

VALUTAZIONE DEL RISCHIO DI ESPOSIZIONE E PROTEZIONE DEL CONSUMATORE

Leonello Attias (a), Domenico Spagnolo (a), Carmelo Abenavoli (a), Marco Famele (a),
Luigia Scimonelli (a), Rosa Draisci (a), Anna Cenni (b), Maria Cristina Aprea (b),
Gianluigi de Gennaro (c), Jolanda Palmisani (c)

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

(b) *Laboratorio di Sanità Pubblica area Vasta Sud Est, Azienda USL Toscana Sud Est, Siena*

(c) *Università degli Studi di Bari 'Aldo Moro', Dipartimento di biologia, Laboratorio di Sostenibilità
Ambientale, Bari*

Stima dell'esposizione e caratterizzazione dei rischi in relazione ai prodotti in commercio e alle sostanze rilevate nei liquidi campionati

Valutazione del rischio

La valutazione del rischio per la salute umana consiste nelle seguenti fasi:

- raccolta delle informazioni disponibili sulla sostanza in esame
- caratterizzazione della relazione dose-risposta e derivazione dei livelli soglia;
- elaborazione degli scenari di esposizione e stima quantitativa dell'esposizione;
- caratterizzazione del rischio.

Per quanto concerne la stima dell'esposizione a sostanze in seguito all'utilizzo di sigarette elettroniche, si considera la possibilità di un'esposizione attiva degli utilizzatori e di un'esposizione passiva degli astanti.

Stima dell'esposizione

Esposizione attiva

La stima dell'esposizione attiva viene eseguita in considerazione delle informazioni disponibili sui prodotti in commercio. Sono stati considerati gli scenari di esposizione relativi alle diverse concentrazioni di nicotina e contaminanti presenti nel liquido di ricarica e sono stati calcolati i livelli di esposizione per le diverse tipologie di utilizzatori (moderati, medi e forti per i quali si assume rispettivamente una frequenza di 5, 10 e 20 eventi al giorno), sia nel caso dell'adulto di 60 kg, sia dell'adolescente di 40 kg.

Ai fini della stima dell'esposizione vanno considerate anche le informazioni disponibili sui foglietti riportanti le istruzioni per l'uso e la conservazione del prodotto presenti nella confezione dell'art. (es. ogni ricarica può contenere fino a 1 grammo di liquido da vaporizzare che può essere utilizzato fino a un numero di 400-500 aspirazioni). Considerando il contenuto variabile della sostanza in esame nel liquido di ricarica, l'esposizione viene calcolata mediante il seguente algoritmo:

$$D = \frac{Qa \cdot Fn \cdot 1000 \cdot Fr \cdot Fa \cdot naE \cdot Freq}{BW}$$

dove:

esposizione giornaliera (mg/kg/d)	D	
quant. di liq./aspirazione (g)	Qa	0,0025
frazione sostanza	Fn	frazione in peso della sostanza nel liquido
frazione respirata	Fr	0,5
frazione assorbita	Fa	specifico (es. nicotina 0,75)
aspirazioni per evento	naE	15
eventi al giorno	Freq	5, 10, 20 (fumatori moderati, medi e forti)
peso corporeo (kg)	BW	60 (adulto); 40 (adolescente)

La stima dell'esposizione effettuata mediante l'utilizzo dell'algoritmo sopra riportato è finalizzata alla derivazione di un livello di esposizione attiva per via sistemica espresso in mg/kg/d per una comparazione con i livelli di non effetto derivati (*Derived No-Effect Level*, DNEL) o livelli di effetto minimo derivati (*Derived Minimal Effect Levels*, DMEL) per le sostanze specifiche, espressi anch'essi in mg/kg/d. Tuttavia per quelle sostanze per le quali i DNEL/DMEL vengono espressi in mg/m³, l'esposizione (in mg/m³) viene calcolata mediante il seguente algoritmo:

$$E_{inh} = \frac{Qa \cdot Fn \cdot 10 \cdot Dpuff}{Vpuff \cdot 10^{-6} \cdot 60 \cdot 24}$$

dove:

- E_{inh} = esposizione media giornaliera (mg/m³)
- V_{puff} = volume puff (70 cm³)
- Qa = liquido consumato per puff (0,0025 g)
- Fn = frazione di sostanza nel liquido
- D_{puff} = durata puff (2 s).

Esposizione passiva

L'esposizione passiva a sostanze rilasciate in base all'uso delle sigarette elettroniche, è direttamente associata alle emissioni degli utilizzatori che espirano una parte del vapore inalato.

La stima dell'esposizione passiva viene effettuata utilizzando il modello "constant rate" incluso nel programma ConsExpo 4.0 (RIVM report 320104004/2005):

$$C_{air} = \frac{A_o \times w_f / t_r}{qV} \times (1 - e^{-qt}) \quad \text{exposure } t < t_r$$

$$C_{air} = \frac{A_o \times w_f / t_r}{qV} \times (1 - e^{-qt_r}) \times e^{-q(t-t_r)} \quad \text{exposure } t > t_r$$

dove:

- C_{air} : concentrazione della sostanza nell'aria del locale (kg/m³)
- t_r: tempo di rilascio (s)
- A_o: quantità di prodotto usato (kg)
- w_f: frazione in peso della sostanza nel prodotto
- V: volume del locale (m³)
- q: tasso di ventilazione del locale (n. di ricambi d'aria per tempo) (L/s)

Questo modello considera sia un tempo di esposizione inferiore al tempo di rilascio ($t < tr$) sia un tempo di esposizione superiore al tempo di rilascio ($t > tr$).

Il software sviluppato dal Centro Nazionale Sostanze Chimiche (CSC) dell'Istituto Superiore di Sanità consente l'applicazione di questo modello al fine di calcolare il contributo contemporaneo alla esposizione passiva di un numero massimo di 5 svapatori.

Il software consente di sviluppare scenari di esposizione considerando la possibile presenza di più svapatori nello stesso ambiente *indoor*. Ad ognuno degli svapatori è possibile attribuire:

- a) concentrazione di sostanza presente nel liquido di ricarica;
- b) tempo di presenza nel locale (con dati in minuti di entrata e uscita dallo stesso);
- c) tipologia di svapatore (moderato, medio o forte).

Derivazione dei livelli soglia

Sulla base dell'identificazione dei pericoli, si definiscono, se possibile, i livelli soglia per l'esposizione al di sotto dei quali i rischi per la salute umana e l'ambiente sono considerati controllati.

Livello derivato senza effetto

Il livello derivato senza effetto (DNEL) è il livello di esposizione alla sostanza al di sotto del quale si può prevedere che non si verifichino eventi avversi. Pertanto, corrisponde alla soglia di esposizione alla sostanza oltre la quale non dovrebbero essere esposti gli esseri umani.

Il DNEL è un livello derivato di esposizione perché viene solitamente calcolato sulla base di descrittori della dose disponibili provenienti da studi animali, come le dosi prive di effetti avversi osservati (*No Observed Adverse Effect Level*, NOAEL) o le dosi di riferimento (*BenchMark dose*, BMD) (Glossario REACH 2007-2008 dell'ECHA, disponibile all'indirizzo <http://echa-term.echa.europa.eu/>).

Per la derivazione dei DNEL a partire dagli studi tossicologici e in considerazione dei fattori di incertezza specifici, si fa riferimento alle linee guida ECHA (ECHA, 2012).

Livello derivato con effetti minimi

Per alcune sostanze (es. cancerogeni genotossici), per le quali non è possibile determinare una soglia di effetto, non è possibile derivare DNEL poiché non è possibile definire alcun livello di esposizione sicuro. In tali casi, se i dati lo consentono, può essere definito un valore di riferimento, definito come livello derivato con effetti minimi (DMEL).

I valori del DMEL rappresentano i livelli d'esposizione per i quali la probabilità che l'effetto avverso identificato si verifichi in una popolazione è sufficientemente bassa da non destare preoccupazione. In considerazione di quanto riportato DL.vo del 16 gennaio 2008, n. 4 che apporta "Ulteriori disposizioni correttive e integrative del DL.vo 3 aprile 2006, n. 152, recante norme in materia ambientale", si considera un valore di DMEL quello associabile a 1×10^{-6} come valore di rischio massimo incrementale accettabile per la singola sostanza cancerogena".

Per la derivazione dei livelli soglia, devono essere considerate le informazioni rilevanti riportate in letteratura nonché le valutazioni effettuate dai vari organismi (*European CHemicals Agency*, ECHA; *European Food Safety Authority*, EFSA; *United States Environmental Protection Agency*, USEPA; *World Health Organization*, WHO; *Organisation for Economic Co-operation and Development*, OECD).

Caratterizzazione del rischio per la salute umana

Attraverso l'utilizzo dei modelli di simulazione sviluppati, si è proceduto, per le diverse tipologie di svapatori, adolescenti e adulti con frequenza d'uso moderata, media e forte, alla derivazione delle concentrazioni associate ai valori di riferimento (DNEL/DMEL). Ai fini della caratterizzazione del rischio tali valori vanno confrontati con i risultati delle determinazioni analitiche.

La caratterizzazione quantitativa del rischio per la salute umana associata all'esposizione attiva viene pertanto eseguita confrontando il livello di Concentrazione reale (Creal) della sostanza in esame nei liquidi di ricarica con il valore di concentrazione nei liquidi di ricarica determinato in base ai modelli e associato a un raggiungimento del DNEL/DMEL maggiormente cautelativo (Csafe). Il confronto deve essere effettuato per scenario d'esposizione pertinente. I rischi per la salute vengono definiti controllati quando i rapporti di caratterizzazione del rischio (*Risk Characterization Ratio*, RCR) Creal/Csafe sono inferiori a 1.

Per quanto concerne la nicotina è stata calcolata una concentrazione dello 0,03% che corrisponde al potenziale raggiungimento di un valore di esposizione pari al DNEL (0,00035 mg/kg/d) per uno svapatore adulto moderato che corrisponde alla tipologia di svapatore meno conservativa.

Pertanto se nei liquidi di ricarica sono presenti concentrazioni superiori a 0,3 mg/mL di nicotina non è possibile escludere un potenziale rischio di effetti avversi anche nelle condizioni più favorevoli.

Per le sostanze determinate analiticamente sono stati considerati i valori di DNEL/DMEL ricavati dai valori di riferimento specifici riportati sul portale IRIS (*Integrated Risk Information System*) della USEPA (www.epa.gov/iris) e riportati in Tabella 1.

Tabella 1. Valori di riferimento specifici riportati sul portale IRIS

Sostanza	DNEL (mg/kg/d)	DNEL (mg/m ³)	DMEL (mg/kg/d)	DMEL (mg/m ³)
Benzene	--	--	0,0000182 (CR)	0,00013 (CR)
Toluene	0,08 (RfD)	5 (RfC)	--	--
Etilbenzene	0,1 (RfD)	1 (RfC)	--	--
Xileni	0,2 (RfD)	0,1 (RfC)	--	--
Stirene	0,2 (RfD)	1 (RfC)	--	--
Benzo(a)pirene	--	--	8,55E-08 (CR)	--
Naftalene	--	0,003 (RfC)	--	--
Etilacetato	0,9 (RfD)	--	--	--
Cicloesano	--	6 (RfC)	--	--
Acetaldeide	--	0,009 (RfC)	--	--
Acroleina	--	0,00002 (RfC)	--	--
Formaldeide	0,2 (RfD)	--	--	0,00008 (CR)
Cadmio	--	--	--	0,0000006 (CR)
Arsenico*	--	--	--	0,0000002 (CR)
Cromo (VI)	--	--	--	0,00000008 (CR)
Antimonio	0,0004 (RfD)	--	--	--
Piombo**	--	0,00015	--	--
Mercurio	--	0,0003 (RfC)	--	--

* Arsenico inorganico

** Piombo da NAAQS (*National Ambient Air Quality Standards* - USEPA)

RfD = *Reference Dose*; RfC = *Reference Concentration*; CR = *Carcinogenic Risk*

Con l'ausilio dei modelli sviluppati sono state calcolate le concentrazioni percentuali (Csafe) per le quali si calcola una potenziale esposizione attiva pari al valore di riferimento (DNEL/DMEL) per lo scenario più conservativo (es. svapatore forte) (Tabella 2).

Tabella 2. Concentrazioni Csafe calcolate

Sostanza	Valore di riferimento (tabella 1)	Csafe (%)	Csafe (mg/mL)
Benzene	DMEL mg/m ³	9,3E-05	0,00093
Toluene	DNEL mg/kg/d	8,5E-01	8,5
Etilbenzene	DNEL mg/m ³	4,0E-01	4
Xileni	DNEL mg/m ³	4,0E-02	0,4
Stirene	DNEL mg/m ³	4,0E-01	4
Benzo(a)pirene	DMEL mg/kg/d	2,0E-06	0,00002
Naftalene	DNEL mg/m ³	0,00121	0,0121
Acetaldeide	DNEL mg/m ³	3,6E-03	0,036
Acroleina	DNEL mg/m ³	8,1E-06	0,000081
Formaldeide	DMEL mg/m ³	3,2E-05	0,00032
Cicloesano	DNEL mg/m ³	2,4	24
Etilacetato	DNEL mg/kg/d	11	110
Cadmio	DMEL mg/m ³	4,0E-07	0,000004
Arsenico	DMEL mg/m ³	1,4E-07	0,0000014
Cromo (VI)	DMEL mg/m ³	5,6E-08	0,00000056
Antimonio	DNEL mg/kg/d	5,0E-04	0,005
Piombo	DNEL mg/m ³	6,0E-05	0,0006
Mercurio	DNEL mg/m ³	1,0E-04	0,001

La caratterizzazione del rischio è stata effettuata mediante la comparazione delle concentrazioni percentuali nei liquidi di ricarica sottoposti ad analisi (Creal) con i valori di concentrazione (Csafe) riportati nella tabella di cui sopra.

La caratterizzazione quantitativa del rischio per la salute umana associata all'esposizione passiva viene eseguita confrontando il livello di esposizione stimato per un determinato scenario con il valore DNEL/DMEL maggiormente cautelativo. Il confronto deve essere effettuato per scenario d'esposizione pertinente. I rischi per la salute vengono definiti controllati quando i rapporti di caratterizzazione del rischio esposizione/DN(M)EL (RCR) sono inferiori a 1.

Per le sostanze per le quali non è possibile identificare una soglia di effetto i valori di esposizione vengono ponderati per il tempo di vita (70 anni) assumendo una durata complessiva dell'utilizzo della sigaretta elettronica pari a 40 anni. Il valore di esposizione calcolato con il modello viene pertanto moltiplicato per il rapporto 40/70.

Biomarcatori di esposizione a contaminanti e ingredienti dei liquidi di ricarica

Il monitoraggio biologico è uno strumento importante in medicina ambientale e occupazionale per valutare e definire i livelli interni di esposizione della popolazione generale, di gruppi di popolazione e dei singoli individui a inquinanti dispersi in ambienti di vita e di lavoro. Gli indicatori biologici misurati possono essere classificati in due grandi gruppi: indicatori di esposizione/dose e indicatori di effetto. Gli indicatori di esposizione/dose valutano l'assorbimento che segue ad una determinata esposizione alla sostanza stessa, gli indicatori di

effetto valutano le alterazioni biologiche precoci che si instaurano a carico dell'organo bersaglio del tossico, anche in assenza di alterazioni dello stato di salute. Nel proseguo di questo lavoro parleremo in particolare di indicatori di esposizione/dose.

Il concetto principale che sta alla base della determinazione di biomarker è quello di avere informazioni specifiche sull'entità dell'assorbimento di sostanze xenobiotiche con cui l'individuo viene in contatto attraverso tutte le vie di esposizione (respiratoria, digestiva e cutanea). La maggior parte degli studi disponibili è riferita alle urine e al sangue, matrici che più facilmente si possono ottenere dai partecipanti.

La facilità del campionamento, molto importante quando sono richiesti campioni multipli, così come la quantità di campione disponibile per l'analisi, rendono l'urina la matrice biologica più ampiamente usata sia per la popolazione generale che per quella professionalmente esposta. L'analisi è anche facilitata dalle più alte concentrazioni di xenobiotici rispetto al sangue quando si tratta di composti a metabolismo ed escrezione rapida. Uno dei problemi legati all'urina è la necessità di avere informazioni sul metabolismo; altro fattore significativo è la variazione del volume in relazione alle variazioni di velocità della diuresi. In considerazione del fatto che la raccolta quantitativa dell'urina in un periodo di tempo prestabilito (es. 24 ore), non sempre è possibile, per gli indicatori la cui escrezione dipende dalla diuresi, i risultati sono spesso forniti in relazione alla escrezione di creatinina o al valore di peso specifico misurato sul campione.

Tra le altre matrici biologiche di interesse sono da citare l'aria espirata soprattutto per i composti volatili e i capelli che rilevano esposizioni a medio e lungo termine e sono facilmente accessibili. La regione di prelievo del capello può creare differenze nel risultato e una possibile limitazione al loro uso è la difficoltà di distinguere tra origine endogena (deposizione attraverso il sangue) ed esogena del contaminante (deposizione da particolato atmosferico e/o da prodotti cosmetici utilizzati). Sebbene alcune procedure di pretrattamento e lavaggio siano state ottimizzate e standardizzate non è stata totalmente eliminata la possibilità di contaminazione esterna da impiego di prodotti per la cura e il trattamento dei capelli (shampoo e tinture).

La bontà dei biomarcatori è definita sulla base della relazione con la dose, della sensibilità, anche per bassi livelli di esposizione, e della specificità. I risultati della misurazione devono essere confrontati con valori di riferimento e/o valori limite, in modo da valutare compiutamente il rischio positivo.

Per molti inquinanti, esistono Valori Limite (VL) per l'esposizione inalatoria negli ambienti di lavoro strutturati all'interno di un vero e proprio quadro normativo (DL.vo 81/2008 e s.m.i.), oppure raccomandati da enti o organizzazioni che si occupano di igiene del lavoro quali il *National Institute for Occupational Safety and Health* (lista disponibile all'indirizzo: <http://www.cdc.gov/niosh/docs/2003-154/method-1.html>), l'*Occupational Safety and Health Administration* (lista disponibile all'indirizzo: <http://www.osha.gov/dts/sltc/methods/toc.html>), l'*American Conference of Governmental Industrial Hygienists* (ACGIH, 2016), il *Deutsche Forschungsgemeinschaft* (lista disponibile all'indirizzo: <http://onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/9783527695539>) e molti altri. A livello europeo, a partire dal 1995, lo *Scientific Committee on Occupational Exposure Limits* (SCOEL, 2016) supporta a livello tecnico, attraverso la predisposizione di raccomandazioni scientifiche in merito alla valutazione tossicologica delle sostanze chimiche e agli effetti sulla salute dei lavoratori, le decisioni della Commissione Europea che si traducono poi in proposte regolatorie.

Nei casi di esposizione non lavorativa, come si configura l'esposizione passiva ai vapori emessi della sigaretta elettronica (*e-cig*), non è corretto fare riferimento ai limiti indicati per l'esposizione lavorativa, che possono essere utilizzati solo al fine di un grossolano confronto con le quantità di contaminanti presenti nei vapori. Più indicati i livelli di concentrazione consigliati per l'aria *indoor* (WHO, 2010), gli MRL (*Minimal Risk Level*) dell'*Agency for Toxic Substances and Disease Registry* (ATSDR, 2016) o gli RfC (*Reference Concentration for*

Inhalation exposure) dell'*Integrated Risk Information System* (IRIS, 2016) riportati per alcune sostanze con specifico riferimento alla concentrazioni in aria e desunti dai LOAEL (*Low Observed Adverse Effect Level*) o dai NOAEL (*No Observed Adverse Effect Level*) applicando un fattore correttivo precauzionale.

Per i vapori *e-cig*, inoltre, la distinzione fra esposizione a ingredienti dichiarati e contaminanti è importante al fine del confronto con i VL o altri valori per la qualità dell'aria ambientale, creati a titolo di protezione dei lavoratori o della popolazione generale. Per quanto riguarda gli ingredienti, gli utilizzatori potranno anche porsi a livelli di esposizione comparabili o superiori ai VL per loro scelta volontaria; questo non vale per gli esposti passivamente. Per i contaminanti non si tratta comunque di una scelta volontaria né per utilizzatori né per esposti passivamente, quindi il confronto con limiti e riferimenti sarà importante.

Se per quanto riguarda gli inquinanti aerodispersi generati dai vapori *e-cig* si possono individuare alcuni riferimenti, il numero di sostanze per le quali sono stati individuati valori limite o valori di riferimento biologici risulta esiguo. Per esposizioni lavorative possono essere utilizzati gli IBE (Indici Biologici di Esposizione) ma il DL.vo 81/2008 e s.m.i. ne riporta solo uno per piombo e i suoi composti ionici. Per un esiguo numero di sostanze l'ACGIH pubblica i BEI (*Biological Exposure Index*) (ACGIH, 2016), mentre il DFG fornisce i BAT (*Biological Tolerance Values for Occupational Exposures*) (DFG, 2015). Per i cancerogeni, in base al principio che nessuna esposizione può essere "accettabile" o "tollerata", il DFG definisce gli EKA (*Exposure Equivalents for Carcinogenic Substances*) (DFG, 2015) corrispondenti a diversi livelli ambientali che generalmente non si associano ad effetti negativi sulla salute degli operatori esposti.

Nell'interpretare i risultati del monitoraggio biologico, è necessario considerare le differenze intra- e inter-individuali dei livelli degli indicatori nei tessuti, che dipendono, ad esempio, da variazioni della ventilazione polmonare, della emodinamica, della composizione corporea, della efficacia degli organi escretori o della attività dei sistemi enzimatici che influenzano il metabolismo della sostanza.

Per la popolazione generale non professionalmente esposta, sono stati pubblicati da parte di Enti o Associazioni scientifiche, i Valori di Riferimento Biologici (VRB), ossia valori misurati in gruppi di popolazione denominate di riferimento, selezionati secondo criteri predefiniti. Essi rappresentano un fondamentale strumento per interpretare i livelli di xenobiotici, come tali o come loro prodotti di trasformazione (metaboliti), nelle matrici biologiche anche in situazioni non lavorative. I VRB consentono così di esplorare le relazioni tra uomo, ambiente, alimentazione e abitudini di vita e, diversamente dall'utilizzo chimico-clinico dei parametri biochimici, un loro superamento non può essere associato con effetti tossici a meno di studi specifici eseguiti ai livelli di esposizione da cui derivano. La stima di bassi-bassissimi livelli di sostanze nelle matrici biologiche è dovuta all'evoluzione degli strumenti e dei metodi di misura. Le fonti di esposizione a xenobiotici per la popolazione generale sono estremamente variabili specialmente per alcune tipologie di sostanze. Ne consegue una elevata variabilità delle misure che può essere in parte spiegata individuando i fattori di confondimento noti e raccogliendo le informazioni relative ai singoli soggetti tramite questionari informativi prodotti ad hoc. Nonostante questa pratica eventuali outliers non sono facilmente spiegabili.

In questo contesto, la Società Italiana Valori di Riferimento ha aggiornato nel 2011 la sua lista di VRB dove sono stati riportati per circa 120 analiti l'intervallo di riferimento inteso come 5°-95° percentile della distribuzione e gli indicatori di tendenza centrale (mediana o media geometrica), oltre ai fattori di confondimento noti per le varie sostanze (SIVR, 2011). Anche i *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) hanno pubblicato e recentemente aggiornato il *National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals* dove sono riportati i dati delle NHANES (*National Health and Nutrition Examination Survey*) che comprendono i VRB

della popolazione generale statunitense distinti tra fumatori e non fumatori e per età, genere e razza (CDC, 2015).

Nel caso dell'esposizione ai vapori *e-cig*, prima di intraprendere il monitoraggio biologico, sarà necessario conoscere i componenti e contaminanti dei liquidi e le sostanze che eventualmente si possono formare durante il processo di vaporizzazione. Il monitoraggio biologico potrà essere utilizzato non solo nei casi di esposizione attiva degli utilizzatori, ma anche di esposizione passiva ai vapori espirati negli ambienti dove sono presenti utilizzatori di *e-cig*. Il successo della valutazione dell'esposizione attraverso il monitoraggio biologico è legato anche alla corretta acquisizione delle informazioni utili all'interpretazione dei dati (questionario). Non ultimo per importanza l'utilizzo di metodiche analitiche validate, con incertezza dichiarata e con limiti di quantificazione più bassi possibile.

I maggiori costituenti dei liquidi *e-cig* sono acqua, glicole propilenico, glicerina, aromi in ampia gamma e nicotina quando presente. Il componente più importante dal punto di vista tossicologico, sul quale si basa spesso l'impiego di *e-cig*, è la nicotina: per i fumatori la sigaretta elettronica è un mezzo per ottenere un *intake* di questa sostanza riducendo nel contempo i pericoli associati al fumo di tabacco.

I contaminanti determinati più frequentemente nei liquidi di ricarica sono aldeidi a basso peso molecolare (acetaldeide, formaldeide), aldeidi alifatiche e aromatiche (benzaldeide, vanillina), metalli pesanti, idrocarburi aromatici volatili (toluene, xilene), Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA), nitrosammine tipiche del tabacco. La loro presenza è legata probabilmente agli aromi, ad impurezze dei componenti o al processo di vaporizzazione che avviene ad elevate temperature (Burstyn, 2014; Kim *et al.*, 2013; Laugesen, 2008a; Tierney *et al.*, 2016; Williams *et al.*, 2013). Diversi lavori riportano anche la presenza di formaldeide, acetaldeide, acroleina, idrocarburi aromatici e metalli nei vapori *e-cig* (Bekki *et al.*, 2014; Burstyn, 2014; Farsalinos *et al.*, 2014; Geiss *et al.*, 2015; Goniewicz *et al.*, 2014; Grana *et al.*, 2014; Kosmider *et al.*, 2014; Laugesen, 2008b; Uchiyama *et al.*, 2013).

Per alcune delle sostanze presenti come componenti o contaminanti nei liquidi *e-cig*, o che comunque si potrebbero sviluppare nel processo di vaporizzazione, in particolare per le aldeidi, la valutazione dell'esposizione attraverso il monitoraggio biologico risulta difficilmente praticabile, in altri casi invece risulta facilmente applicabile. Nel capitolo successivo si riportano alcuni esempi di biomarker per la valutazione dell'esposizione ai componenti dei vapori *e-cig*; gli esempi non sono ovviamente esaustivi e rimane spazio per la ricerca di qualsiasi altra sostanza che si ritenga interessante.

Metaboliti target di componenti/contaminanti e sostanze che possono potenzialmente liberarsi durante l'utilizzo di *e-cig*

Glicerina e glicole propilenico

La presenza di glicerina nei processi di anabolismo e catabolismo umani fa sì che non siano utilizzabili biomarker di esposizione. Il glicole propilenico una volta assorbito, viene eliminato per via metabolica o, inalterato, attraverso la clearance renale. La frazione che subisce il metabolismo viene trasformata prima in propionaldeide, poi in acido lattico, e infine ulteriormente in acido piruvico (CHMP, 2014). Il dosaggio del glicole propilenico nell'urina può essere realizzato con metodi gascromatografici con rivelazione selettiva di massa (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry*, GC-MS) o in cromatografia liquida con rivelazione UV (*High Performance Liquid Chromatography-UltraViolet*, HPLC-UV) (Ehlers *et al.*, 2013; Kulo *et al.*, 2011; Porter *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 1983). Vista la scarsa tossicità, sono pochi i lavori disponibili sulla valutazione dell'esposizione occupazionale soprattutto in anni recenti (Laitinen

et al., 1995; Laitinen *et al.*, 1997), fanno eccezione casi legati a intossicazioni per via orale anche da ingestione di farmaci. È da aggiungere che l'utilizzo diffuso di questa sostanza rende difficile evidenziare differenze fra soggetti di controllo e soggetti esposti per via inalatoria.

Acroleina

La popolazione generale può essere esposta per inalazione di aria contaminata e attraverso l'ingestione di alimenti grassi che hanno subito processi di forte riscaldamento. È stato stimato che l'inalazione giornaliera di acroleina attraverso il fumo passivo è compresa fra 19 e 43 µg/giorno (Nazaroff *et al.*, 2004) con livelli di esposizione per i non fumatori attraverso il fumo passivo 2-4 volte superiori rispetto ai non fumatori non esposti a ETS (*Environmental Tobacco Smoke*). L'acido (3-idrossipropil) mercapturico (3-HPMA), noto anche come S-(3-idrossipropil)-N-acetilcisteina è il biomarker urinario utilizzato per l'acroleina. Per questa sostanza sono stati messi a punto metodi di analisi in LC/MS o LC-MS/MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, cromatografia liquida con rivelazione selettiva di massa) (Mascher *et al.*, 2001; Minet *et al.*, 2011; Schettgen *et al.*, 2008) con buoni livelli di precisione (6%) e accuratezza (87-114%). Oltre al 3-HPMA diversi sono gli acidi mercapturici individuati nelle urine di ratto dopo somministrazione di acroleina (ATSDR, 2016). In aggiunta, un metodo per determinare l'acroleina tal quale nelle urine è stato pubblicato (ATSDR, 2016): il metodo prevede l'analisi GC-MS dello spazio di testa con limite di rivelabilità fra 0,056 e 0,28 µg/L a causa di un effetto matrice sul trasferimento in fase vapore dell'acroleina.

I valori di 3-HPMA riportati in letteratura in relazione all'abitudine al fumo rientrano nel range 200-800 µg/24h (non fumatori) e 1200-2800 µg/24 h (fumatori). Alcuni studi specifici riportano livelli mediani di 683 pmol/mg creat (non-fumatori) o 2900 pmol/mg creat (fumatori) (Carmella *et al.*, 2007), oppure di 759,1 ng/mg creat (non fumatori) e 1922,0 ng/mg creat (fumatori) con differenze statisticamente significative (Zhu *et al.*, 2014).

Il dosaggio di 3-HPMA in urina può essere accompagnato dalla ricerca di altri acidi mercapturici, metaboliti di altre sostanze presenti nel fumo di tabacco (Pluym *et al.*, 2015). Due ulteriori interessanti lavori (Frost-Pineda *et al.*, 2008; McRobbie *et al.*, 2015) riportano i dati del monitoraggio biologico dell'esposizione ad acroleina per soggetti fumatori di sigarette e utilizzatori di *e-cig*. In entrambi i casi il passaggio dal fumo di tabacco a quello di *e-cig* si accompagna ad una riduzione dei livelli urinari di 3-HPMA. Sono anche descritti VRB per 3-HPMA in urina (CDC, 2015).

Nicotina e cotinina

Nicotina e cotinina sono senza dubbio gli indicatori biologici più utilizzati per valutare l'esposizione a fumo di tabacco. Nell'uomo la cotinina è il maggior prodotto del metabolismo della nicotina (Benowitz *et al.*, 1994; Benowitz & Jacob, 1994; Benowitz, 1996), la cui principale via metabolica comporta l'ossidazione dell'anello pirrolidinico per formare nicotina-N-ossido e cotinina, che viene a sua volta metabolizzata a trans-3-idrossicotinina (Benowitz *et al.*, 1994; Benowitz, 1996). Quest'ultima risulta la più abbondante nelle urine di fumatori rappresentando il 35-40% dei metaboliti urinari della nicotina. Alcuni autori hanno determinato una differente velocità nel metabolismo della cotinina fra fumatori e non fumatori, con una significativa riduzione dell'emivita plasmatica della nicotina per i fumatori. Anche razza e genere possono influenzare il metabolismo (Benowitz *et al.*, 1999; Caraballo *et al.*, 1998).

Sono state determinate forti correlazioni fra *intake* di nicotina e livelli plasmatici di cotinina e fra cotinina misurata nei fluidi corporei ed esposizione a fumo passivo (ETS): la cotinina urinaria sembrerebbe un buon biomarker per esposizioni prolungate, mentre la cotinina

plasmatica o salivare si è dimostrata un buon indicatore sia per brevi che per prolungate esposizioni (Nagano *et al.*, 2010).

Le conoscenze attualmente disponibili supportano che i dati di cotinina e nicotina, ottenuti nei liquidi biologici dei fumatori, possano essere estrapolati ai non fumatori per stimare l'esposizione a fumo passivo; le difficoltà principali sono rappresentate dal fatto che la nicotina può essere assunta anche con la dieta in quanto presente in patate, pomodori e tè. Nonostante la presenza negli alimenti, la cotinina è ritenuta un indicatore sensibile all'esposizione a fumo passivo, anche se la lunga emivita del metabolita potrebbe portare ad una sovrastima soprattutto nei casi di bassi livelli di esposizione.

Il dosaggio della nicotina, della cotinina e di altri metaboliti, soprattutto nel sangue e nelle urine, risulta ampiamente trattato nella letteratura scientifica. La nicotina viene rapidamente assorbita, distribuita nei vari organi e metabolizzata (emivita plasmatica di circa 2 ore) e può essere utilizzata come indicatore di esposizione solo per tempi molto vicini all'esposizione stessa. La cotinina, a causa della sua emivita abbastanza lunga (19-31 ore), è ampiamente utilizzata per il monitoraggio biologico dell'esposizione a fumo attivo e passivo perché i livelli riscontrati in urine, sangue e saliva sono in relazione con i tempi di esposizione al fumo di tabacco e con il numero di sigarette fumate (Florek *et al.*, 2003). La pericolosità della nicotina per via inalatoria è riconosciuta anche per gli ambienti di lavoro e il DL.vo 81/2008 e s.m.i riporta un VL sulle 8 ore di 0,5 mg/m³, valore del tutto analogo a quelli riportati da ACGIH, NIOSH e OSHA. Interessante anche la significativa correlazione fra nicotina nelle polveri aerodisperse e cotinina urinaria, rilevata nei lavoratori del settore del tabacco (Triakornwongs *et al.*, 2009).

Nei fumatori l'esposizione a nicotina può sicuramente superare i limiti indicati per l'ambiente di lavoro: una concentrazione in aria pari a 0,5 mg/m³ in un'attività lavorativa svolta per 8 ore con volume respiratorio di 8 l/min e un assorbimento medio fra il 75 e l'80% della quantità inalata, sarà associata con una dose assorbita di 1,4-1,5 mg di nicotina, mentre la quantità di nicotina presente nel fumo di una sola sigaretta è dell'ordine di 1 mg.

La cotinina nel sangue e nelle urine è ritenuta un indicatore biologico di esposizione a fumo di tabacco, dotato di buona sensibilità e in grado di evidenziare differenze fra non fumatori, fumatori passivi e fumatori di lieve entità. Diversi sono i VRB proposti per la cotinina nei fluidi biologici: nel *Fourth National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals* (CDC, 2015) sono pubblicati i dati nel siero di non fumatori divisi per età genere e razza; nella Lista della Società Italiana Valori di Riferimento (SIVR) (SIVR, 2011) sono riportati valori per la cotinina urinaria senza distinzione per l'abitudine al fumo.

Per quanto riguarda l'utilizzo di *e-cig*, le indicazioni della letteratura sono poco chiare per stabilire se la quantità di nicotina assorbita è comparabile con quella contenuta nel fumo di sigaretta a parità di dosaggio (Hecht *et al.*, 2015; Ponzoni *et al.*, 2015). In un lavoro condotto monitorando i livelli di cotinina prima e dopo 4 settimane di utilizzo di *e-cig* in 40 fumatori, viene osservato che i livelli urinari di cotinina diminuiscono rispetto al periodo iniziale dove vi era solo consumo di tabacco (McRobbie *et al.*, 2015). Alcuni dei soggetti durante lo studio si erano completamente astenuti dal fumo di tabacco, mentre altri avevano continuato in tale abitudine. I dati evidenziano che gli utilizzatori "dual" tendono comunque ad avere livelli più bassi di cotinina, in concomitanza con la riduzione del consumo di sigarette, sostituito in parte con *e-cig*. Altri lavori hanno evidenziato l'esposizione passiva a nicotina in ambienti frequentati da utilizzatori di *e-cig* (Czogala *et al.*, 2014; Flouris *et al.*, 2013; Schripp *et al.*, 2013).

Per la determinazione della cotinina urinaria sono pubblicati in letteratura molti metodi che prevedono l'utilizzo di tecniche cromatografiche (GC-MS, LC-MS, HPLC-UV) o immunoenzimatiche; l'ampia possibilità di scelta della tecnica analitica favorisce la ricerca di questo biomarker.

Benzene e altri idrocarburi aromatici volatili

La via principale di esposizione a benzene e agli altri idrocarburi aromatici volatili è quella inalatoria ma in certe condizioni anche l'assorbimento cutaneo contribuisce all'esposizione, soprattutto quando tali composti si trovano in forma liquida. Per questo è utile affiancare al monitoraggio ambientale il monitoraggio biologico, che fornisce informazioni sull'assorbimento per tutte le vie di esposizione.

Per il benzene vengono attualmente proposti dei biomarcatori di esposizione derivati dalla correlazione tra la concentrazione aerodispersa e quella del composto stesso o di un suo metabolita in una matrice biologica. L'ACGIH propone valori biologici di esposizione per l'acido S-fenilmercapturico (S-PMA) e l'acido trans,trans-muconico (t,t-MA). Il DFG, stabilisce dei valori EKA per tt-MA, S-PMA e benzene ematico corrispondenti a diversi livelli ambientali (DFG, 2015). Gli stessi biomarcatori possono essere rilevati in campioni biologici raccolti da soggetti non professionalmente esposti (CDC, 2015; SIVR, 2011).

Il t,t-MA non è considerato un metabolita sufficientemente specifico poiché alcuni additivi presenti nei prodotti alimentari conservati, quali l'acido sorbico, seguono un processo metabolico con formazione di t,t-MA (Marrubini *et al.*, 2002; Pezzagno *et al.*, 1999; Weaver *et al.*, 2000). Sebbene alcuni autori abbiano stimato che solo una piccola frazione (0,2%) di acido sorbico è metabolizzata a t,t-MA (Ducos *et al.*, 1992), l'entità dell'interferenza di questo additivo alimentare sull'impiego del metabolita come biomarker di esposizione a benzene rimane non quantificata in quanto l'*intake* dietario di acido sorbico risulta altamente variabile e difficilmente stimabile. La capacità dei soggetti di metabolizzare il benzene a t,t-MA è inoltre modulata da fattori genetici (Rossi *et al.*, 1999), dal sesso (Bergamaschi *et al.*, 1999) e dalle abitudini di vita quali ad esempio il fumo di tabacco (Verdina *et al.*, 2001).

Per quanto riguarda gli altri idrocarburi aromatici volatili, l'ACGIH propone indicatori biologici di esposizione per toluene (o-cresolo e toluene tal quale in sangue e urina), etilbenzene (acidi mandelico e fenilgliossilico in urina), stirene (acidi mandelico e fenilgliossilico e stirene tal quale in urina) e xileni (acidi metilippurici urinari). Per tutti questi biomarker sono stati pubblicati VRB (CDC, 2015; SIVR, 2011).

Tutti i composti e i metaboliti citati possono essere facilmente determinati: i lavori più recenti prevedono l'uso di tecniche strumentali routinarie e non, che includono principalmente l'HPLC-UV (*High Performance Liquid Chromatography-Ultraviolet*), o l'ESI-LC/MS/MS (*Electrospray Ionization-Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry*) per i metaboliti e la GC/MS per i composti non metabolizzati. In ogni caso i fattori che influenzano la fase estrattiva e strumentale devono essere accuratamente valutati.

Il maggior problema legato all'impiego di questi biomarker per evidenziare esposizioni attive a *e-cig*, oppure esposizioni passive ai vapori *e-cig* è legato non tanto alla loro sensibilità/specificità, ovviabile ad esempio con il dosaggio dei composti tal quali in urina, quanto alla aerodispersione come contaminanti ambientali ubiquitari *indoor* e *outdoor*, che rende molto difficile evidenziare i bassissimi livelli di esposizione provenienti dalle *e-cig*. Solo per fare un esempio, il benzene e altri aromatici volatili sono presenti nelle benzine e nel fumo di tabacco. Tra le fonti *indoor* le principali sono il fumo di sigaretta, la cottura dei cibi, il riscaldamento domestico, la pulizia dei locali con detergenti contenenti residui di solventi, la ristrutturazione delle abitazioni con materiali capaci di emettere vapori di composti organici volatili, la fumigazione a scopo di disinfezione o disinfestazione, l'uso di pitture e solventi anche come hobby (Adikofer *et al.*, 1990).

Idrocarburi policiclici aromatici (IPA)

Per la valutazione dell'esposizione interna a IPA in ambienti di vita e di lavoro viene utilizzato con successo il dosaggio dell'1-idrossipirene urinario (1-OHP). Questa sostanza è un metabolita del pirene, sempre presente nelle miscele complesse di IPA anche se la proporzione rispetto agli altri idrocarburi può variare in base alla sorgente di emissione degli IPA stessi.

Diversi autori hanno ottenuto buone correlazioni fra 1-OHP e pirene aerodisperso per attività lavorative con alti livelli di esposizione. Associazioni altrettanto buone sono state ottenute tra pirene e altri IPA aerodispersi (Ifegwu, 2012; Jongeneelen, 2001). L'1-OHP è stato utilizzato anche per la valutazione dell'esposizione a IPA della popolazione generale: in questo caso le fonti di IPA sono essenzialmente l'abitudine al fumo di tabacco, l'inquinamento urbano dovuto ai gas di scarico autoveicolari e le abitudini alimentari (consumo di cibi con elevato contenuto di IPA a causa del processo di cottura ad esempio la grigliatura). Diversi VRB sono riportati per 1-OHP (CDC, 2015; SIVR, 2011): i dati sono distinti tra fumatori e non fumatori e, nel caso della popolazione americana, anche in base ad età, genere e razza. L'indicatore si mostra sensibile anche a piccole differenze di esposizione: per i fumatori di tabacco la sua escrezione cresce all'aumentare del numero di sigarette fumate, mentre per i non fumatori emerge come fattore significativo il consumo di cibi grigliati o arrostiti (SIVR, 2011).

In considerazione del fatto che il pirene è solo uno delle centinaia di IPA che possono essere presenti negli ambienti di vita e di lavoro, in determinate situazioni l'1-OHP può non rappresentare il biomarker più rilevante per l'intera classe di composti. Riguardo all'escrezione di altri metaboliti in urina, i dati disponibili sono molto meno numerosi. I metaboliti degli IPA con più basso peso molecolare quali naftalene, fenantrene e pirene sono stati dosati in diverse situazioni. Ha destato interesse soprattutto il naftalene vista la sua classificazione come possibile cancerogeno umano da diverse agenzie internazionali e perché la sua presenza negli ambienti di vita è stata rilevata come superiore in confronto con altri IPA. Come per tutti i composti volatili la principale via di esposizione è quella inalatoria. Anche per questa sostanza, l'abitudine al fumo di tabacco contribuisce all'esposizione e il naftalene è considerato un inquinante ubiquitario rilasciato da processi di combustione industriali e domestici che portano ad un'esposizione non trascurabile della popolazione generale. Il naftalene è metabolizzato con formazione di più di 30 metaboliti tra i quali 1-naftolo e 2-naftolo in urina sono stati utilizzati in medicina ambientale e occupazionale. È da aggiungere che 1-naftolo è il metabolita principale dell'insetticida carbaryl, non si mostra quindi specifico del naftalene. Sono disponibili VRB per queste sostanze (CDC, 2015; SIVR, 2011).

Molti altri metaboliti sono stati determinati, soprattutto in urina, per la valutazione dell'esposizione a IPA anche in situazioni non lavorative. Pare opportuno accennare a 1-, 2-, 3-, 4-, 9-hydroxyphenanthrene, quali metaboliti del fenantrene (CDC, 2015).

Pesticidi

Seppure senza riscontri nella letteratura scientifica consultata, anche i pesticidi possono essere potenzialmente presenti nei liquidi *e-cig* come contaminanti di componenti e aromi di origine vegetale. I trattamenti antiparassitari eseguiti sul tabacco possono lasciare residui potenzialmente riscontrabili nella nicotina estratta, analogamente le colture dalle quali vengono ottenuti gli aromi (menta, liquirizia, mandorla, fruttati, ecc.) possono contenere residui potenzialmente riscontrabili nei liquidi per sigaretta elettronica. A differenza di altri composti sopra citati (IPA, idrocarburi aromatici volatili), il processo di vaporizzazione ad elevata temperatura può indurre una termodecomposizione dei pesticidi organici con formazione di molecole difficilmente prevedibili. Allo stato attuale delle conoscenze il monitoraggio biologico per la valutazione dell'esposizione a questa tipologia di potenziali contaminanti dei liquidi *e-cig*

risulta scarsamente applicabile, seppure alcuni studi hanno dimostrato un incremento di escrezione di alcuni metaboliti di pesticidi in soggetti fumatori di sigaretta di tabacco (Aprea *et al.*, 1996).

Nitrosammine specifiche del tabacco

NNK e NNN sono due potenti cancerogeni coinvolti nello sviluppo di tumori legati all'uso di tabacco, sono inoltre specifici del tabacco e non si ritrovano in altri prodotti. La formazione di metaboliti urinari e di addotti con DNA, dosabili con tecniche GC-MS o LC-MS, ha reso possibile il monitoraggio biologico delle nitrosammine anche come biomarker di attivazione metabolica. In particolare due metaboliti di NNK, il 4-(metilnitrosammino)-1-(3-piridil)-1-butanolo (NNAL) e il suo coniugato con acido glucuronico, sono stati utilizzati come indicatori biologici di esposizione per fumatori, non fumatori e esposti a fumo passivo, grazie alla relazione significativa fra dose di NNK e NNAL urinario. Queste sostanze sono state determinate in sangue, urina, capelli e unghie insieme a NNN nelle urine (Ashley *et al.*, 2010; Hecht, 2002; Pérez-Ortuño *et al.*, 2016; Yuan *et al.*, 2014). Valori di riferimento per NNAL urinario sono riportati per la popolazione americana (CDC, 2015).

Formaldeide e acetaldeide

Per queste due aldeidi il monitoraggio biologico risulta difficilmente praticabile, a causa della presenza fisiologica, endogena, delle stesse e dei loro metaboliti nei processi metabolici dell'organismo.

La formaldeide e l'acetaldeide possono essere assorbite per inalazione, ingestione e attraverso la cute. Per la formaldeide la maggior parte dell'*intake* giornaliero sarebbe legato all'alimentazione, inoltre il contributo dovuto all'inalazione sarebbe molto maggiore in ambiente *indoor* rispetto all'*outdoor* (WHO, 2010). Il primo contatto con la mucosa nasale, la dissoluzione nel muco e la clearance meccanica della mucosa stessa rappresentano la prima via di eliminazione. Il metabolismo ossidativo porta alla formazione di acido formico, molecola presente naturalmente nell'organismo, che partecipa a reazioni anaboliche e cataboliche. La concentrazione di formaldeide "endogena" nel sangue è circa 2-3 mg/L e l'inalazione di aria contaminata generalmente non altera questi livelli di concentrazione. Il valore medio di formiato nelle urine di soggetti non esposti professionalmente è di 12,5 mg/L, con una notevole variabilità intra- e inter-individuale. Nell'uomo nessuna variazione significativa è stata determinata nelle concentrazioni di formiato urinario dopo esposizione a 0,4 ppm di formaldeide per 3 settimane (SCOEL, 2015). In contrasto, altre pubblicazioni evidenziano variazioni significative dei livelli di acido formico urinario in relazione all'esposizione a formaldeide, fermo restando che, soprattutto a causa delle variazioni endogene, i dati risultano di difficile interpretazione.

L'acetaldeide è trasformata con metabolismo ossidativo in acido acetico e poi in anidride carbonica e acqua; viene inoltre generata a livello epatico e non solo, come intermedio del metabolismo dell'etanolo. L'acetaldeide è stata determinata nell'aria espirata, nel sangue e nelle urine dei consumatori di alcol. La presenza nell'aria espirata è dovuta alla trasformazione dell'alcool da parte della flora batterica del primo tratto dell'apparato digerente (CERI, 2007).

Il metabolismo associato con composti come glutatione e cisteina produce tioeteri e disolfuri escreti nelle urine, ma di gran lunga prevale la formazione di acido acetico. Non sono riconosciuti biomarker di esposizione di applicazione routinaria.

Metalli

Recenti studi hanno anche dimostrato che i fumi che si formano con l'impiego di *e-cig* hanno una dimensione granulometrica sostanzialmente diversa da quelli della sigaretta convenzionale (Williams *et al.*, 2013). La prevalenza di nanoparticelle mette in dubbio l'applicabilità dei comuni biomarker per i metalli eventualmente presenti negli aerosol generati. Tra i metalli più comunemente dosati come tali o come metaboliti nei liquidi biologici possiamo citare antimonio, arsenico, berillio, cadmio, mercurio, nichel, cobalto, tallio, platino, manganese, piombo; questi elementi sono ubiquitari nell'ambiente a causa di fonti naturali e del loro uso industriale e possono essere prevalentemente assorbiti per via inalatoria e digestiva. Non può essere esclusa una esposizione per contatto: il contatto dermico con monete, con materiali trattati in superficie con leghe di cromo e nichel (nichelatura, cromatura) e con gioielli contenenti leghe di cromo e nichel può indurre un assorbimento dei due metalli; anche per il tallio è documentato un assorbimento cutaneo da acque eventualmente contaminate.

La maggior parte di essi è presente nel fumo di tabacco (cadmio, arsenico, antimonio, berillio, cromo, nichel), nei fumi di combustione, nelle emissioni di impianti di termodistruzione dei rifiuti e nelle emissioni di impianti di fusione. Ne consegue un *intake* giornaliero di solito definito sulla base della loro aerodispersione e della presenza in alimenti (soprattutto trattati e raffinati) e acqua potabile. Riguardo agli alimenti, sono da segnalare l'arsenico nei cereali, il cadmio in caffè, tè e crostacei, il mercurio sotto forma di metilmercurio in grandi pesci e uccelli predatori, il nichel in cioccolato, olii idrogenati, dadi. Molti di questi elementi sono inoltre essenziali per l'organismo umano e divengono tossici per *intake* elevati: il cromo è richiesto per il normale metabolismo energetico, una carenza di nichel è legata alla depressione della crescita e alla riduzione dell'ematocrito, il cobalto contenuto (4% in peso) nella vitamina B12 (cobalamina), nutriente essenziale.

Enti e associazioni scientifiche hanno definito VRB che sono in continua evoluzione con la variazione dell'inquinamento ambientale (CDC, 2015; SIVR, 2011). L'aumento dei livelli di platino nell'ambiente e in matrici biologiche ad esempio è stata documentata da numerosi studi in numerosi paesi ed è stata attribuita all'introduzione delle marmitte catalitiche per abbattere le emissioni veicolari. A differenza di altri metalli pesanti, i cui i livelli si vanno abbassando, i livelli di platino vanno aumentando nella popolazione generale con effetti sanitari non del tutto noti. In certi casi i VRB dei metalli sono stati differenziati in base all'età, al sesso, all'abitudine al fumo di tabacco e all'attività antropica nella zona di residenza (SIVR, 2011). Per quanto riguarda il cadmio ad esempio, l'abitudine al fumo di tabacco è la via di esposizione predominante per i fumatori, i cui livelli corporei possono essere approssimativamente doppi dei non fumatori. Per i non fumatori, non esposti in ambito lavorativo, l'ingestione attraverso il cibo è la maggiore via di esposizione.

Alcune forme di ossidazione di vari metalli sono state classificate come cancerogene certi, probabili o possibili per l'uomo (arsenico, cadmio, cromo esavalente, nichel antimonio triossido, berillio). Le conoscenze scientifiche sono notevolmente diverse per i vari metalli ma molto spesso non si conoscono gli effetti di basse dosi. A completare il quadro, molti metalli mostrano un uso terapeutico che deve essere tenuto in considerazione in eventuali studi di popolazione (il platino da trattamenti con chemioterapici antitumorali, il cromo picolinato per favorire la perdita di peso, l'arsenico per trattare alcune forme di leucemia, vari metalli in integratori alimentari e medicinali alternativi alla medicina tradizionale). Analogamente, protesi articolari, otturazioni dentali con amalgama, protesi dentali con leghe oro-platino sono altre fonti rispettivamente di cromo e cobalto, cromo e mercurio, e platino per i soggetti portatori. Ultimamente, vista l'ampia diffusione soprattutto nella popolazione giovane, anche la presenza di tatuaggi deve essere opportunamente documentata ai fini di eventuali assorbimenti di metalli.

L'urina non costituisce sempre la miglior matrice per il dosaggio di metalli che si depositano in gran parte in organi e tessuti. I livelli urinari di molti metalli riflettono per lo più l'esposizione recente (antimonio, cobalto, platino, tallio), il cadmio urinario riflette l'esposizione cumulativa al metallo e la concentrazione nel rene, cromo e nichel sono eliminati per via urinaria con emivita rispettivamente di 10-40 ore e 28 ore dopo assorbimento per via orale. La misura del piombo nel sangue è il metodo preferito per la valutazione dell'esposizione; i livelli urinari riflettono l'esposizione recente ma sono soggetti ad una maggiore variabilità dei risultati e ad una possibile contaminazione dei campioni da analizzare. La concentrazione di mercurio totale nel sangue è dovuta principalmente alla introduzione con la dieta di forme organiche come il metilmercurio. Il mercurio urinario consiste invece principalmente di mercurio inorganico. Le urine sono considerate la miglior matrice per determinare il carico corporeo di mercurio dovuto a esposizione a lungo termine a mercurio metallico e inorganico. Il sangue fornisce informazioni su esposizioni a breve termine e di alta intensità, non utilizzabili per valutare il carico corporeo totale di esposizioni a lungo termine. La matrice "capelli" è utilizzata per molti metalli in special modo per il mercurio per il quale la contaminazione esterna non è ipotizzabile e l'esposizione è primariamente dovuta a dieta e amalgame dentali.

Per molti metalli l'assorbimento, la distribuzione e l'escrezione variano in dipendenza dello stato di ossidazione: l'escrezione urinaria di antimonio risulta maggiore per la forma pentavalente rispetto alla trivalente; per l'arsenico le forme a maggior grado di ossidazione vengono ridotte ad arsenico trivalente e per esposizioni a basse dosi di arsenico inorganico, nelle urine si ritrova circa il 20% di arsenico ionico, il 20% di acido monometilarsonico e il 60% di acido dimetilarsonico. L'esposizione professionale ad arsenico riguarda di solito le sue forme inorganiche e solubili e l'ACGIH propone un indice biologico di esposizione riferito ad arsenico inorganico e metaboliti metilati nell'urina di fine turno settimana (ACGIH, 2016).

Prima di mettere in atto uno studio, riguardante l'esposizione a metalli della popolazione generale, è di fondamentale importanza predisporre un questionario ad hoc che tenga conto di tutti i fattori che possono generare una esposizione compresa la vicinanza ad impianti industriali rilevanti per l'elemento studiato.

Dal punto di vista analitico, tecniche multielementali quali l'ICP-MS (*Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry*) a bassa risoluzione, applicate sul campione sottoposto a semplice diluizione, consentono la determinazione contemporanea di un notevole numero di elementi, seppure in alcuni casi siano necessarie tecniche analitiche più sofisticate (non convenzionali) quali strumenti ad alta risoluzione, oppure sistemi di introduzione del campione alternativi che assicurano una maggior sensibilità analitica: per analiti presenti nell'urina della popolazione generale in concentrazioni dell'ordine dei ng/L la maggior parte dei lavori pubblicati fa riferimento alla spettrometria di massa ad elevata risoluzione (*High Resolution-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry*, HR-ICP-MS) o ad altre tecniche come l'*Anodic Stripping Voltammetry* (ASV).

Altri elementi come ad esempio il mercurio totale urinario e l'arsenico inorganico più forme mono e dimetilate seguono percorsi analitici di solito differenziati dagli altri metalli; nel primo caso una delle tecniche maggiormente impiegate prevede la digestione del campione in forno a microonde e la successiva analisi con la tecnica dei vapori freddi (*flow injection*) previa riduzione delle forme ioniche a mercurio metallico, mentre nel secondo caso il campione deve essere sottoposto ad un processo estrattivo per eliminare le specie trimetilate, quali l'arsenobetaina e il tetrametilarsonio, derivanti dal consumo di cibi a base di pesce, prima di procedere con la determinazione analitica con tecniche di assorbimento atomico o ICP/MS.

Valutazione dell'esposizione attiva e passiva all'e-cig attraverso l'utilizzo di dati di biomonitoraggio

Un numero esiguo delle sostanze indicate sopra, come presenti o potenzialmente presenti nei liquidi *e-cig*, è stato effettivamente indagato con misure di monitoraggio biologico eseguite su utilizzatori o esposti a fumo passivo. Tra queste la nicotina e la cotinina sono state oggetto di articoli scientifici anche in confronto con non fumatori e fumatori della sigaretta tradizionale. Si aggiungono altri studi con l'obiettivo di verificare la riduzione dei livelli dei biomarcatori tipici del fumo di tabacco in utilizzatori di *e-cig* (Hecht *et al.*, 2015).

Un primo problema che si pone è il momento/periodo di raccolta del campione. Per gli utilizzatori attivi, non potendo individuare un periodo di esposizione nell'arco della giornata (l'esposizione avviene di solito in più fasi intervallate da periodi di pausa) si ritiene che l'unica modalità applicabile per la stima delle dosi assorbite sia la raccolta dell'urina delle 24 ore. Il successivo confronto dei livelli di concentrazione con i valori di riferimento di soggetti non fumatori, raccolti nello stesso modo, può permettere di valutare se l'utilizzo di *e-cig* induce un assorbimento significativo dell'analita considerato. Si comprende facilmente che un confronto di questo tipo può essere fatto solo in caso di disponibilità di un numero sufficiente di soggetti che permetta una elaborazione statistica dei dati.

Per composti di cui sia dichiarata/misurata la concentrazione di componenti o contaminanti nei liquidi *e-cig*, la dose totale escreta del composto o di un suo metabolita può essere messa in relazione con l'*intake* inalatorio calcolabile in base al volume di liquido *e-cig* consumato. Conoscendo il metabolismo della sostanza, la relazione risultante può consentire di avere informazioni sull'assorbimento della sostanza in esame. Un approccio di questo tipo, utile anche per implementare modelli per la valutazione del rischio, è applicabile ad esempio per la cotinina, metabolita della nicotina presente in concentrazione nota nei liquidi *e-cig*; lo stesso approccio è molto più difficilmente applicabile in situazioni nelle quali le sostanze presenti nei liquidi (contaminanti) sono in bassissima concentrazione.

Per i non utilizzatori attivi, anche se la raccolta di urina fosse sulle 24 ore, difficilmente i dati di monitoraggio biologico potrebbero fornire informazioni sulle dosi assorbite a meno di non avere informazioni circa le concentrazioni aerodisperse dei vari componenti/contaminanti. Situazioni di questo tipo sono ad esempio configurabili per sostanze caratteristiche dei liquidi *e-cig*, come la nicotina, in ambienti chiusi dove insistono più utilizzatori; la relazione tra concentrazione a livello delle vie respiratorie ed escrezione urinaria nelle 24 ore può essere molto utile anche ai fini di studio.

L'informazione dell'esposizione passiva ai vapori derivanti dall'utilizzo di *e-cig* è comunque un item importante da inserire nel questionario informativo da usare per studi di biomonitoraggio su un numero significativo di campioni della popolazione generale. L'analisi della varianza potrebbe evidenziare la significatività del fattore "esposizione a fumo passivo di *e-cig*" anche nel caso di campioni spot di urina, analizzati per il dosaggio di biomarker di sostanze presenti nei liquidi *e-cig* in bassissime concentrazioni, e non specifiche (contaminanti).

Si ritiene che gli studi di monitoraggio biologico diretti verso utilizzatori ed esposti a fumo passivo di *e-cig* debbano necessariamente essere preceduti da conoscenze approfondite sui componenti/contaminanti dei liquidi e sulle sostanze presenti nei vapori; solo queste conoscenze consentiranno di individuare in maniera appropriata i composti/metaboliti da dosare.

Corretto uso dei liquidi di ricarica e delle e-cig

Sulla base delle conoscenze attuali, l'uso delle sigarette elettroniche non consente di escludere potenziali rischi per la salute umana. Sebbene, diversamente dalle sigarette convenzionali, non producano prodotti della combustione, impurezze e sostanze potenzialmente tossiche sono state riscontrate nella composizione dei liquidi di ricarica. Oltre ai rischi dovuti alla presenza di tali sostanze, il consumatore dovrebbe essere informato anche dei rischi connessi all'utilizzo e ricarica delle sigarette elettroniche al fine di garantirne un corretto uso ed evitare ripercussioni sulla salute.

Ad oggi, la normativa sta fattivamente cercando di colmare le lacune presenti, a tutela della salute dei consumatori. Le sigarette elettroniche (e relativi contenitori di liquidi di ricarica) devono essere conformi al DL.vo 6/2016, alla normativa relativa alle apparecchiature elettriche ed elettroniche (Direttiva 2011/65/CE *Restriction of Hazardous Substances Directive* "RoHS", Direttiva 2014/35/UE, Direttiva 2014/30/UE) e al codice del consumo, al fine di garantire il rispetto dei requisiti tecnici e di sicurezza. I liquidi ricarica devono inoltre essere conformi alle disposizioni previste dai Regolamenti (CE) 1907/2006 (noto come REACH, *Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*) e Regolamento (CE) 1272/2008 (noto come CLP, *Classification Labelling and Packaging*).

In particolare, il DL.vo 6/2016 ha introdotto una serie requisiti al fine di garantire la salute del consumatore, qui di seguito riportati:

- I contenitori di liquido di ricarica non devono superare il volume di 10 mL.
- È stata stabilita una concentrazione massima di 20 mg/mL di nicotina. Tale valore di concentrazione garantisce un rilascio di dosi di nicotina a livelli costanti in condizioni normali di utilizzo.
- Le sigarette elettroniche usa e getta non devono avere serbatoi di volume superiore a 2 mL.
- Le cartucce monouso non devono superare il volume di 2 mL.
- I liquidi di ricarica devono essere prodotti utilizzando esclusivamente ingredienti di elevata purezza. Le sostanze diverse dagli ingredienti possono essere presenti nel liquido contenente nicotina solo a livello di tracce, se tali tracce sono tecnicamente inevitabili durante la produzione.
- Ad eccezione della nicotina, i liquidi di ricarica devono contenere solo ingredienti che non presentano, anche se riscaldati, pericoli per la salute umana.
- I liquidi di ricarica non devono contenere additivi quali: vitamine o gli altri additivi che creano l'impressione che il prodotto produca benefici per la salute o comporti minori rischi per la salute; caffeina o taurina o altri additivi e composti stimolanti che presentano una connotazione di energia e di vitalità; additivi con proprietà coloranti delle emissioni; additivi che hanno proprietà cancerogene, mutagene e tossiche per la riproduzione sotto forma incombusta.
- Le sigarette elettroniche e i contenitori di liquido di ricarica devono essere a prova di bambino e manomissione, e devono essere protetti contro la rottura e le perdite e muniti di un meccanismo per una ricarica senza perdite.
- Le confezioni unitarie di sigarette elettroniche e di contenitori di liquido di ricarica devono essere corredate di un foglietto con: istruzioni per l'uso e la conservazione del prodotto, compreso il riferimento al fatto che l'uso del prodotto è sconsigliato ai giovani e ai non fumatori; controindicazioni; avvertenze per specifici gruppi a rischio; informazioni su eventuali effetti nocivi; capacità di indurre dipendenza e tossicità; recapito del fabbricante o importatore e di una persona giuridica o fisica di contatto all'interno dell'Unione Europea.

- Le confezioni unitarie e l’eventuale imballaggio esterno delle sigarette elettroniche e dei contenitori di liquido di ricarica devono includere un elenco di tutti gli ingredienti contenuti nel prodotto e le avvertenze relative alla salute.

In considerazione della tossicità dei liquidi contenenti nicotina e al fine di garantire che le sigarette elettroniche possano essere ricaricate in modo tale da ridurre il rischio di contatto cutaneo e di ingestione accidentale di tali liquidi, la Commissione Europea ha inoltre ritenuto opportuno emanare la Decisione UE 2016/586 del 14 aprile 2016 (Europa, 2016). Tale Decisione stabilisce le norme tecniche per il meccanismo di ricarica delle sigarette elettroniche e, secondo le disposizioni previste, possono essere immessi sul mercato sigarette elettroniche e liquidi di ricarica solo se il meccanismo con cui le sigarette vengono ricaricate soddisfa particolari condizioni (per maggiori dettagli si rimanda alla sezione “Quadro normativo”).

Le normative sopra citate (insieme alla normativa relativa alle apparecchiature elettriche ed elettroniche e al codice del consumo) rappresentano dei riferimenti cogenti per garantire la sicurezza dei prodotti. Tuttavia, è comunque necessario che il consumatore sia informato e faccia un uso consapevole della sigaretta elettronica e relativi flaconi di liquido di ricarica, al fine di evitare il verificarsi di “incidenti” da uso improprio. L’utilizzo di tali dispositivi deve avvenire in modo responsabile e in base alle modalità cui tali prodotti sono stati destinati. È noto che la resistenza all’interno del dispositivo raggiunge temperature alte e può rappresentare un rischio di ustione nel caso essa venga in contatto con la pelle o le mucose durante il funzionamento del dispositivo (AFNOR, 2015). Un eccessivo surriscaldamento può verificarsi nel caso di sigarette con pulsante di accensione sprovvisti di sistema di disconnessione in seguito a pressioni prolungate. In tal caso l’utente deve consultare il manuale di istruzioni e leggere attentamente le precauzioni (AFNOR, 2015). È inoltre importante verificare la compatibilità e le caratteristiche di funzionamento degli accessori di ricambio al fine di evitare rotture, incendi o esplosioni (AFNOR, 2015).

A seguito di un’aspirazione eccessiva e violenta, il liquido può entrare in bocca e la nicotina contenuta nel liquido può essere assorbita attraverso la mucosa orale o involontariamente ingerita. A seconda del contenuto di nicotina, quest’ultima può provocare sintomi di intossicazione. In caso di sostituzione o ricarica delle cartucce, il liquido può anche fuoriuscire dalla sigaretta elettronica e cadere sulle mani. Se i liquidi contengono nicotina, essa può essere assorbita attraverso la cute. Pertanto le sigarette elettroniche dovrebbero essere ricaricate con il liquido seguendo le istruzioni fornite dal produttore nel manuale di istruzioni. Per verificare eventuali perdite è possibile utilizzare un foglio assorbente (AFNOR, 2015). È inoltre, importante assicurarsi che anche durante l’uso delle sigarette elettroniche non si verifichino rotture e/o perdite. Il bocchino non deve avere bordi taglienti e non deve essere accidentalmente separato dal resto del dispositivo per evitare il rischio che questi possa essere ingerito o causare soffocamento (AFNOR, 2015). Si raccomanda inoltre di tenere i flaconcini di liquido di ricarica lontani dalla portata dei bambini, analogamente a quanto viene raccomandato per i prodotti medicinali e per i prodotti per la pulizia della casa.

Al fine di garantire un uso consapevole, occorre inoltre ricordare che le sigarette elettroniche non si spengono dopo una decina di boccate, come nel caso delle sigarette convenzionali, ma possono essere usate per centinaia di *svapate*, senza interruzione. Pertanto a seguito di un elevato numero di *svapate* può essere assunta una quantità di nicotina che può provocare gravi sintomi di avvelenamento.

Secondo le indicazioni del DL.vo 6/2016, di cui al Titolo III, Capo I, Art. 21, punto 9, commi “c” e “d”:

“9) Le confezioni unitarie e l’eventuale imballaggio esterno delle sigarette elettroniche e dei contenitori di liquido di ricarica:

- c) recano la seguente avvertenze relativa alla salute: «Prodotto contenente nicotina, sostanza che crea un'elevata dipendenza. Uso sconsigliato ai non fumatori.»
- d) le avvertenze relative alla salute sono conformi ai requisiti specificati all'art. 13, comma 2.”

Le informazioni e i consigli per un corretto utilizzo della sigaretta elettronica e dei liquidi di ricarica non intendono escludere altre situazioni o condizioni che potrebbero risultare pericolose. Pertanto il consumatore deve sempre utilizzare tali dispositivi con attenzione, cautela e buon senso.

La sigaretta elettronica può essere dotata di un sistema di blocco/sblocco che si attiva premendo velocemente il tasto presente sulla batteria. Questa procedura consente quindi di bloccare la sigaretta elettronica quando accesa o di sbloccarla quando spenta. È importante bloccare (quindi spegnere) l'apparecchio quando si vogliono effettuare manovre di manutenzione, di pulizia o semplicemente di sostituzione del cartomizzatore. Le *e-cig* con batteria manuale, inoltre, vanno sempre spente (o meglio bloccate) prima di essere riposte in tasca, zaino o borsa. Infatti, se non bloccata, la *e-cig* si attiva ripetutamente scaricandosi e bruciando l'atomizzatore. Per evitare che del liquido di ricarica vada a contatto con le labbra o con la lingua è necessario effettuare svapate lunghe, anche di 4/5 secondi, ma delicate e leggere. La presenza di liquido sulle labbra o sulla lingua può anche dipendere dalla condensa che si forma nell'atomizzatore; in questo caso si consiglia di togliere la cartuccia e asciugare le parti interne dell'imboccatura con un fazzolettino. Durante le manovre di riempimento del cartomizzatore si consiglia di indossare guanti e di procedere con cautela, allo scopo di evitare il contatto del liquido di ricarica con la pelle. Il riempimento deve essere effettuato versando il liquido per sigaretta elettronica nelle estremità laterali del cartomizzatore, facendo attenzione a non farlo cadere nella parte centrale e occupando non più del 90% del volume interno. Il cartomizzatore non va riempito eccessivamente, bensì bisogna lasciare sempre 2 o 3 millimetri di aria tra il liquido e il tappino in silicone per migliorarne il pescaggio per effetto depressivo. Questo accorgimento evita il verificarsi del così detto “tiro a secco” che comporta una sensazione di gusto di bruciato e che danneggia l'atomizzatore.

Uso improprio: intossicazioni da prodotti chimici e azioni conseguenti

Con specifico riferimento alle esposizioni accidentali ad agenti chimici, la principale fonte informativa per la caratterizzazione del fenomeno nei suoi molteplici aspetti è costituita dai Centri Antiveleni (CAV), servizi del Servizio Sanitario Nazionale che operano per la corretta diagnosi e gestione delle intossicazioni. I CAV sono correntemente consultati da altri servizi ospedalieri (es. Pronto Soccorso, reparti di pediatria), da privati cittadini e da altri utenti (es. medici non ospedalieri, 118).

In particolare, le principali caratteristiche di incidenti causati da esposizioni ad agenti chimici di uso domestico sono correntemente rilevate in Italia dal SIN-SEPI (Sistema Informativo Nazionale per la Sorveglianza delle Esposizioni Pericolose e delle Intossicazioni), sistema basato sui dati rilevati con procedura standard dai CAV che è stato inserito a partire dal 2013 nel Programma Statistico Nazionale.

Come evidenziato dalle attività svolte nell'ambito del SIN-SEPI, la sistematica disamina dei dati rilevati con procedura standard dai CAV rende disponibile una base informativa per la tempestiva identificazione di problematiche emergenti che possono derivare dall'immissione in commercio di nuovi prodotti. Inoltre, risulta in grado di orientare interventi di prevenzione e informazione mirati e di verificarne in tempi brevi la ricadute.

Nel periodo compreso tra 1° gennaio 2010 e 30 giugno 2013 è stato evidenziato un rilevante incremento delle consulenze richieste al CAV Niguarda di Milano, come risulta all'Autorità Competente, a seguito di esposizioni a miscele per sigarette elettroniche, indicativo della crescente diffusione di uso di questo prodotto. Per quanto riguarda questa tipologia di evento, i principali fattori di rischio comprendono le caratteristiche di pericolosità del prodotto, le modalità di confezionamento ed etichettatura, le modalità di conservazione e uso.

In tale contesto è utile ricordare che tra i macro obiettivi del Piano Nazionale della Prevenzione (PNP) del Ministero della salute, parte integrante del Piano sanitario nazionale, per il quinquennio 2014-2018, vi è quello di prevenire gli incidenti domestici e la strategia promossa mira a fornire sostegno ai flussi informativi basati sui dati rilevati dai CAV con procedura standard, con l'obiettivo centrale di migliorare la conoscenza del fenomeno degli avvelenamenti in ambiente domestico. Diverse regioni hanno elaborato propri Piani regionali di prevenzione indirizzando specifiche azioni in tale direzione nazionale. È interessante sottolineare che talune Regioni, non aventi un proprio CAV, hanno manifestato interesse ad ottimizzare la conoscenza delle intossicazioni da prodotti chimici anche considerando possibili modifiche delle schede di dimissione ospedaliera piuttosto che di accettazione al pronto soccorso.

Bibliografia

- ACGIH. *Threshold limit values for chemical substances and physical agents and biological exposure indices*. Cincinnati, OH: American Conference for Governmental Industrial Hygienists; 2016.
- Adikofer F, Scherer G, Conze C, Angerer J, Lehnert G. Significance of exposure to benzene and other toxic compounds through environmental tobacco smoke. *J Cancer Res Clin Oncol* 1990;116:591-8.
- AFNOR. *Electronic cigarettes and e-liquids - Part 1 : requirements and test methods for electronic cigarettes*, XP D90-300-1. Saint-Denis: Association Française de Normalisation; 2015.
- AFNOR. *Electronic cigarettes and e-liquids - Part 2: requirements and test methods for electronic cigarettes*, XP D90-300-2. Saint-Denis: Association Française de Normalisation; 2015.
- Aprea C, Betta A, Catenacci G, Lotti A, Minoia C, Passini W, Pavan I, Robustelli Della Cuna FS, Roggi C, Ruggeri R, Soave C, Sciarra G, Vannini P, Vitalone V. Reference values of urinary ethylenethiourea in four regions of Italy (multicentric study). *Sci Tot Environ* 1996;192(1):83-93.
- Ashley DL, O'Connor RJ, Bernert JT, Watson CH, Polzin GM, Jain RB, Hammond D, Hatsukami DK, Giovino GA, Cummings KM, McNeill A, Shahab L, King B, Fong GT, Zhang L, Xia Y, Yan X, McCraw JM. Effect of differing levels of tobacco-specific nitrosamines in cigarette smoke on the levels of biomarkers in smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010;19(6):1389-98.
- ATSDR. *Minimal Risk Levels*. Atlanta, GA: Agency for Toxic Substances and Disease Registry; 2016. Disponibile all'indirizzo: <http://www.atsdr.cdc.gov>; ultimo accesso 6-6-2016.
- ATSDR. *Toxicological profile for propylene glycol*. Atlanta, GA: Agency for Toxic Substances and Disease Registry; 1997. Disponibile all'indirizzo: <http://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp.asp?id=1122&tid=240>; ultimo accesso 6-6-2016.
- ATSDR. *Toxicological profile for acrolein*. Atlanta, GA: Agency for Toxic Substances and Disease Registry; 2007. Disponibile all'indirizzo: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=557&tid=102>; ultimo accesso 6-6-2016.
- Bekki K, Uchiyama S, Ohta K, Inaba Y, Nakagome H, Kunugita N. Carbonyl compounds generated from electronic cigarettes. *Int J Environ Res Public Health* 2014;11(11):11192-200.
- Benowitz NL, Jacob P 3rd, Fong I, Gupta S. Nicotine metabolic profile in man: comparison of cigarette smoking and transdermal nicotine. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;268:296-303.

- Benowitz NL, Jacob P 3rd. Metabolism of nicotine to cotinine studied by a dual stable isotope method. *Clin Pharmacol Ther* 1994;56:483-93.
- Benowitz NL, Perez-Stable EJ, Fong I, Modin G, Herrera B, Jacob P 3rd. Ethnic differences in N-glucuronidation of nicotine and cotinine. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;291(3):1196-203.
- Benowitz NL. Cotinine as a biomarker of environmental tobacco smoke exposure. *Epidemiol Rev* 1996;18:188-204.
- Bergamaschi E, Brustolin A, De Palma G, Manini P, Mozzoni P, Andreoli R, Cavazzini S, Mutti A. Biomarkers of dose and susceptibility in cyclists exposed to monoaromatic hydrocarbons. *Toxicology Letters* 1999;108:241-247.
- 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.
- Caraballo RS, Giovino GA, Pechacek TF, Mowery PD, Richter PA, Strauss WJ, Sharp DJ, Eriksen MP, Pirkle JL, Maurer KR. Racial/ethnic differences in serum cotinine levels among adult U.S. cigarette smokers: the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1991. *JAMA* 1998;280:135-40.
- Carmella SG, Chen M, Zhang Y, Zhang S, Hatsukami DK, Hecht SS. Quantitation of acrolein-derived (3-hydroxypropyl)mercapturic acid in human urine by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry: effects of cigarette smoking. *Chem Res Toxicol* 2007;20(7):986-90.
- Carmines EL, Gaworski CL. Toxicological evaluation of glycerin as a cigarette ingredient. *Food Chem Toxicol* 2005;43(10):1521-39.
- CDC. *National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals - Fourth Report*, February 2015 - Department of Health and Human Services Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention; 2015. Disponibile all'indirizzo: <http://www.cdc.gov/exposurereport/pdf/>; ultima consultazione 6-6-2016.
- CERI. *Hazard assessment report. Acetaldehyde*. Tokyo: Chemicals Evaluation and Research Institute; 2007. Disponibile all'indirizzo: http://www.cerij.or.jp/ceri_en/hazard_assessment_report/pdf/en_75_07_0.pdf; ultima consultazione 6-6-2016.
- Czogala J, Goniewicz ML, Fidelus B, Zielinska-Danch W, Travers MJ, Sobczak A. Secondhand exposure to vapors from electronic cigarettes. *Nicotine Tob Res* 2014;16(6):655-62.
- Ducos P, Gaudin R, Bel J, Maire C, Francin JM, Robert A, Wild P. Trans,trans-muconic acid, a reliable biological indicator for the detection of individual benzene exposure down to ppm level. *Int Arch Occup Environ Health* 1992;64:309-313.
- Ehlers A, Morris C, Krasowski MD. A rapid analysis of plasma/serum ethylene and propylene glycol by headspace gas chromatography. *Springerplus* 2013; 2(1):203.
- ECHA, *Guidance on information requirements and chemical safety assessment. Chapter R.8: Characterisation of dose [concentration]-response for human health*. Helsinki: European Chemicals Agency; 2012.
- EMA-Committee for Human Medicinal Products (CHMP). *Background review for the excipient propylene glycol*. EMA/CHMP/334655/2013. London: European Medical Agency; 2014. Disponibile all'indirizzo: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2014/12/WC500177937.pdf; ultima consultazione 6-6-2016.
- Europa. Decisione di Esecuzione (UE) 2016/586 della Commissione del 14 aprile 2016 sulle norme tecniche per il meccanismo di ricarica delle sigarette elettroniche. *Gazzetta Ufficiale Europea* L 101/16 del 16 aprile 2016.

- Europa. Direttiva 2011/65/UE del Parlamento Europeo e del Consiglio dell'8 giugno 2011 sulla restrizione dell'uso di determinate sostanze pericolose nelle apparecchiature elettriche ed elettroniche. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L174/88 del 01.07.2011.
- Europa. Direttiva 2014/35/UE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 26 febbraio 2014 concernente l'armonizzazione delle legislazioni degli Stati membri relative alla messa a disposizione sul mercato del materiale elettrico destinato a essere adoperato entro taluni limiti di tensione. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 96/357 del 29.03.2014.
- Europa. Direttiva 2014/30/UE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 26 febbraio 2014 concernente l'armonizzazione delle legislazioni degli Stati membri relative alla compatibilità elettromagnetica. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L96/79 del 29.03.2014.
- Farsalinos K, Polosa R. Safety evaluation and risk assessment of electronic cigarettes as tobacco cigarette substitutes: a systematic review. *Ther Adv Drug Saf* 2014;5(2):67-86.
- Farsalinos KE, Gillman G, Poulas K, Voudris V. Tobacco-specific nitrosamines in electronic cigarettes: comparison between liquid and aerosol levels. *Int J Environ Res Public Health* 2015;12(8):9046-53.
- Florek E, Piekoszewski W, Wrzosek J. Relationship between the level and the time of exposure to tobacco smoke and urine nicotine and cotinine concentrations. *Pol J Pharmacol* 2003;55:97-102.
- Flouris AD, Chorti MS, Poulianiti KP, Jamurtas AZ, Kostikas K, Tzatzarakis MN, Wallace Hayes A, Tsatsakis AM, Koutedakis Y. Acute impact of active and passive electronic cigarette smoking on serum cotinine and lung function. *Inhal Toxicol* 2013;25:91-101.
- Frost-Pineda K, Zedler BK, Oliveri D, Feng S, Liang Q, Roethig HJ. Short-term clinical exposure evaluation of a third-generation electrically heated cigarette smoking system (EHCSS) in adult smokers. *Regul Toxicol Pharmacol* 2008;52(2):104-10.
- Geiss O, Bianchi I, Barahona F, Barrero-Moreno J. Characterisation of mainstream and passive vapours emitted by selected electronic cigarettes. *Int J Hyg Environ Health* 2015; 218(1):169-180.
- Goniewicz ML, Knysak J, Gawron M, Kosmider L, Sobczak A, Kurek J, Prokopowicz A, Jablonska-Czapla M, Rosik-Dulewska C, Havel C, Jacob P 3rd, Benowitz N. Level of selected carcinogens and toxicant in vapour from electronic cigarette. *Tob Control* 2014;23(2):133-139.
- Grana R, Benowitz N, Glantz SA. *E-cigarettes a scientific review*. *Circulation* 2014;129(19):1972-1986.
- Hecht SS, Carmella SG, Kotandeniya D, Pillsbury ME, Chen M, Ransom BW, Vogel RI, Thompson E, Murphy SE, Hatsukami DK. Evaluation of toxicant and carcinogen metabolites in the urine of e-cigarette users versus cigarette smokers. *Nicotine Tob Res* 2015; 17(6):704-709.
- Hecht SS. Human urinary carcinogen metabolites: biomarkers for investigating tobacco and cancer. *Carcinogenesis* 2002;23(6):907-922.
- Ifegwu C, Osunjaye K, Fashogbon F, Oke K, Adeniyi A, Anyakora C. Urinary 1-hydroxypyrene as a biomarker to carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon exposure. *Biomark Cancer* 2012;4:7-17.
- Imbriani M, Fiorentino ML, Maestri L, Marsilio MG, Ghittori S. Indoor pollution and biological monitoring of volatile organic compounds (VOC). *G Ital Med Lav* 1996;18(4- 6):151-160.
- 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).
- Italia Decreto Legislativo 16 gennaio 2008, n. 4. "Ulteriori disposizioni correttive ed integrative del decreto legislativo 3 aprile 2006, n. 152, recante norme in materia ambientale". *Gazzetta Ufficiale* n. 24 del 29.01.2008 - Suppl. Ordinario n. 24/L
- Jongeneelen FJ. Benchmark guideline for urinary 1-hydroxypyrene as biomarker of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Ann Occup Hyg* 2001;45(1):3-13.

- 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;1291:48-55.
- Kim YH, Kim KH. A novel method to quantify the emission and conversion of VOCs in the smoking of electronic cigarettes. *Sci Rep* 2015;5:16383.
- Kosmider L, Sobczak A, Fik M, Knysak J, Zaciera M, Kurek J, Goniewicz ML. Carbonyl compounds in electronic cigarette vapors-effects of nicotine solvent and battery output voltage. *Nicotine Tob Res* 2014;16:1319.
- Kulo A, Allegaert K, de Hoon J, Verbesselt R. Determination of Propylene Glycol in Low Volume Plasma and Urine Samples of Neonates by LC with Photodiode Array Detection. *Chromatographia* 2011;73:463-70.
- Laitinen J, Liesivuori J, Savolainen H. Exposure to Glycols and their renal effects in motor servicing workers. *Occup Med* 1995;45(5):259-62.
- Laitinen J, Liesivuori J, Savolainen H. Biological monitoring of occupational exposure to 1-methoxy-2-propanol. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1997;694(1):93-8.
- Laugesen M. *Second safety report on the Ruyan® e-cigarette*. Christchurch, New Zealand: Health New Zealand Ltd; 2008a. Disponibile all'indirizzo: http://www.healthnz.co.nz/2ndSafetyReport_9Apr08.pdf; ultima consultazione 6-6-2016.
- Laugesen M. *Safety Report on the Ruyan® e-cigarette cartridge and inhaled aerosol*. Christchurch, New Zealand: Health New Zealand Ltd; 2008b. Disponibile all'indirizzo: <http://www.healthnz.co.nz/RuyanCartridgeReport30-Oct-08.pdf>; ultima consultazione 6-6-2016.
- Marco E, Grimalt JO. A rapid method for the chromatographic analysis of volatile organic compounds in exhaled breath of tobacco cigarette and electronic cigarette smokers. *J Chromatogr A* 2015;1410:51-9.
- Marrubini G, Coccini T, Maestri L, Manzo L. Effect of sorbic acid administration on urinary trans,trans-muconic acid excretion in rats exposed to low levels of benzene. *Food Chem Toxicol* 2002;40:1799-806.
- Mascher DG, Mascher HJ, Scherer G, Schmid ER. High-performance liquid chromatographic-tandem mass spectrometric determination of 3-hydroxypropylmercapturic acid in human urine. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001;750(1):163-9.
- McRobbie H, Phillips A, Goniewicz ML, Smith KM, Knight-West O, Przulj D, Hajek P. Effects of switching to electronic cigarettes with and without concurrent smoking on exposure to nicotine, carbon monoxide, and acrolein. *Cancer Prev Res (Phila)* 2015;8(9):873-8.
- Minet E, McEwan M, Errington G, Cheung F. 3-hydroxypropyl mercapturic acid interlaboratory method standardization to measure acrolein exposure in human urine. *Epidemiology* 2011;22(1):S230.
- Nagano T, Shimizu M, Kiyotani K, Kamataki T, Takano R, Murayama N, Shono F, Yamazaki H. Biomonitoring of urinary cotinine concentrations associated with plasma levels of nicotine metabolites after daily cigarette smoking in a male Japanese population. *Int J Environ Res Public Health* 2010;7(7):2953-2964.
- Nazaroff WW, Singer BC. Inhalation of hazardous air pollutants from environmental tobacco smoke in US residences. *J Expo Anal Environ Epidemiol* 2004;14 Suppl 1:S71-7.
- Pérez-Ortuño R, Martínez-Sánchez JM, Fu M, Fernández E, Pascual JA. Evaluation of tobacco specific nitrosamines exposure by quantification of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in human hair of non-smokers. *Sci Rep* 2016;6:25043.
- Pezzagno G, Maestri L, Fiorentino ML. Trans,trans-muconic acid, a biological indicator to low levels of environmental benzene: some aspects of its specificità. *Am J Ind Med* 1999;35:511-8.

- Pluym N, Gilch G, Scherer G, Scherer M. Analysis of 18 urinary mercapturic acids by two high-throughput multiplex-LC-MS/MS methods. *Anal Bioanal Chem.* 2015;407(18):5463-76.
- Ponzoni L, Moretti M, Sala M, Fasoli F, Mucchietto V, Lucini V, Cannazza G, Gallesi G, Castellana CN, Clementi F, Zoli M, Gotti C, Braida D. Different physiological and behavioural effects of *e-cigarette* vapour and cigarette smoke in mice. *Eur Neuropsychopharmacol* 2015;25(10):1775-86.
- Porter WH, Rutter PW. Improved GC-MS procedure for simultaneous measurement of ethylene glycol and glycolic acid. *Clin Chem* 2010;56:1900-2.
- Rossi AM, Guarnieri C, Rovesti C, Gobba F, Ghittori S, Vivoli G, Barale R. Genetic polymorphisms influence in benzene metabolism in humans. *Pharmacogenetics* 1999;9:445-51.
- Schettgen T, Musiol A, Kraus T. Simultaneous determination of mercapturic acids derived from ethylene oxide (HEMA), propylene oxide (2-HPMA), acrolein (3-HPMA), acrylamide (AAMA) and N,N-dimethylformamide (AMCC) in human urine using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2008;22(17):2629-38.
- Schripp T, Markewitz D, Uhde E, Salthammer T. Does *e-cigarette* consumption cause passive vaping? *Indoor Air* 2013;23(1):25-31.
- SCOEL. *Formaldehyde. Draft document for public consultation.* Brussels: Scientific Committee on Occupational Exposure Limits; 2015. Disponibile all'indirizzo: <https://circabc.europa.eu/sd/a/d44aedf4-8e61-47b4-96c6-91a6ff3139f7/2015-11-6v11%20REC125%20Formaldehyde%20stage%2040.20.pdf>; ultima consultazione 6-6-2016.
- SIVR. *Lista dei valori di riferimento 2011.* Pavia: Società Italiana Valori di Riferimento; 2011 Disponibile all'indirizzo: <http://associazione.squarespace.com/valori-riferimento/>; ultima consultazione 6-6-2016.
- Tierney PA, Karpinski CD, Brown JE, Luo W, Pankow JF. Flavour chemicals in electronic cigarette fluids. *Tob Control.* 2016. Disponibile all'indirizzo <http://tobaccocontrol.bmj.com/>; ultima consultazione 6-6-2016.
- Trikunakornwongs A, Kongtip P, Chantanakul S, Yoosook W, Loosereewanich P, Rojanavipart P. Assessment of nicotine inhalation exposure and urinary cotinine of tobacco processing workers. *J Med Assoc Thai* 2009;92 Suppl 7:S121-127.
- IRIS. *Chemical Assessment Summary National Center for Environmental Assessment.* Washinton, DC: U.S. Environmental Protection Agency - Integrated Risk Information System; 2016. Disponibile all'indirizzo: <https://www.epa.gov/iris>; ultima consultazione 6-6-2016.
- Uchiyama S, Ohta K, Inaba Y, Kunugita N. Determination of carbonyl compounds generated from the electronic cigarette using coupled silica cartridges impregnated with hydroquinone and 2,4-Dinitrophenyl-hydrazine. *Anal Sci* 2013;29(12):1219-22.
- Verdina A, Galati R, Falasco G, Ghittori S, Imbriani M, Tomei F, Marcellini L, Zijno A, Del Vecchio V, Crebelli R. Metabolic polymorphisms and urinary biomarkers in subjects with low benzene exposure. *J Toxicol Environ Health* 2001;64:607-18.
- Weaver VM, Buckley T Groopman JD. Lack of specificità of trans,trans-muconic acid as a benzene biomarker after ingestion of sorbic acid-preserved foods. *Cancer Epidemiol Biomarker Prev* 2000;9:749-55.
- WHO. *WHO guidelines for indoor air quality: selected pollutants.* Copenhagen: World Health Organization Regional Office for Europe; 2010.
- 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, 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:e57987.

- Yu DK, Sawchuk RJ. Gas-liquid chromatographic determination of propylene glycol in plasma and urine. *Clin Chem* 1983;29(12):2088-90.
- Yuan JM, Butler LM, Stepanov I, Hecht SS. Urinary tobacco smoke-constituent biomarkers for assessing risk of lung cancer. *Cancer Res* 2014;74(2):401-11.
- Zhu X, Tang F, Jun Yang J, Gao Y. Determination of acrolein-derived 3-hydroxypropylmercapturic acid in human urine using solid-phase extraction combined with molecularly imprinted mesoporous silica and LC-MS/MS detection. *Journal of the Chinese Chemical Society* 2014;61(2):227-32.