, OARs and WEELs oraz Hiszpania). W Niemczech w 2005 r. wartość dopuszczalna dla D-limonenu została ustalona na poziomie 110 mg/m^3, a w 2012 r. eksperci MAK zdecydowali o obniżeniu wartości do 28 mg/m^3.

Podstawą wyznaczenia wartości OEL na poziomie 28 mg/m^3 było działanie toksyczne D-limonenu na wątrobę samców szczurów. Eksperci uznali, że efektem krytycznym dla D-limonenu jest zwiększenie względnej masy wątroby u samców szczurów. W badaniu opisanym przez *Webb* i in. (1989) szczury były narażane na D-limonen podawany w oleju kukurydzianym przez zgłębnik żołądkowy 5 dni w tygodniu przez 13 tygodni. Na podstawie wyników tego badania wartość NOAEL (ang. *No Observed Adverse Effect Level*) ustalono na poziomie 30 mg D-limonenu/kg mc./dzień. Eksperci uznali, że indukcja enzymów, która prowadzi do zwiększenia masy wątroby, prawdopodobnie osiąga maksimum w ciągu 90 dni (tj. w okresie 13 tygodni). Uwzględniając różnice międzygatunkowe oraz odpowiednie współczynniki, ostatecznie przyjęto wartość 28 mg/m^3 (5 ppm).

Eksperci z AIHA (ang. *American Industrial Hygiene Association*) i OARS (ang. *The Occupational Alliance for Risk Science*) przyjęli wartość dopuszczalnego poziomu narażenia zawodowego dla D-limonenu na poziomie 30 ppm (ok. 170 mg/m^3). Wartość 30 ppm zaproponowali autorzy publikacji *Larsen* i in. (2000), w której według autorów szacunkowe wartości progowe (OEL), które mogłyby zapobiegać wystąpieniu podrażnienia czuciowego, wynoszą ok. 30 ppm dla D-limonenu (ok. 170 mg/m^3).

Podstawy proponowanej wartości NDS

Na podstawie badań opisanych we wcześniejszych rozdziałach uznano, że skutkiem krytycznym działania D-limonenu u ludzi i zwierząt jest podrażnienie sensoryczne górnych dróg oddechowych. Biorąc pod uwagę narażenie inhalacyjne na D-limonen w środowisku pracy, efekt ten wydaje się najbardziej istotny. Ponieważ, obok działania drażniącego D-limonenu na drogi oddechowe, istotne jest również jego działanie układowe na wątrobę i nerki, zdecydowano o wyznaczeniu wartości NDS trzema sposobami i obliczeniu wartości średniej.

1. W badaniu inhalacyjnym przeprowadzonym przez *Larsena* i in. (2000) wyznaczona wartość RD_{50} (stężenie zmniejszające częstość oddechów o 50%) dla myszy BALB/cA w pierwszych 10 minutach ekspozycji wyniosła 1076 ppm (6083 mg/m^3). Zaproponowano wartość NDS dla D-limonenu, uwzględniając 0,01 tej wartości.

NDS = 1076 ppm · 0,01 = 10,76 ppm = ok. 60,8 mg/m^3

2. Uwzględniając działanie toksyczne D-limonenu na wątrobę, wyznaczono wartość NDS na podstawie badań przeprowadzonych na myszach B6CF1 (NTP 1990). Myszy otrzymywały D-limonen o stężeniu >99% w oleju kukurydzianym przez zgłębnik żołądkowy, 5 dni w tygodniu przez 13 tygodni. Wartość NOAEL w tym badaniu ustalono na poziomie 250 mg/kg mc.

Tabela 11. Normatywy higieniczne D-limonenu w wybranych państwach (AIHA 1993; OARs and WEELs 2025; GESTIS 2025; MAK 2012; List of MAK and BAT Values 2025)
Table 11. Occupational exposure limits for D-limonene in selected countries (AIHA 1993; OARs and WEELs 2025; GESTIS 2025; MAK 2012; List of MAK and BAT Values 2025)

Państwo	Wartość NDS, mg/m³ (ppm)	Wartość NDSCh, mg/m³ (ppm)
Finlandia	140 (25)	280 (50) 15-minutowa średnia wartość
Niemcy (AGS)	28 (5) Skóra	110 (20) 15-minutowa średnia wartość
Niemcy (DFG)	28 (5) Skóra	112 (20) 15-minutowa średnia wartość
Norwegia	140 (25)	–
Hiszpania	168 (30) Skóra	–
Szwajcaria	40 (7)	80 (14)
AIHA, OARs and WEELs	170 (30)	–

Dawkę (D_w) = 250 mg/kg mc. dla myszy przeliczono na ekwiwalentne dzienne stężenie dla człowieka (C), pobrane w ciągu 8 h, w następujący sposób:

$$C = \frac{D_w \cdot W_h}{V_h} = \frac{250 \cdot 70}{10} = 1750 \text{ mg/m}^3$$

gdzie:
W_h – masa człowieka (70 kg),
V_h – objętość powietrza wdychanego przez człowieka w ciągu 8 h (10 m³).

Wartość NDS wyliczono w następujący sposób:

$$\text{NDS} = \frac{\text{NOAEC}}{A \cdot B \cdot C \cdot D \cdot E} = \frac{1750 \text{ mg/m}^3}{2 \cdot 3 \cdot 2 \cdot 1 \cdot 2} = \frac{1750 \text{ mg/m}^3}{24} = 2{,}9 \text{ mg/m}^3$$

gdzie:
$A = 2$ – współczynnik związany z różnicami wrażliwości osobniczej u ludzi,
$B = 3$– różnice międzygatunkowe i droga podania (myszy narażane dożołądkowo przez zgłębnik),
$C = 2$ – przejście z narażenia krótkoterminowego do przewlekłego (badanie 13-tygodniowe),
$D = 1$ – zastosowano wartość NOAEL,
$E = 2$ – współczynnik modyfikacyjny (dotyczy oceny kompletności danych oraz potencjalnych skutków odległych).

3. Do wyznaczenia wartości NDS uwzględniono również potencjalne działanie toksyczne D-limonenu na nerki u psów rasy Japońskie Beagle. W eksperymencie 6-miesięcznym psom codziennie podawano D-limonen przez sondę dożołądkową. Wartość NOAEL w tym badaniu ustalono na poziomie 100 mg/kg mc. (*Webb* i in. 1990; MAK 2006).

Dawkę (D_w) = 100 mg/kg mc. dla psów przeliczono na ekwiwalentne dzienne stężenie dla człowieka (C), pobrane w ciągu 8 h w następujący sposób:

$$C = \frac{D_w \cdot W_h}{V_h} = \frac{100 \cdot 70}{10} = 700 \text{ mg/m}^3$$

gdzie:
W_h – masa człowieka (70 kg).
V_h – objętość powietrza wdychanego przez człowieka w ciągu 8h (10 m³).

Wartość NDS wyliczono w następujący sposób:

$$\text{NDS} = \frac{\text{NOAEC}}{A \cdot B \cdot C \cdot D \cdot E} = \frac{700 \text{ mg/m}^3}{2 \cdot 3 \cdot 1 \cdot 1 \cdot 2} = \frac{700 \text{ mg/m}^3}{12} = 58{,}3 \text{ mg/m}^3$$

gdzie:
$A = 2$ – współczynnik związany z różnicami wrażliwości osobniczej u ludzi,
$B = 3$ – różnice międzygatunkowe i droga podania (psy narażane przez sondę dożołądkowo),

C = 1– przejście z narażenia krótkoterminowego do przewlekłego (badanie 6-miesięczne),
D = 1– zastosowano wartość NOAEL,
E = 2 – współczynnik modyfikacyjny (dotyczy oceny kompletności danych oraz potencjalnych skutków odległych).

Uwzględniając wartości NDS dla D-limonenu obliczone trzema metodami, wyznaczono średnią wartość wynoszącą 64 mg/m^3 (11,3 ppm). Na podstawie uzyskanych wyników oraz z uwzględnieniem normatywów higienicznych obowiązujących w innych krajach zaproponowano wartość NDS równą 60 mg/m^3 (10,6 ppm).

Ze względu na działanie drażniące D-limonenu zaproponowano wartość NDSCh równą 120 mg/m^3 (21,2 ppm) oraz adnotację: „I" – substancja o działaniu drażniącym. Z uwagi na możliwość wchłaniania D-limonenu przez skórę zaproponowano również oznaczenie substancji notacją „skóra". Nie ma podstaw do ustalenia wartości dopuszczalnego stężenia w materiale biologicznym (DSB) dla D-limonenu.

PIŚMIENNICTWO

AIHA (1993). The American Industrial Hygiene Association. OEL Table. https://www.aiha.org/get-involved/aiha-guideline-foundation/oel/oel-table [dostęp: sierpień 2027]

Alonso-Gutierrez J., Chan R., Batth T. S. i in. (2013). Metabolic engineering of Escherichia coli for limonene and perillyl alcohol production. Metab. Eng. 19, 33–41. DOI: 10.1016/j.ymben.2013.05.004.

Ariyoshi T., Arakaki M., Ideguchi K. i in. (1975). Studies on the metabolism of D-limonene (*p*-Mentha-1,8-diene). III. Effects of D-limonene on the lipids and drug-metabolizing enzymes in rat livers. Xenobiotica 5(1), 33–8. DOI: 10.3109/00498257509056091.

Cal K., Janicki S., Sznitowska M. (2001). In vitro studies on penetration of terpenes from matrix-type transdermal systems through human skin. Int. J. Pharm. 224, 81–88.

Chen H., Chan K. K., Budd T. (1998). Pharmacokinetics of D-limonene in the rat by GC-MS assay. J. Pharm. Biomed. Anal. 17, 631–640.

Crowell P.L., Lin S., Vedejs E. i in. (1992). Identification of metabolites of the antitumor agent D-limonene capable of inhibiting protein isoprenylation and cell growth. Cancer Chemother. Pharmacol. 31, 205–212. DOI: 10.1007/BF00685549.

*Crowell P.L., Elson C.E., Bailey H.H.*i i in. (1994). Human metabolism of the experimental cancer therapeutic agent D-limonene. Cancer Chemother Pharmacol 35, 31–37.

Danish Ministry of the Environment, Environmental Protection Agency (2013). Evaluation of Health Hazards by Exposure to D-Limonene and Proposal of a Health-Based Quality Criterion for Ambient Air. Environmental Project No. 1496.

Dietrich D.R., Swenberg J.A. (1991 a). NCI-Black-Reiter (NBR) male rats fail to develop renal disease following exposure to agents that induce a-2u-Globulin nephropathy. Fundam. Appl. Toxicol. 16, 719–762. DOI: 10.1016/0272-0590(91)90161-v.

Dornic N., Roudot A.C., Batardière A. i in. (2018). Aggregate exposure to common fragrance compounds: Comparison of the contribution of essential oils and cosmetics using probabilistic methods and the example of limonene. Food Chem. Toxicol. 116 (Pt. B), 77–85. DOI: 10.1016/j.fct.2018.04.017.

ECHA, European Chemicals Agency (2023). Registration Dossiers: (*R*)-*p*-mentha-1,8-diene. https://echa.europa.eu/pl/substance-information/-/substanceinfo/100.025.284 [dostęp: sierpień 2026].

El-Bayoumy K., Upadhyaya P., Desai D.H. i in. (1996). Effects of 1,4- phenylenebis(methylene)selenocyanate, phenethyl isothiocyanate, indole-3-carbinol, and D-limonene individually and in combination on the tumorigenicity of the tobacco-specific nitrosamine 4- (methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in A/J mouse lung. Anticancer Res. 16, 2709–2712. PMID: 8917375.

Elcombe C.R., Odum J., Foster J.R., i in. (2002). Prediction of rodent nongenotoxic carcinogenesis: Evaluation of biochemical and tissue changes in rodents following exposure to nine nongenotoxic NTP carcinogens. Environ. Health Perspect. 110, 363–375.

EPA (1994) U.S. Environmental Protection Agency. Limonene. EPA-738-F-94-030, 1–5. https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/pdf/3083.pdf [dostęp: sierpień 2026].

Falk A., Fischer T, Hagberg M. (1991). Purpuric rash caused by dermal exposure to D-limonene. Contact Dermatitis 25, 198–199.

Falk-Filipsson A., Löf A, Hagberg M., i in.(1993). D-limonene exposure to humans by inhalation: uptake, distribution, elimination, and effects on the pulmonary function. J. Toxicol. Environ. Health 38, 77–88.

Fahrig R. (1982). Prog. Clin. Biol. Res. 109, 339 (cyt. za MAK 1990).

Fahrig R. (1985). BGA Schriften 6, 58 (cyt. za MAK 1990).

FDA (2011). U.S. Food and Drug Administration, Synthetic flavoring substances and adjuvants. 21 CFR §182.60. https://www.ecfr.gov/current/title-21/chapter-I/subchapter-B/part-182/subpart-A/section-182.60 [dostep: sierpień 2026].

Florida Chemical Co. (1991). Marketing data sheet: D-limonene. Lake Alfred, FL. (cyt. za WHO 1998).

Florin I., Rutberg L., Curvall M. i in. (1980). Screening of tabacco smoke constituents for mutagenicity using the Ames' test. Toxicology 15, 219–232. DOI:10.1016/0300-483X(80)90055-4.

Gawarecka A., Wróblewska A., Pełech R. (2015). Epoksydacja limonenu na wybranych katalizatorach tytanowo-silikalitowych. Technical Issues 2, 9–15.

GIS (2025). Dane Głównego Inspektoratu Sanitarnego dotyczące narażenia pracowników na wybrane substancje chemiczne (dane udostępnione przez CIOP-PIB).

GESTIS (2025). International Limit Values (dguv.de).

Gould M.N. (1995). Prevention and therapy of mammary cancer by monoterpenes. J. Cell. Biochem. 22 (Suppl.), 139–144 (cyt. za IARC 1999).

Juyal V. (2024) Global D-limonene Market Size, Share, and Trends Analysis Report: Industry Overview and Forecast to 2032. Chemical and Materials Nov 2024. Global 350. Pages No of Tables: 220 No of Figures: 60 Author. https://www.databridgemarketresearch.com/reports/global-D-limonene-market.

Hard G.C. Whysner J. (1994). Risk assessment of D-limonene: An example of male rat-specific renal tumorigens. Crit. Rev. Toxicol. 24(3), 231–254. DOI: 10.3109/10408449409021607.

Hooser S.B., Beasley V.R. , Everitt J.I. (1986). Effects of an insecticidal dip containing D-limonene in the cat. J. Am. Vet. Med. Assoc. 189, 90–908.

IARC, International Agency for Research on Cancer(1993). Some naturally occurring substances food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum. 56. Lyon: International Agency for Research on Cancer.

IARC, International Agency for Research on Cancer (1999). D-limonene. IARC Monogr. Eval. Carcinogen. Risk Hum. 73, 307. https://www.inchem.org/documents/iarc/vol73/73-11.html [dostep: sierpień 2026].

Igimi H., Hisatsugu T, Nishimura M. (1976). The use of D-limonene preparation as a dissolving agent of gallstones. Clinical Trial. Am. J. Dig. Dis. 21(11), 926-39. DOI: 10.1007/BF01071903.

Igimi H., Nishimura M., Kodama R., i in. (1974). Studies on the metabolism of D-limonene (*p*-mentha-1,8-diene): I. The absorption, distribution and excretion of D-limonene in rats. Xenobiotica 4, 77–84.

IPCS, International Programme on Chemical Safety (1994). Assessing health risks of chemicals: Derivation of Guidance Values for Healthbased Exposure Limits. Geneva: World Health Organization.

IPCS, International Programme on Chemical Safety (2005). D-limonene. http://www.inchem.org/documents/icsc/icsc/eics0918.htm [dostęp: sierpień 2026].

Jongedijk E., Cankar K., Buchhaupt M. i in. (2016). Biotechnological production of limonene in microorganisms. Appl. Microbiol. Biotechnol. 100(7), 2927–38. DOI: 10.1007/s00253-016-7337-7.

Kaimoto T., Hatakeyama Y., Takahashi K. i in. (2016). Involvement of transient receptor potential A1 channel in algesic and analgesic actions of the organic compound limonene. Eur. J. Pain (EJP). DOI: 10.1002/ejp.840.

Kanerva R.L., Ridder G.M., Lefever F.R., i in. (1987). Comparison of shortterm renal effects due to oral administration of decalin or D-limonene in young adult male Fischer-344 rats. Food Chem. Toxicol. 25, 345–353. DOI: 10.1016/0278-6915(87)90167-0.

Karlberg A.T., Lindell B. (1993). Limonen. Arbete och Hälsa 1993:14. Nordiska Expertgruppen för Gränsvärdesdokumentation. Arbetarskyddsverket 1–38.

Kim Y.W, Kim M.J., Chung B.Y. i in. (2013). Safety evaluation and risk assessment of D-limonene. J. Toxicol.

Klefer M., Bresler F., Sallabury S. (1993). NIOSH health hazard evaluation for D-limonene. Occupational and Environmental Health Directorate, Industrial Hygiene. Air Force Materiel Command Brooks Air Force Base, Texas.

Kodama R., Inoue H., Noda K. i in.(1976). Effect of D-limonene and related compounds on bile flow and biliary lipid composition in rats and dogs. Life Sci. 19(10), 1559–1567. DOI: 10.1016/0024-3205(76)90102-8.

Kodama R., Okubo A., Araki E. i in. (1977a). Studies on D-limonene as a gallstone solubilizer (VII): Effects on development of mouse fetuses and offspring. Oyo Yakuri 13, 863–873.

Kodama, R., Okubo, A., Sato, K. i in. (1977b). Studies on D-limonene as a gallstone solubilizer (IX): Effects on development of rabbit fetuses and offspring. Oyo Yakuri 13, 885–898.

Larsen S.T., Hougaard K.S., Hammer M. i in. (2000). Effects of R-(+)- and S-(-)-limonene on the respiratory tract in mice. Hum. Exp. Toxicol. 19, 457–466.

Lehman-McKeeman, L.D., Caudill D. (1992). Biochemical basis for mouse resistance to hyaline droplet nephropathy: Lack

of relevance of the alpha α2μ-globulin protein superfamily in this male rat-specific syndrome. Toxicol. Appl. Pharmacol. 112, 214–221.

Le Bourhis B., Soenen A. M .(1973). Food Cosmet. Toxicol. 11, 1 (cyt. za MAK 1990).

Leroy E.P. (1984). Fed. Proc. 43(4), Abstract 3473. (cyt. za MAK 1990).

MAK (1990). MAK value documentations – limonene. Deutsche Forschungsgemeinschaft. Ständige Senatskommission zur Prüfung Gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe. DOI: 10.1002/3527600418.mb13886isme0001.

MAK (2006). MAK-Begründungen – D-limonen. Deutsche Forschungsgemeinschaft. Ständige Senatskommission zur Prüfung Gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe. DOI: 10.1002/3527600418.mb13886ismd0040.

MAK (2012). MAK-Begründungen – D-limonen – limonene. Deutsche Forschungsgemeinschaft. Ständige Senatskommission zur Prüfung Gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe. DOI: 10.1002/3527600418.mb13886ismd0052.

Malko M.W., Wróblewska A. (2016). Znaczenie R-(+)-limonenu, jako surowca do syntez w chemii organicznej i dla przemysłu organicznego. CHEMIK 70(4), 193–202.

Maltzman T.H., Hurt L.M., Elson C.E. i in. (1989). The prevention of nitrosomethylurea-induced mammary tumors by D-limonene and orange oil. Carcinogenesis 10(4), 781–783. DOI: 10.1093/carcin/10.4.781.

Mølhave L., Kjærgaard S.K., Hempel-Jørgensen A. i in. (2000). The eye irritation and odor potencies of four terpenes which are major constituents of the emissions of VOCs from Nordic soft woods. Indoor Air. 10, 315–318. DOI: 10.1034/j.1600-0668.2000.010004315.x.

Moreno O.M. (1972). (cyt. za MAK 1990).

NICNAS, National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme (2002). Priority existing chemical assessment report No 22. https://www.industrialchemicals.gov.au/sites/default/files/PEC22-Limonene.pdf [dostęp: sierpień 2026].

NTP, National Toxicology Program (1990). Toxicology and carcinogenesis studies of D-limonene in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies). NTP Technical Report 347. NIH Publication No. 88–2802. Research Triangle Park, NC: U.S. Department of Health and Human Services.

OARS-WEEL (2025). The Occupational Alliance for Risk Science. Table of chemicals. https://tera.org/oars-weel/ [dostęp: sierpień 2027]

Opdyke D.L.J. (1975). Food Cosmet. Toxicol. 13, 825 (cyt. za MAK 1990).

O'Shaughnessy J.A. (1996). Chemoprevention of breast cancer. J. Am. Med. Assoc. 275, 1349–1353 (cyt. za IARC 1993).

Pagliaro M., Fabiano-Tixier A.S., Ciriminna R. (2023). Limonene as a natural product extraction solvent. Green Chem. 25, 6108–6119. DOI: 10.1039/D3GC02068A.

Pakdel H., Pantea D.M., Roy C. (2001). Production of D-limonene by vacuum pyrolysis. Anal. Appl. Pyrolysis 57, 91–107.

Pesonen M., Suomela S., Kuuliala O. i in. (2014). Occupational contact dermatitis caused by D-limonene. Contact Dermatitis 71(5). DOI: 10.1111/cod.12287.

PubChem (2025). 4S-1-methyl-4-prop-1-en-2-ylcyclohexene. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4S_-1-methyl-4-prop-1-en-2-ylcyclohexene [dostęp: sierpień 2026].

Ramos C.A., de Cássia R. Alves M.F., Benedito R.B. i in. (2015). Histopathological and biochemical assessment of D-limonene-induced liver injury in rats. Toxicol. Rep. 2, 482–488. https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2015.01.001 [dostęp: sierpień 2026].

Ravichandran C., Badgujar P.C., Gundev P. i in. (2018). Food Chem. Toxicol. 120, 668–680. DOI: 10.1016/j.fct.2018.07.052.

Riedel H. (1940). Klin. Wschr. 19, 1034. (cyt. za MAK 1990).

Rohr A.C., Wilkins C.K. , Clausen P.A. i in. (2002). Upper airway and pulmonary effects of oxidation products of (+)-alpha-pinene, D-limonene, and isoprene in BALB/c mice. Inhal. Toxicol. 14(7), 663–84. DOI: 10.1080/08958370290084575.

Rodriguez P.A., Takigiku R., Lehman-McKeeman L.D. i in. (1991). Design of a gas chromatograph with parallel radioactivity and mass spectrometric detection. Application to the identification of the major metabolite of D-limonene associated with a2u-globulin. J. Chromatogr. 563, 271–282.

Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmieniające i uchylające dyrektywy 67/548/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1907/2006 (rozporządzenie CLP). Dz. Urz. UE L353 z 31.12.2008, s. 1–1355.

Saito K., Uwagawa S., Kaneko H. i in. (1991). Behavior of alpha2u-globulin accumulating in kidneys of male rats treated with D-limonene: Kidney-type alpha2u-globulin in the urine as a marker of D-limonene nephropathy. Toxicology 70(2), 173-83. DOI: 10.1016/0300-483x(91)90044-2.

Schäfer R., Schäfer W. (1982). Die perkutane resorption verschiedener terpene – menthol, campher, limonen, isobornylacetat, a-pinen – aus badezusätzen. Arzneim.-Forsch. 32, 56–58.

SCOEL, Scientific Committee on Occupational Exposure Limits (2017). Methodology for derivation of occupational exposure limitsof chemical agents. The General Decision-Making Framework of the Scientific Committee on Occupational Exposure Limits.

Sekihashi K., Yamamoto A., Matsumura Y. i in. (2002). Comparative investigation of multiple organs of mice and rats in the comet assay. Mutat. Res. 517, 53–74.

Stoner G.D., Shimkin M.B., Kniazeff A.J. i in. (1973). Test for carcinogenicity of food additives and chemotherapeutic agents by the pulmonary tumor response in strain A mice. Cancer Res. 33(12), 3069–85.

Sun C., Theodoropoulos C., Scrutton N.S. (2020). Techno-economic assessment of microbial limonene production. Bioresour. Technol. 300. DOI: 10.1016/j.biortech.2019.122666.

Styles J.A., Penman M.G. (1985). Evaluation of its performance in identifying chemical mutagens and carcinogens. Mutat. Res. Rev. Genet. Toxicol. 154(3), 183–204. DOI: 10.1016/0165-1110(85)90017-X.

Topham E.J., Wakelin S.H. (2003). D-limonene contact dermatitis from hand cleansers. Contact Dermatitis 49, 108–109.

Trytek M., Kowalski P., Fiedurek J. (2003). Występowanie, rola biologiczna oraz biotransformacja limonenu. Biotechnologia 2 (61) 206–217.

Tsuji M., Fujisaki Y., Arikawa Y. i in. (1975). Studies on D-limonene, as gallstone solubilzer. II. Acute and subacute toxicities (Jpn.). Oyo Yakurì 9, 387–401 (cyt. za MAK 1990, NTP 1990).

Tsuji M., Fujisaki Y., Okubo A. i in. (1975a). Studies on D-limonene, as gallstone solubilizer (V): Effects on development of rat fetuses and offspring. Oyo Yakuri 9, 179–186 (cyt. za: Kim i in. 2013).

Tsuji M., Fujisaki Y., Arikawa Y. i in. (1975b). Studies on D-limonene, as gallstone solubilzer. IV Chronic toxicity in dogs (Jpn.). Oyo Yakurì 9, 775–808 (cyt. za: Kim i in. 2013).

Tsuji M., Fujisaka Y., Yamachika K. i in. (1974). Oyo Yakuri 8, 1439 (cyt. za: MAK 1990).

Turner S.D., Tinwell H., Piegorsch W. i in. (2001). The male rat carcinogens limonene and sodium saccharin are not mutagenic to male Big Blue™ rats. Mutagenesis 16, 329–332.

Wallace L., Nelson, W., Ziegenfus R. i in. (1991). The Los Angeles TEAM study: Personal exposures, indoor–outdoor air concentrations, and breath concentrations of 25 volatile organic compounds. J. Expos. Anal. Environ. Epidemiol. 1, 57–192.

Van Duuren B.L., Goldschmidt B.M. (1976). Cocarcinogenic and tumor-promoting agents in tobacco carcinogenesis. J. Natl. Cancer Inst. 56(6), 1237–1242. DOI: 10.1093/jnci/56.6.1237.

Watabe T., Hiratsuka A., Isobe M. i in. (1980). Metabolism of D-limonene by hepatic microsomes to non-mutagenic epoxides toward *Salmonella* Typhimurium. Biochem. Pharmacol. 29, 1068. DOI: 10.1016/0006-2952(80)90172-0.

Watabe T., Hiratsuka A., Ozawa N. i in. (1981). A comparative study on the metabolism of D-limonene and 4-vinylcyclohex-1-ene by hepatic microsomes. Xenobiotica 11(5), 333–44. DOI: 10.3109/00498258109045312.

Webb D.R., Ridder G.M., Alden C.L. (1989). Acute and subchronic nephrotoxicity of D-limonene in Fischer 344 rats. Food Chem. Toxicol. 27, 639–649.

Webb D., Kanerva R., Hysell D. i in. (1990). Assessment of the subchronic oral toxicity of D-limonene in dogs. Food. Chem. Toxicol. 28, 669–675.

Whysner J., Williams G. M. (1996). D-limonene mechanistic data and risk assessment: Absolute species-specific cytotoxicity, enhanced cell proliferation, and tumor promotion. Pharmacol. Ther. 71, (1–2), 127–136. DOI: 10.1016/0163-7258(96)00065-4.

WHO, World Health Organization (1998). D-limonene. Concise International Chemical Assessment Document 5. Geneva.

Vigushin D.M., Poon G.K., Boddy A. i in. (1998). Phase I and pharmacokinetic study of D-limonene in patients with advanced cancer. Cancer Chemother. Pharmacol. 42, 111–117. DOI: 10.1007/s002800050793.

York M., Basketter D., Cuthbert J. i in. (1995). Skin irritation testing in man for hazard assessment – Evaluation of four patch systems. Hum. Exp. Toxicol. 14, 729–734. DOI: 10.1177/096032719501400906.

ZAKRES BADAŃ WSTĘPNYCH I OKRESOWYCH, NARZĄDY (UKŁADY) KRYTYCZNE, PRZECIWWSKAZANIA LEKARSKIE DO ZATRUDNIENIA W NARAŻENIU NA D-LIMONEN

dr n. med. Marcin Rybacki
Instytut Medycyny Pracy
im. prof. dr. med. Jerzego Nofera
91-348 Łódź
ul. św. Teresy od Dzieciątka Jezus 8

Zakres badania wstępnego

Ogólne badanie lekarskie ze szczególnym zwróceniem uwagi na skórę.
Badania pomocnicze: nie wskazano dodatkowych badań pomocniczych.

Zakres badania okresowego

Ogólne badanie lekarskie ze szczególnym zwróceniem uwagi na skórę.
Badania pomocnicze: nie wskazano dodatkowych badań pomocniczych.
Częstotliwość badań okresowych: co 4 lata.

U w a g a
Lekarz przeprowadzający badanie profilaktyczne może poszerzyć jego zakres o dodatkowe specjalistyczne badania lekarskie oraz badania pomocnicze, a także wyznaczyć krótszy termin następnego badania, jeżeli stwierdzi, że jest to niezbędne do prawidłowej oceny stanu zdrowia osoby przyjmowanej do pracy lub pracownika.

Narządy (układy) krytyczne

Narządem (układem) krytycznym podczas pracy w narażeniu na *D*-limonen jest skóra.

Przeciwwskazania lekarskie do zatrudnienia

Przeciwwskazania do zatrudnienia ustala lekarz przeprowadzający badanie profilaktyczne, z uwzględnieniem stanu zdrowia osoby badanej oraz warunków narażenia na D-limonen.