

LIQUIDI DI RICARICA PER SIGARETTA ELETTRONICA: INGREDIENTI E CONTAMINANTI

Carmelo Abenavoli (a), Marco Famele (a), Rosanna Maria Fidente (a), Gianluigi de Gennaro (b), Jolanda Palmisani (b), Paola Ranzuglia (c)

(a) Centro Nazionale Sostanze Chimiche, Istituto Superiore di Sanità, Roma

(b) Dipartimento di Biologia, Università degli Studi 'Aldo Moro', Bari

(c) Agenzia Regionale per la Protezione Ambientale delle Marche, Macerata

Composizione dei liquidi

Componenti dei liquidi di base: glicole propilenico e glicerolo

I liquidi di ricarica sono una miscela di glicole propilenico (CAS n. 57-55-6) e glicerolo o glicerina (CAS n. 56-81-5). Il glicerolo utilizzato per la produzione di liquidi di ricarica è solitamente di origine vegetale ed è estratto da oli vegetali, laddove il glicole propilenico è preparato per idrolisi dell'ossido di propilene sotto pressione ad alta temperatura. Questi due glicoli sono utilizzati come additivi approvati dall'Unione Europea con proprietà umettanti in campo alimentare (Direttiva 2000/63/CE e Direttiva 96/77/EC) e cosmetico.

Sono inoltre considerati solventi approvati per prodotti farmaceutici (Allegato della linea guida della Commissione Europea per i prodotti medicinali per uso umano, indicato dalla *European Medicines Agency* (EMA) (Europa, 2003) e classificati dalla *Food and Drug Administration* (FDA, 2013) come *Generally Recognized As Safe* (GRAS).

Nel caso delle sigarette elettroniche, questi glicoli sono utilizzati per creare un aerosol inalabile ottenuto dal riscaldamento del liquido per opera dell'atomizzatore. In genere, il glicole propilenico costituisce il principale componente (fino al 90%, in alcuni prodotti) (Laugesen, 2008).

La glicerina, di per sé considerata non pericolosa, potrebbe costituire un pericolo a causa delle temperature elevate raggiunte all'interno del cartomizzatore/vaporizzatore; alcune indicazioni della letteratura ne evidenziano inoltre la pericolosità sotto forma di nebbie inalabili ma, la mancanza di sufficienti evidenze, ha fatto sì che il *National Institute for Occupational Safety and Health* (NIOSH) e l'*American Conference of Governmental Industrial Hygienists* (ACGIH) non abbiano adottato un valore limite per la glicerina aerodispersa. Solo l'*Occupational Safety and Health Administration* (OSHA) indica un *Threshold Limit Values - Time Weighted Average* (TLV-TWA) di 10 mg/m³ per le nebbie totali e di 5 mg/m³ per la frazione respirabile considerata come costituita da "particelle non altrimenti classificabili".

È descritto che, a circa 290°C, la glicerina decompone per formare acroleina, sostanza con elevata tossicità acuta per via orale, inalatoria e digestiva. Utilizzata anche come umettante nel trattamento del tabacco la glicerina è stata considerata la responsabile dell'aumento della presenza di acroleina nel fumo di tabacco (Carmines & Gaworski, 2005).

Sebbene il glicole propilenico non sia considerato pericoloso, talvolta sono stati evidenziati effetti irritativi a gola e occhi (Wieslander *et al.*, 2001). Per tale sostanza l'*Agency for Toxic Substances and Disease Registry* (ATSDR) ha definito un *Maximum Residue Limit* (MRL) per inalazione di 0,009 ppm per una durata di esposizione compresa tra 15 e 364 giorni (ATSDR, 2016). Secondo la *World Health Organization* è accettabile un *intake* orale giornaliero fino a 25 mg/kg.

Nicotina e nicotinoidi

La nicotina (CAS n. 54-11-5) è uno stimolante del sistema nervoso centrale e periferico che crea elevata dipendenza e con una dose letale pari a 30-60 mg per gli adulti e 10 mg per i bambini. In dosi elevate, provoca nausea e vomito, ma può provocare malessere anche in piccole dosi. In piccole dosi la nicotina aumenta la frequenza cardiaca e la pressione arteriosa. Quando la nicotina è assunta ripetutamente in piccole quantità, si sviluppano tolleranza e dipendenza.

Ai sensi del DL.vo 6/2016, il contenuto massimo di nicotina ammissibile nei liquidi di sigaretta elettronica è pari a 20 mg/mL. Tale concentrazione consente un rilascio di nicotina comparabile alla dose di nicotina consentita derivante da una sigaretta tradizionale durante il tempo necessario per fumare tale sigaretta. Le dosi di nicotina devono essere inoltre rilasciate a livelli costanti in condizioni normali di utilizzo delle sigarette elettroniche.

La nicotina utilizzata per la produzione dei liquidi viene estratta dal tabacco. Tale processo di estrazione può produrre alcune impurezze specifiche del tabacco, sospettate di essere dannose (FDA, 2009). Queste impurezze sono alcaloidi minori del tabacco (nornicotina, anatabina, anabasina, miosmina, cotinina, N'-ossidi della nicotina, β -nicotirina e β -nornicotirina) e si ritiene possano formarsi a seguito dell'attività batterica o ai processi di ossidazione durante la lavorazione del tabacco (Etter *et al.*, 2013).

La degradazione ossidativa della nicotina può verificarsi anche durante i processi di produzione dei liquidi di ricarica ed elevate quantità di sostanze nicotino-correlate potrebbero indicare una manipolazione e stoccaggio inadeguati. Formulazioni instabili o interazioni con i materiali di imballaggio possono anche incrementare la degradazione di nicotina nei prodotti finali. Ad esempio, sostanze contenute aromi menta, vaniglia e aromi fruttati, possono influenzare la stabilità del prodotto (Etter *et al.*, 2013). Un rapporto della FDA (Westenberger, 2009) ha mostrato la presenza di impurezze specifiche del tabacco nella maggior parte dei campioni testati. Queste sostanze sono meno potenti e meno tossiche della nicotina stessa, ma studi tossicologici sono necessari per dimostrare che livelli elevati di questi prodotti di degradazione non arrechino alcun rischio aggiuntivo per gli utenti delle sigarette elettroniche (Etter *et al.*, 2013). Secondo la Farmacopea Europea (Ph Eur 8.0, 2014), la nicotina, come materiale grezzo per prodotti farmaceutici, può contenere fino allo 0,3% di ciascuna impurezza nicotina-correlata (β -nicotirina, cotinina, miosmina, nicotina-N-ossidi, nornicotina e anabasina) più lo 0,1% di impurezze non specificate per un contenuto massimo di impurezze totali di non più dello 0,8%. Tali limiti si riferiscono alla nicotina come materiale grezzo per uso farmaceutico, nei prodotti finiti e che tali limiti possono essere superati solo se supportati da dati integrativi (studi di stabilità, correlazione con la dose giornaliera) (Etter *et al.*, 2013).

Aromi caratterizzanti e altre sostanze

Altre sostanze che possono rientrare nella composizione dei liquidi di ricarica sono acqua, aromi e alcol. Per quanto concerne gli aromi, i liquidi contengono una grande varietà di ingredienti con proprietà aromatizzanti ed è difficile identificare una formulazione “*tipo*” così come generalizzare i rischi tossicologici che possono essere associati ai liquidi per via della presenza di tali sostanze (Hutzler *et al.*, 2014; Kavvalakis *et al.*, 2015). L'ampia varietà di aromi dei liquidi di ricarica desta inoltre particolare attenzione in quanto rappresenta un ulteriore potenziale attrattiva tra i giovani, i quali possono essere più stimolati ad approcciarsi all'uso della *e-cig* nel caso di refill aromatizzati (Choi *et al.*, 2012).

Oltre alle molecole odorogene di sintesi, alcuni aromi di origine naturale (es. quelli di tabacco) possono essere ottenuti con processi di estrazione a caldo o macerazione a freddo.

L'estratto naturale può essere ulteriormente aromatizzato (aroma cioccolato, mela, cocco, mora, ecc.) esattamente come accade per le sigarette di tabacco convenzionali.

La maggior parte degli aromi utilizzati nei liquidi di ricarica è per uso alimentare. In mancanza di una legislazione specifica in materia, gli aromi devono essere rispondenti alla normativa inerente l'uso degli aromi per gli alimenti (oltre chiaramente alle norme riguardanti le sostanze pericolose). La norma europea che attualmente regola il settore degli aromi è il Regolamento (CE) 1334/2008 e successive modifiche entrato in vigore il 20 gennaio 2009, in cui si specificano le tipologie di aromi, le norme generali per l'uso, le prescrizioni per l'etichettatura (Europa, 2008). Nell'Allegato I di tale Regolamento è riportato un elenco comunitario di aromi e materiali di base autorizzati per l'uso negli e sugli alimenti.

La legislazione comunitaria e nazionale definisce diversi tipi di aromi:

- *aromi naturali*, ottenuti tramite estrazione da materie prime naturali o composti da molecole chimiche naturali spesso ottenute per biosintesi;
- *aromi naturali identici*, le cui molecole sono identiche o meglio simili a quelle naturali ma ottenute per sintesi chimica in laboratorio (es. la vanillina da tutti comunemente usata);
- *aromi artificiali*, le cui molecole chimiche sono state sintetizzate in laboratorio e non sono mai state riscontrate in natura.

I liquidi possono contenere sostanze aromatizzanti (le più frequentemente riscontrate) quali vanillina, mentolo, etilmaltolo, etil vanillina, 3-metil-1,2-ciclopentanedione e reosmina ("chetone di lampone") insieme ad allergeni come ad esempio l'aldeide cinnamica e la cumarina, quest'ultima vietata in Germania come additivo nei prodotti del tabacco e inserita dalla FDA nella lista di *Substances generally prohibited from direct addition or use as human food*.

Sono stati inoltre identificati eugenolo, linalolo, benzil alcol e alcol anisico, tutti regolamentati dal Regolamento (CE) 1223/2009 sui prodotti cosmetici in base alla loro ben note proprietà allergeniche sulla pelle. In alcuni liquidi è stata rinvenuta la presenza di acetamide, un composto che è considerato un possibile cancerogeno per l'uomo (gruppo 2B, secondo l'*International Agency for Research on Cancer*, IARC).

Sebbene attualmente la maggior parte degli aromi utilizzati nei liquidi di ricarica sia per uso alimentare, queste sostanze non sono state testate adeguatamente per stabilire la loro sicurezza quando inalate. Infatti, il Regolamento (CE) 1334/2008 non riportata alcun riferimento all'utilizzo degli aromi per inalazione diretta nelle vie respiratorie.

Vi sono poi sostanze presenti nei liquidi che, nonostante siano approvate per uso alimentare, hanno ben documentati effetti avversi quando inalate.

È il caso del diacetile la cui presenza è stata rilevata nel 69,2% di liquidi analizzati con contenuto medio di 29 µg/mL (Farsalinos *et al.*, 2015). Si tratta di un dicetone (2,3-butenedione) autorizzato dal Regolamento (UE) 872/2012. Nonostante sia approvato e sicuro quando ingerito (NIOSH, 2014) è stato associato ad una riduzione della funzione respiratoria in soggetti esposti per via inalatoria ed è inoltre implicato nello sviluppo della bronchiolite obliterante, una patologia respiratoria irreversibile.

Un'altra sostanza che desta preoccupazione è l'acetil propionile, strutturalmente simile al diacetile, utilizzato come sostituto del diacetile e aggiunto nei prodotti pubblicizzati come prodotti "senza diacetile". Tuttavia i rischi associati all'inalazione dell'acetil propionile potrebbero essere paragonabili a quelli del diacetile (Farsalinos *et al.*, 2015).

Un recente studio ha invece focalizzato l'attenzione sul potenziale rischio associato all'esposizione inalatoria alla benzaldeide causato dal consumo di liquidi di ricarica aromatizzati alla ciliegia (Kosmider *et al.*, 2016). La benzaldeide è un ingrediente chiave degli aromi fruttati sia naturali sia artificiali ma studi di esposizione occupazionali e in vivo su animali hanno dimostrato la sua implicazione nell'insorgere di irritazioni delle vie respiratorie. Data la sua potenziale tossicità inalatoria, la benzaldeide è stata ricercata in un ampio numero di liquidi di

ricarica per e-cig e quantificata nell'aerosol prodotto dalla vaporizzazione. Dall'analisi dei dati sperimentali raccolti è emerso che livelli più alti di benzaldeide erano presenti nei liquidi aromatizzati alla ciliegia e che le concentrazioni a cui i consumatori erano potenzialmente esposti con 30 svapate erano sovente superiori a quelle da sigaretta convenzionale. L'attenzione sulla presenza di benzaldeide nei liquidi di ricarica è ancor di più giustificata da recenti studi sulle implicazioni dell'utilizzo della benzaldeide anche in campo alimentare. Uno studio di recente pubblicazione ha fornito evidenza scientifica sulla relazione esistente tra il contenuto di benzaldeide nelle bevande aromatizzate e la contaminazione da benzene (Loch *et al.*, 2016). Gli autori hanno, infatti, ipotizzato che la benzaldeide sia il precursore chimico del benzene concorrendo alla sua formazione nelle bevande, in particolar modo quelle aromatizzate alla ciliegia.

Contaminanti nei liquidi

Nitrosammine

Il processo di estrazione della nicotina dal tabacco può essere responsabile della presenza nei liquidi di ricarica di nitroso composti noti come nitrosammine specifiche del tabacco, potenti cancerogeni identificati nel tabacco e nel fumo di tabacco. A questa classe appartengono la N'-nitrosornicotina (NNN), 4-(metilnitrosammino)-1-(3-piridil)-1-butanone (NNK), N'-nitrosoanabasina (NAB) and N'-nitrosoanatabina (NAT). NNN e NNK sono classificati come cancerogeni umani (gruppo 1) dall'IARC e si formano a partire dai corrispondenti alcaloidi e nitriti e nitrati durante il processo dalla fermentazione, essiccazione (stagionatura) e invecchiamento del tabacco; NAB è un debole cancerogeno esofageo nei ratti mentre NAT non è un cancerogeno (IARC, 2007).

NNN, NAB e NAT si formano principalmente a partire dalla loro corrispondente ammina secondaria (nicotina, anatabina e anabasina) nelle prime fasi della stagionatura del tabacco e trattamento, laddove la maggior parte del NNK si forma a partire dalla ammina terziaria nelle ultime fasi di stagionatura e fermentazione (IARC, 2007).

Solo una piccola parte di nitrosammine sarebbe dovuta a fenomeni pirolitici durante la combustione del tabacco della sigaretta (Farsalinos *et al.*, 2015). Le reazioni di nitrosazione delle ammine corrispondenti potrebbero verificarsi anche nei liquidi di ricarica per sigarette elettroniche, specialmente nel caso di un'inadeguata conservazione o nelle fasi di produzione (es. si ritiene che una inadeguata conservazione possa incrementare i livelli di NNN come conseguenza della nitrosazione della nicotina convertita a partire dalla nicotina nei liquidi). In un rapporto del 2009, la FDA ha rilevato bassi livelli di nitrosammine nel 50% di cartucce testate. I livelli sono sempre molto inferiori rispetto a quelli determinati nel fumo di sigaretta: le nitrosammine nei liquidi *e-cig* sono legate alla purezza della nicotina aggiunta, che normalmente risulta elevata. Il livello delle nitrosammine nei vapori generati è legato al contenuto delle stesse nei liquidi (Kosmider *et al.*, 2014).

Aldeidi e altri composti organici volatili

Il glicole propilenico è utilizzato in campo farmaceutico come veicolante per principi attivi negli inalatori e nebulizzatori per il trattamento dell'asma e come conservante. Tuttavia a differenza degli inalatori e nebulizzanti, i dispositivi delle sigarette elettroniche contengono una componente riscaldante e il riscaldamento dei glicoli può generare una serie di composti

carbonilici tossici quali formaldeide, acetaldeide e acroleina (Etter *et al.*, 2013; Laugesen, 2009; Schober *et al.*, 2013; Williams *et al.*, 2013; Cheng, 2014).

In alcuni modelli, le temperature raggiunte al centro della resistenza all'interno dell'atomizzatore possono essere alte promuovendo reazioni di pirolisi e disidratazione (Kosmider *et al.*, 2014). Sebbene questi processi possono avvenire solo a temperature relativamente elevate, in alcune condizioni specifiche queste possono avvenire anche a temperature inferiori (Etter *et al.*, 2013).

Composti carbonilici sono il risultato della disidratazione e frammentazione del glicerolo.

Anche il glicole propilenico può essere ossidato a formaldeide e l'acetaldeide durante il riscaldamento del liquido (Uchiyama *et al.*, 2013). Si ritiene che la formazione di composti carbonilici possa essere aumentata quando i liquidi accidentalmente toccano il filo nichelcromo riscaldato all'interno dell'atomizzatore come indicato dal cambiamento di colore attorno al filo (Uchiyama *et al.*, 2013) riscontrato in alcuni dispositivi di sigaretta elettronica.

L'acroleina è un'aldeide tossica per la quale ACGIH ha stabilito un TLV Ceiling di 0,1 ppm (ACGIH, 2016).

Secondo uno studio recente (Uchiyama *et al.*, 2013), il 70% dei marchi di sigarette elettroniche esaminate generano formaldeide, acetaldeide e acroleina con concentrazioni massime di 260, 210 e 73 mg/m³, rispettivamente insieme ad altri due composti carbonilici nocivi che ad oggi non sono stati rilevati nel fumo di prima mano delle sigarette convenzionali: il gliosale e il metilgliosale.

Inoltre il glicole dietilenico potrebbe essere presente come una impurezza del glicole propilenico e glicerolo in alcuni liquidi (Westenberger, 2009). Il glicole dietilenico ha proprietà chimico-fisiche simili al glicole propilenico e glicerolo ed è stato causa di numerosi avvelenamenti in quanto aggiunto nei prodotti farmaceutici in sostituzione ai più costosi ma non tossici glicole propilenico e glicerolo (Schier *et al.*, 2013).

Una serie di Composti Organici Volatili (COV) può essere inoltre presente nel liquido. Oltre ad essere prodotti dal riscaldamento nell'atomizzatore, formaldeide e acetaldeide possono essere presenti in piccole quantità in alcuni liquidi (Laugesen, 2008; Uchiyama *et al.*, 2013; Lim *et al.*, 2013). L'acetaldeide infatti può essere aggiunta intenzionalmente in alcuni liquidi come agente aromatizzante. Il benzene (Gruppo 1, IARC) e altri solventi (toluene, xileni e stirene) potrebbero essere presenti nei liquidi come contaminanti di ingredienti e/o aromi e come residui di solventi impiegati nei processi di estrazione dalle matrici di partenza (es. della nicotina dalle foglie di tabacco) (Etter *et al.*, 2013). Non può essere inoltre esclusa una loro formazione nel processo di vaporizzazione a causa di un riarrangiamento molecolare dei componenti organici ad elevata temperatura. Inoltre una grande varietà di altri COV nei liquidi sprigionano fragranze attraverso il riscaldamento (Bahl *et al.*, 2012). Recenti studi hanno anche dimostrato la presenza di alcuni di questi composti quali ad esempio benzene, toluene, etilbenzene, stirene, xileni, nei vapori emessi da *e-cig* siano in concentrazione drasticamente inferiore rispetto al fumo di tabacco (Kim *et al.*, 2013; Famele *et al.*, 2015).

Idrocarburi policiclici aromatici

Gli Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA) sono sostanze di cui sono ampiamente note le loro proprietà cancerogene, facilmente e rapidamente assorbiti per via cutanea, inalatoria e ingestione. L'esposizione della popolazione generale a IPA ha da anni una notevole importanza. Il significato di questa classe di sostanze dal punto di vista della medicina ambientale è collegato alla presenza ubiquitaria nell'ambiente e alla natura cancerogena di alcuni composti. La principale fonte di esposizione a IPA per la popolazione generale non fumatrice è la dieta, altre fonti importanti sono l'inquinamento dell'aria e il fumo di tabacco. Alti livelli di

esposizione sono stati osservati in alcuni ambienti di lavoro (IARC, 2010). Gli IPA non sono aggiunti intenzionalmente nei prodotti di consumo tuttavia possono rientrare nella composizione a seguito dei processi produttivi o a seguito delle materie prime utilizzate. Pertanto con buone pratiche di produzione il contenuto di IPA può essere ridotto o evitato. Sulla base del Regolamento REACH (*voce 50, allegato XVII*), l'uso degli IPA, classificati come sostanze Cancerogene, Mutagene e tossiche per la Riproduzione (CMR), è consentito limitatamente alla produzione e all'immissione sul mercato di oli diluenti, pneumatici e prodotti di consumo purché siano rispettate le concentrazioni indicate.

Analogamente, la presenza di IPA nei liquidi di ricarica potrebbe essere legata a contaminazione durante i processi produttivi. Sebbene in alcuni casi i liquidi non contengono livelli rilevabili di IPA (Matthaios *et al.*, 2015), in altri casi è stata riscontrata la presenza di soli IPA leggeri e l'assenza di quelli a più alto peso molecolare e cancerogeni come i benzopireni. In questi liquidi il contenuto di IPA è predominato da fluorantene, fenantrene, pirene e i naftaleni (Laugesen, 2008).

In altri casi è stata rilevata la presenza sia di IPA più leggeri che quelli più pesanti, ad esempio in alcuni marchi di produzione di origine cinese, come benzo[a]antracene (0,61-2,45 ng/g) e benzo[a]pirene (0,91-2,44 ng/g). Tuttavia, le concentrazioni riscontrate sono molto basse e relativamente costanti specialmente per quelli a più alto peso molecolare suggerendo come possibile fonte di contaminazione un ingrediente comune (es. solventi impiegati nel processo produttivo) (Han *et al.*, 2016).

Metalli

Ad oggi, i pochi studi incentrati sulla determinazione di metalli nei liquidi di ricarica sembrerebbero dimostrare che non vi siano evidenze di contaminazione dei liquidi con metalli pesanti che possano destare preoccupazioni per la salute pubblica (Laugesen, 2008; Burstyn, 2014). Per quanto riguarda i cartomizzatori, sono state riscontrate particelle di stagno (Sn) nei liquidi adsorbiti sulle fibre (in Polyfil) dei cartomizzatori (William *et al.*, 2013). Tuttavia poiché le sigarette elettroniche possiedono varie componenti metalliche, i metalli possono migrare nell'aerosol generato e possono costituire un rischio per la salute degli utilizzatori e per gli astanti. Piccole particelle (William *et al.*, 2013) composte da vari elementi (stagno, altri metalli, semimetalli e silicato) migrati attraverso le fibre del cartomizzatore sono stati riscontrati nell'aerosol. In particolare un totale di oltre 20 elementi sono stati identificati nell'aerosol inclusi piombo (Pb), nichel (Ni), cromo (Cr) e cadmio (Cd) (William *et al.*, 2014). Le concentrazioni di piombo e cromo riscontrate nell'aerosol erano nel *range* delle sigarette convenzionali; quelle di nichel, 2-100 volte più alte rispetto al fumo di un noto brand di sigaretta convenzionale e riconducibili ai fili di nichel-cromo, mentre i livelli di stagno erano correlabili alla qualità dei giunti saldati: più è scarsa la qualità dei giunti saldati e più alti sono i livelli di stagno nell'aerosol (Williams *et al.*, 2015). In alcuni casi sono stati riscontrati significativi quantitativi di stagno, altri metalli e particelle di silicato, anche superiori a quelli riscontrati durante l'esposizione a sigaretta tradizionale.

Nicotina nei liquidi a “contenuto zero”

Nel caso in cui la nicotina sia presente in un liquido a “contenuto zero”, essa è da considerarsi contaminante e potrebbe rappresentare una fonte di esposizione per coloro che non intendano consumare nicotina.

Sebbene alcuni liquidi a “contenuto zero” non presentino di fatto nicotina e siano quindi conformi a quanto dichiarato in etichetta (Davis *et al.*, 2014; Lisko *et al.*, 2015), in altri liquidi possono essere presenti tracce di nicotina fino a circa 600 µg/mL (Kubica *et al.*, 2013; Han, 2015; Huzler *et al.*, 2014).

In uno studio condotto sui liquidi di cartuccia usa e getta sono state trovate alte concentrazioni di nicotina fino al valore di 21,8 mg/cartuccia (Trehly *et al.*, 2011).

Bibliografia

- ATSDR. *Toxicological profile for propylene glycol*. Atlanta: Agency for Toxic Substances and Disease Registry; 2016. Disponibile all'indirizzo: <http://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp.asp?id=1122&tid=240>; ultimo accesso 6-6-2016.
- Bahl V, Lin S, Xu N, Davis B, Wang YH, Talbot P. Comparison of electronic cigarette refill fluid cytotoxicity using embryonic and adult models. *Reprod Toxicol* 2012;34(4):529-37.
- Burstyn I. Peering through the mist: systematic review of what the chemistry of contaminants in electronic cigarettes tells us about health risks. *BMC Public Health* 2014, 14:18 2014.
- Cameron JM, Howell DN, White JR, Andrenyak DM, Layton ME, Roll JM. Variable and potentially fatal amounts of nicotine in *e-cigarette* nicotine solutions. *Tob Control* 2014;23(1):77-8.
- Carmines EL, Gaworski CL. Toxicological evaluation of glycerin as a cigarette ingredient. *Food Chem Toxicol*. 2005;43(10):1521-39.
- Cheng T. Chemical evaluation of electronic cigarettes. *Tob Control* 2014;23:ii11-ii17.
- Choi K, Fabian L, Mottey N, Corbett A, Forster J. Young adults' favorable perceptions of snus, dissolvable tobacco products, and electronic cigarettes: findings from a focus group study. *Am J Public Health* 2012;102(11):2088-93.
- Davis B, Dang M, Kim J, Talbot P. Nicotine concentrations in electronic cigarette refill and do-it-yourself fluids. *Nicotine Tob Res* 2015;17(2):134-41.
- Etter JF, Zäther E, Svensson S. Analysis of refill liquids for electronic cigarettes. *Addiction* 2013;108(9):1671-9.
- Europa, Regolamento (CE) 1334/2008 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 16 dicembre 2008 relativo agli aromi e ad alcuni ingredienti alimentari con proprietà aromatizzanti destinati a essere utilizzati negli e sugli alimenti e che modifica il regolamento (CEE) n. 1601/91 del Consiglio, I regolamenti (CE) n. 2232/96 e (CE) n. 110/2008 e la direttiva 2000/13/CE. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* n. L 354/34 del 31.12.2008
- Europa. *Guidelines: Medicinal products for human use Safety, environment and information Excipients in the label and package leaflet of medicinal products for human use*. Brussels: European Commission; 2003. (CPMP/463/00 rev.1, 2003).
- Famele M, Ferranti C, Abenavoli C, Palleschi L, Mancinelli R, Draisci R. The chemical components of electronic cigarette cartridges and refill fluids: review of analytical methods. *Nicotine Tob Res* 2015;17(3):271-9.
- Farsalinos KE, Kistler KA, Gillman G, Voudris V. Evaluation of electronic cigarette liquids and aerosol for the presence of selected inhalation toxins. *Nicotine Tob Res* 2015;168-74.
- FDA. *Summary of Results: laboratory analysis of electronic cigarettes conducted by FDA*. Silver Spring, MD: Food and Drugs Administration; 2009. Disponibile all'indirizzo: <http://www.fda.gov/NewsEvents/PublicHealthFocus/ucm173146.htm>; ultima consultazione 09/09/2016.
- Goniewicz ML, Hajek P, McRobbie H. Nicotine content of electronic cigarettes, its release in vapour and its consistency across batches: regulatory implications. *Addiction* 2014;109(3):500-7.

- Goniewicz ML, Knysak J, Gawron M, Kosmider L, Sobczak A, Kurek J, Prokopowicz A, Jablonska-Czapla M, Rosik-Dulewska C, Havel C, Jacob III P, Benowitz N. Levels of selected carcinogens and toxicants in vapour from electronic cigarettes. *Tob Control* 2014;23(2):133-9.
- Goniewicz ML, Kuma T, Gawron M, Knysak J, Kosmider L. Nicotine levels in electronic cigarettes. *Nicotine Tob Res* 2013;15(1):158-66.
- Han S, Chen H, Zhang X, Liu T, Fu Y. Levels of selected groups of compounds in refill solutions for electronic cigarettes. *Nicotine Tob Res* 2016;18(5):708-14.
- Hutzler C, Paschke M, Kruschinski S, Henkler F, Hahn J, Luch A. Chemical hazards present in liquids and vapors of electronic cigarette. *Arch Toxicol* 2014;88:1295-308.
- Hyun-Hee L, Ho-Sang S. Measurement of Aldehydes in replacement liquids of electronic cigarettes by headspace gas chromatography-mass spectrometry. *B Korean Chem Soc* 2013;34(9):2691-6.
- IARC. *Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures*. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2010. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans v. 92).
- IARC. *Re-evaluation of some organic chemicals, hydrazine and hydrogen peroxide*. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 1999. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans v. 71).
- IARC. *Smokeless tobacco and some tobacco-specific N-nitrosamines*. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2007. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans v. 89).
- Kavvalakis MP, Stivaktakis PD, Tzatzarakis MN, Kouretas D, Liesivuori J, Alegakis AK, Vynias D, Tsatsakis AM. Multicomponent analysis of replacement liquids of electronic cigarettes using chromatographic techniques. *J Anal Toxicol* 2015;39(4):262-9.
- Kavvalakis MP, Stivaktakis PD, Tzatzarakis MN, Kouretas D, Liesivuori J, Alegakis AK, Vynias D, Tsatsakis AM. Multicomponent analysis of replacement liquids of electronic cigarettes using chromatographic techniques. *J Anal Toxicol* 2015;39(4):262-9.
- Kim HJ, Shin HS. Determination of tobacco-specific nitrosamines in replacement liquids of electronic cigarettes by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2013;24(1291):48-55.
- Kosmider L, Sobczak A, Fik M, Knysak J, Zaciera M, Kurek J, Goniewicz ML. Carboyl compounds in electronic cigarette vapors effect of nicotine solvent and battery output voltage. *Nicotine Tob Res* 2014;16(10):1319-26.
- Kubica P, Kot-Wasik A, Wasik A, Namieśnik J. "Dilute & shoot" approach for rapid determination of trace amounts of nicotine in zero-level e-liquids by reversed phase liquid chromatography and hydrophilic interactions liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry-electrospray ionization. *J Chromatogr A* 2013;1289:13-8.
- Laugesen M. *Safety report on the Ruyan e-cigarette cartridge and inhaled aerosol*. Christchurch, New Zealand: Health New Zealand Ltd; 2008.
- Lim HH, Shi HS. Measurement of aldehydes in replacement liquids of electronic cigarettes by headspace gas chromatography-mass spectrometry. *B Korean Chem Soc* 2013;34(9):2691-6.
- Lisko JG, Tran H, Stanfill SB, Blount BC, Watson CH. Chemical composition and evaluation of nicotine, tobacco alkaloids, pH, and selected flavors in e-cigarette cartridges and refill solutions. *Nicotine Tob Res* 2015;1270-8.
- NIOSH. *Criteria for a recommended standard: occupational exposure to diacetyl and 2,3-Pentanedione*. Atlanta: National Institute for Occupational Safety and Health; 2011. Disponibile all'indirizzo: <http://www.cdc.gov/niosh/docket/archive/pdfs/NIOSH-45/DraftDiacetylCriteriaDocument081211.pdf>; ultima consultazione 27/05/2014.

- Schier JG, Hunt DR, Perala A, McMartin KE, Bartels MJ, Lewis LS, McGeehin MA, Flanders WD. Characterizing concentrations of diethylene glycol and suspected metabolites in human serum, urine, and cerebrospinal fluid samples from the Panama DEG mass poisoning. *Clin Toxicol* 2013;51(10):923-9.
- Schober W, Szendrea K, Matze W, Osiander-Fuchs H, Heitmann D, Schettgen T, Jörres RA, Fromme H. Use of electronic cigarettes (*e-cigarettes*) impairs indoor air quality and increases FeNO levels of *e-cigarette* consumers. *Int J Hyg Environ Health* 2014;217(6):628-37.
- Talih S, Balhas Z, Salman R, Karaoghlanian N, Shihadeh A. “Direct dripping”: a high-temperature, high-formaldehyde emission electronic cigarette use method. *Nicotine Tob Res* 2016;18(4):453-9.
- Trehy ML, Ye W, Hadwiger M, Moore TW, Allgire JF, Woodruff JT, Ahadi SS, Black JC, Westenberger BJ. Analysis of electronic cigarette cartridges, refill solutions, and smoke for nicotine and nicotine related impurities, *J Liq Chromatogr Relat Technol* 2011;34:1442-58.
- Uchiyama S, Ohta K, Inaba Y, Kunugita N. Determination of carbonyl compounds generated from the *e-cigarette* using coupled silica cartridges impregnated with hydroquinone and 2,4-dinitrophenylhydrazine, followed by high-performance liquid chromatography. *Anal Sci* 2013;29(12):1219-22.
- USP. Glycerin. In: *Official Monograph, USP37/NF32*. U.S. Pharmacopeial Convention. Rockville, MD: USP; 2014. p.3167-9.
- Westenberger BJ. *Evaluation of e-cigarettes*. Silver Spring, MD: Food and Drugs Administration; 2009. (DPATR-FY-09-232009 (pp. 1-8).
- Wieslander G, Norbäck D, Lindgren T. Experimental exposure to propylene glycol mist in aviation emergency training: acute ocular and respiratory effects. *Occup Environ Med* 2001;58(10):649-55.
- Williams M, To A, Bozhilov K, Talbot P. Strategies to reduce tin and other metals in electronic cigarette aerosol. *PLoS One* September 2015.
- Williams M, Villarreal A, Bozhilov K, Lin S, Talbot P. Metal and silicate particles including nanoparticles are present in electronic cigarette cartomizer fluid and aerosol. *PLoS One* 2013;8:3.