



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente

Corso di Laurea

Scienze Ambientali e Protezione Civile

Confronto tra la composizione chimica di aerosol prodotti dai riscaldatori di tabacco, sigarette elettroniche e sigarette convenzionali e valutazione della tossicità sulle cellule epiteliali bronchiali umane BEAS-2B

Comparison of the chemical composition of aerosols from heated tobacco products, electronic cigarettes and tobacco cigarettes and their toxic impacts on the human bronchial epithelial BEAS-2B cells

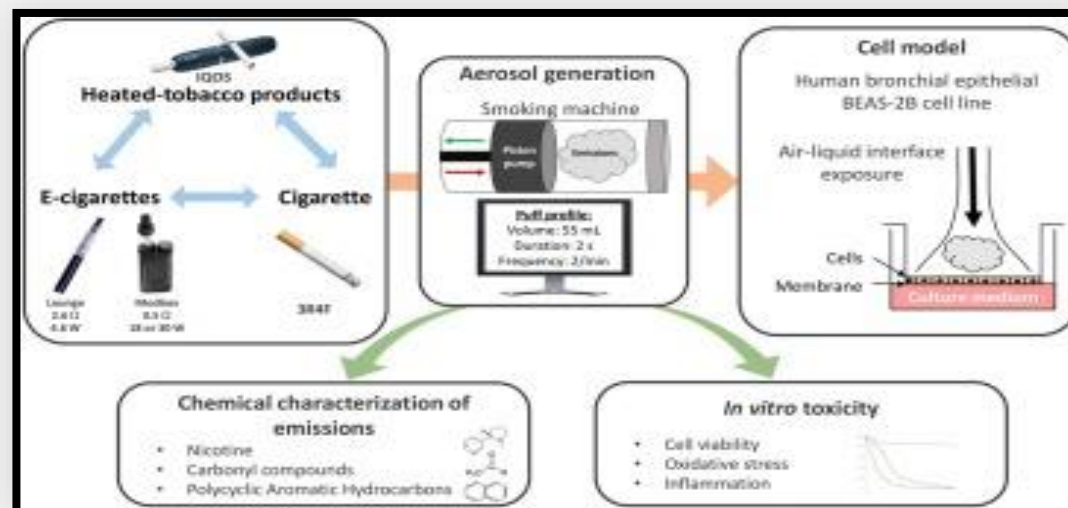
Tesi di Laurea:
Tommaso Come

Docente referente
Prof.ssa Maura Benedetti

Sessione straordinaria
2019/2020

Abstract

Le sigarette elettroniche (e-cigs) ed i prodotti del tabacco riscaldati (HTP) forniscono un'alternativa per i fumatori in quanto sono percepiti come meno dannosi per la salute rispetto alle comuni sigarette. Questa tesi è mirata sia a confrontare la composizione chimica dell'aerosol emesso dai prodotti del tabacco riscaldati, dalle sigarette elettroniche e dalle sigarette convenzionali, sia a valutare la tossicità che questi aerosol possono avere sulle cellule epiteliali bronchiali umane BEAS-2B. Da questo studio si è riscontrato che i prodotti riscaldati del tabacco emettono meno composti carbonilici ed idrocarburi policiclici aromatici rispetto alle sigarette, ma più rispetto alle sigarette elettroniche. Quindi gli aerosol dei prodotti riscaldati del tabacco hanno mostrato una ridotta citotossicità rispetto al fumo di sigarette, ma una maggiore tossicità rispetto ai vapori delle sigarette elettroniche. Potenzialmente i prodotti riscaldati del tabacco e le sigarette elettroniche possono far aumentare lo stress ossidativo e la risposta infiammatoria in maniera simile alle sigarette convenzionali, ma dopo lunghe esposizioni. Questo studio quindi fornisce dati importanti necessari per la valutazione del rischio associato al fumo di tabacco, dimostrando che i prodotti del tabacco riscaldati potrebbero essere meno dannosi delle sigarette convenzionali, ma considerevolmente più dannosi delle sigarette elettroniche.



Introduzione

- Il consumo di tabacco provoca 8 milioni di morti ogni anno in tutto il mondo ed è responsabile di quasi il 30% dei decessi correlati al cancro (soprattutto il 90% dei tumori polmonari).
- Delle oltre 7000 sostanze chimiche presenti nel fumo di tabacco, almeno 250 sono note per essere nocive e circa 70 possono provocare il cancro, tra queste abbiamo: benzene, formaldeide, acetaldeide, acrilamide, nitrosamine, arsenico, cadmio.
- Negli ultimi dieci anni sono presenti sul mercato nuove alternative alle sigarette normali:
 1. le sigarette elettroniche (e-cigs)
 2. prodotti del tabacco riscaldati (HTP)

Entrambi sono considerati come sostituti a basso rischio delle sigarette e hanno rapidamente guadagnato popolarità, ben prima che prove scientifiche sufficienti consentissero di determinare i loro potenziali effetti dannosi sugli utenti.

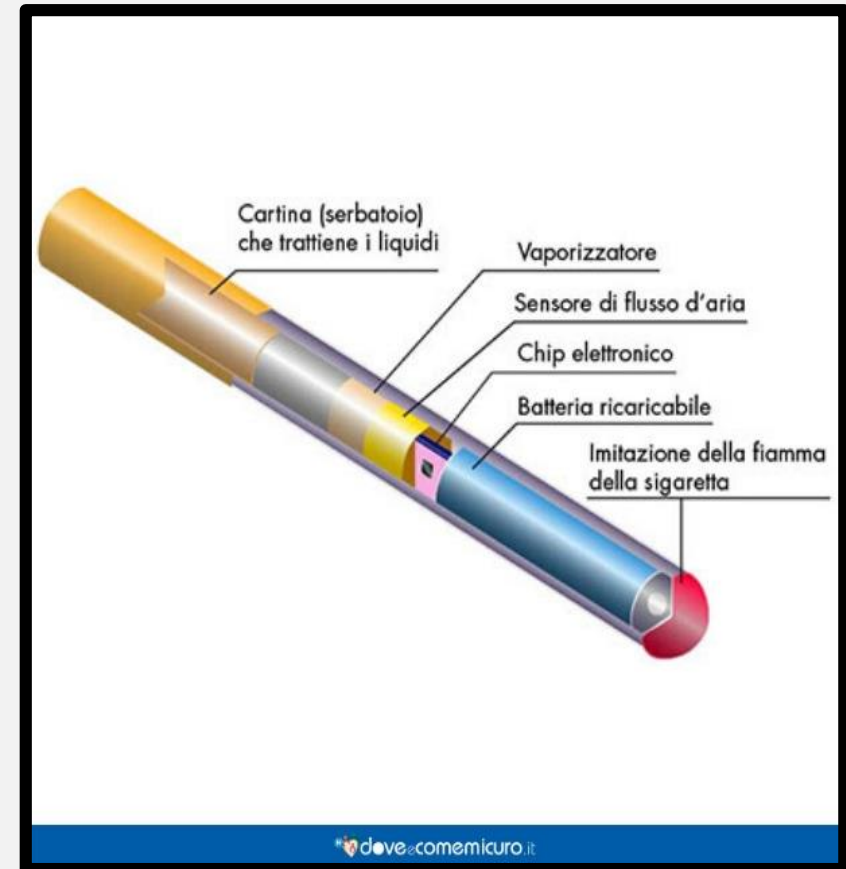
1. Sigaretta elettronica (e-cigs)



2. HTP (IQOS)

1. Le sigarette elettroniche (e-cigs)

Le sigarette elettroniche comprendono un elemento riscaldante alimentato a batteria progettato per vaporizzare una soluzione ("e-liquid") a base di glicole propilenico e/o glicerina, spesso un aroma e nicotina. All'interno dell'aerosol delle e-cigs sono state trovate delle sostanze tossiche come i composti carbonilici (formaldeide, acetaldeide ed acroleina) e idrocarburi policiclici aromatici (IPA) (benzo[a]pirene).



1. Sigaretta elettronica (e-cigs)

2. Prodotti del tabacco riscaldati (HTP)

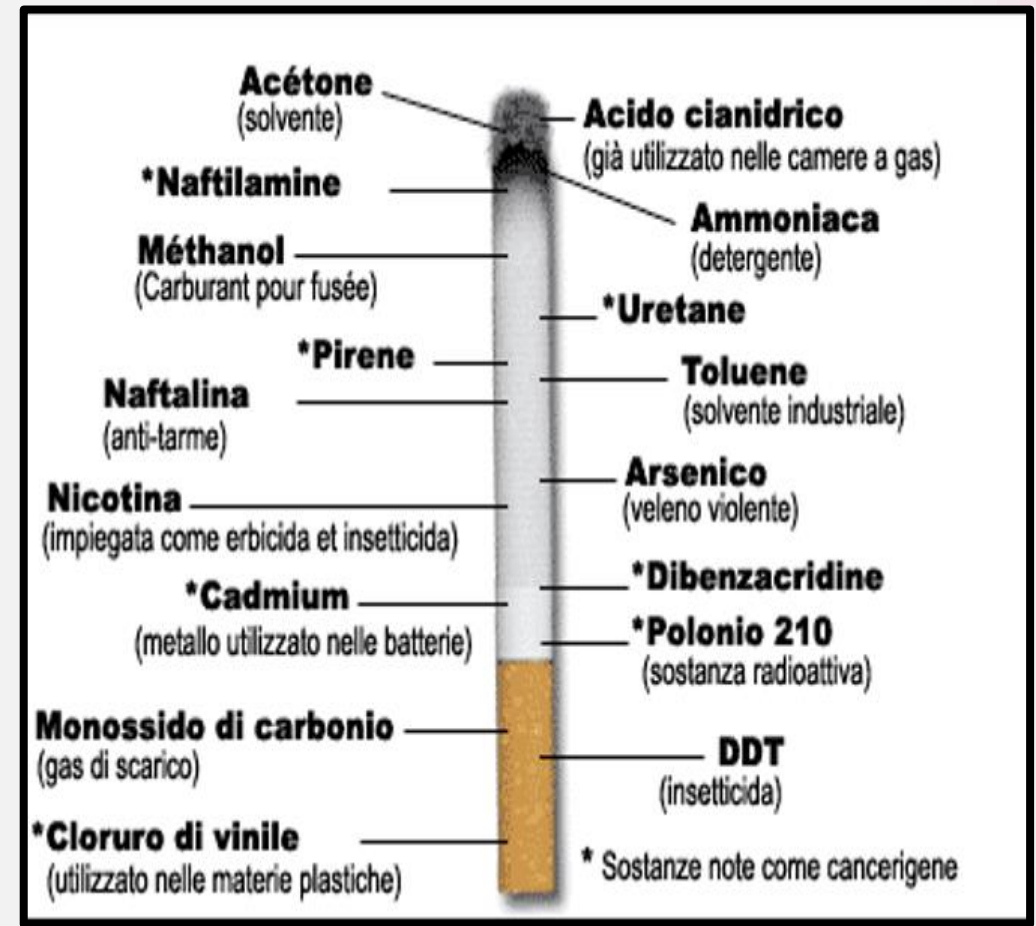
I prodotti del tabacco riscaldati (HTP) hanno un sapore più simile alle sigarette convenzionali, e continuano a fornire nicotina ai consumatori. In particolare, la Philip Morris International ha creato il dispositivo IQOS: i bastoncini di tabacco usa e getta imbevuti di glicerina vengono inseriti in un supporto nel dispositivo IQOS e riscaldati con una lama elettrica. Questi nuovi dispositivi non bruciano il tabacco, come le sigarette (3R4F), ma lo riscaldano ad una temperatura inferiore (minore di 350°C).



2. HTP (IQOS)

3. Sigaretta convenzionale (3R4F)

Le sigarette 3R4F contengono tabacco essiccato sottoposto a lavorazione che è indispensabile per migliorare il sapore. Le evidenze più recenti sostengono che la combustione del tabacco, presente in una sigaretta, produca ben 7000 sostanze, di cui almeno 250 tossiche/irritanti per l'organismo umano e 70 cancerogene per l'essere umano. Tra le sostanze tossiche/irritanti abbiamo: **nicotina**, il **monossido di carbonio**, l'**acido cianidrico**, il **toluene**, l'**acetone**, **catrame**, l'**ammoniaca**, l'**acroleina**, l'**acrilonitrile**, il **cianuro di idrogeno** e la **metilammina**. Tra le sostanze tossiche e cancerogene spiccano invece: **ammine aromatiche**, **nitrosammine**, la **formaldeide**, gli **idrocarburi policiclici aromatici** del catrame, l'**1-3 butadiene**, il **benzene**, il **cumene**, il **cadmio**, l'**acetaldeide**, l'**arsenico**, il **cromo**, il **berillio**, l'**ossido di etilene**, il **nichel**, il **polonio-210** ed il **cloruro di vinile**.



3. Sigaretta 3R4F

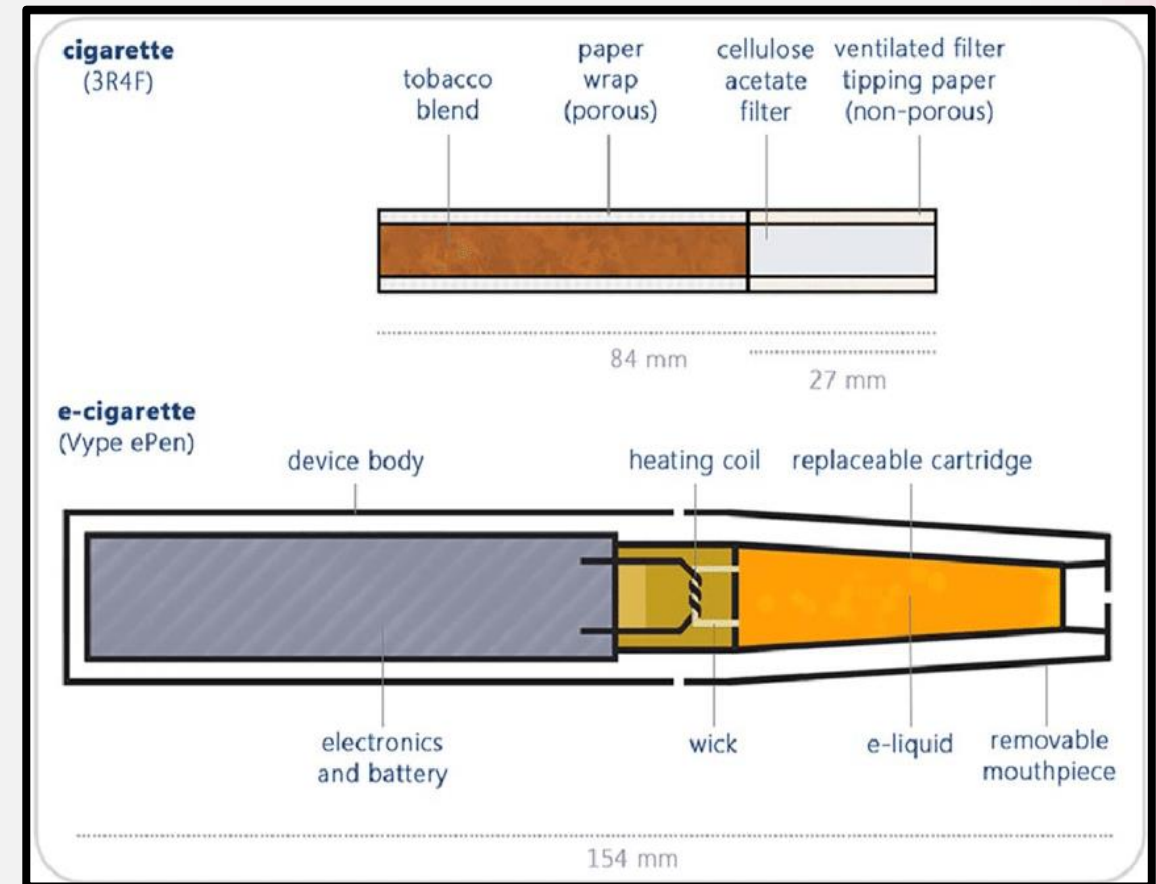
Scopo del lavoro

1. Determinazione e quantificazione delle sostanze chimiche presenti nell'aerosol dalle sigarette di tabacco (3R4F), e-cigs e HTP (modello IQOS).
2. Valutazione della citotossicità, stress ossidativo e risposta infiammatoria nelle cellule epiteliali bronchiali umane, BEAS -2B, in seguito all'esposizione all'aerosol di sigarette di tabacco (3R4F), e-cigs e HTP (IQOS).



Materiali e metodi

- Per la sigaretta 3R4F, tutti i fori di ventilazione sono stati bloccati usando del nastro adesivo, in modo tale che ogni sigaretta fosse consumata dopo 10 boccate.
- Le sigarette elettroniche, utilizzate in questo esperimento sono: "Lounge" (di seconda generazione, dotato di una bobina in nicromo da $2,8 \Omega$ e di alimentazione da $4,6 \text{ W}$) e "ModBox" di terza generazione, utilizzato con il clearomiser "Air Tank" dotato di bobina kanthal da $0,5 \Omega$ e con flusso d'aria parzialmente chiuso.

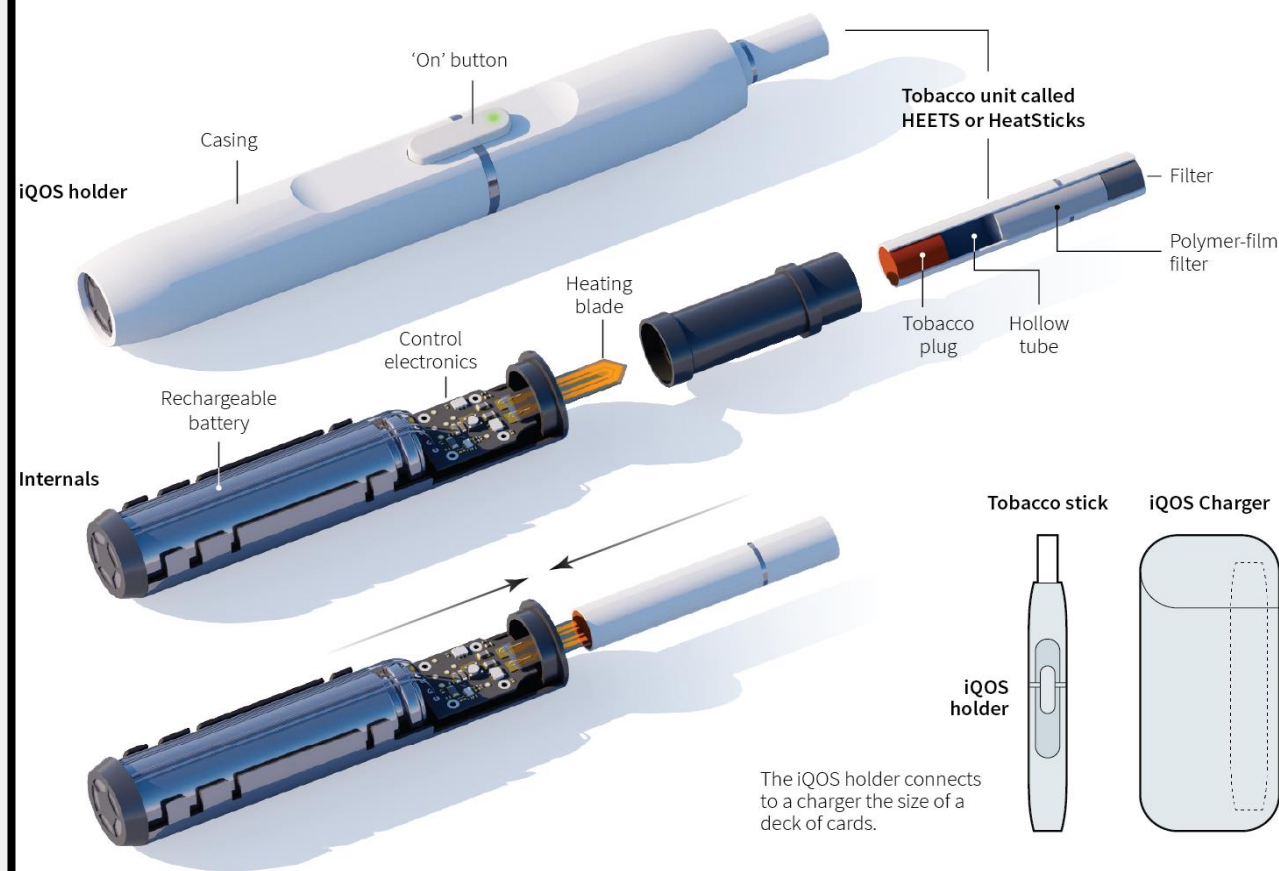


Materiali e metodi

- L'HTP utilizzato in questo studio è il modello iQOS 2.4 prodotto da Philip Morris, con i bastoncini iQOS acquistati in una tabaccheria locale (iQOS è stato pulito dopo ogni 20 stick termico).

Philip Morris' iQOS

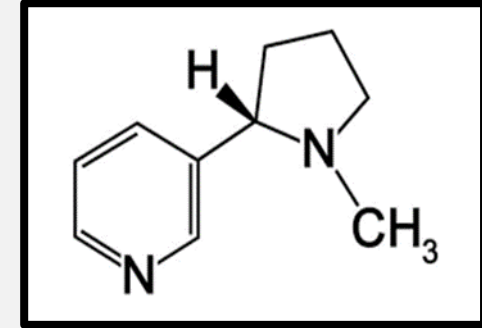
Philip Morris International's iQOS heats tobacco instead of burning it, releasing nicotine-laced vapor. The company says that means the device avoids subjecting smokers to the same levels of carcinogens and other toxic substances found in a regular cigarette.



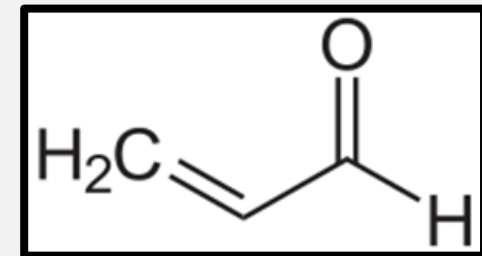
Sources: Philip Morris International; TechInsights Inc

Analisi chimiche

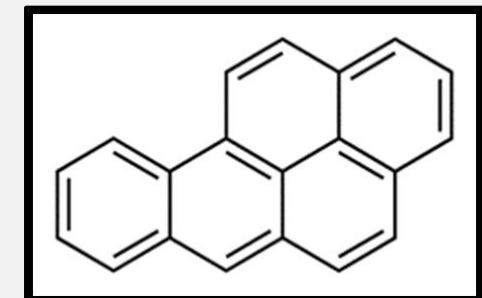
- L'analisi della **nicotina** è stata condotta mediante gascromatografia con rilevamento a ionizzazione di fiamma. Gli aerosol sono stati raccolti in due iniettori di vetro con ugello posto in serie contenente rispettivamente 50 e 25 mL di metanolo, mantenuti a -40°C .
- I **carbonili** sono stati analizzati in UHPLC, in campioni di aerosol raccolti in due cartucce di silice rivestite con 2,4-dinitrofenilidrazina (DNPH) poste in serie. Tali cartucce sono state eluite con 3 o 6 mL di acetonitrile rispettivamente per le cartucce corte e lunghe.
- La determinazione chimica degli **IPA** è stata effettuata utilizzando l'HPLC. Gli aerosol sono stati prelevati contemporaneamente a quelli per l'analisi della nicotina.



Struttura chimica nicotina



Struttura chimica carbonile



Struttura chimica benzo[a]pirene

- **Esposizione in vitro:** Gli esperimenti di esposizione sono stati eseguiti utilizzando la linea cellulare epiteliale bronchiale umana BEAS-2B. Le cellule sono state esposte ad un numero diverso di erogazioni di aerosol (40, 80 e 120 puff per e-cig; 2, 12, 40, 80 e 120 puff per HTP e 1, 2, 4 e 10 puff per sigaretta 3R4F) l'esposizione è durata 24 ore.

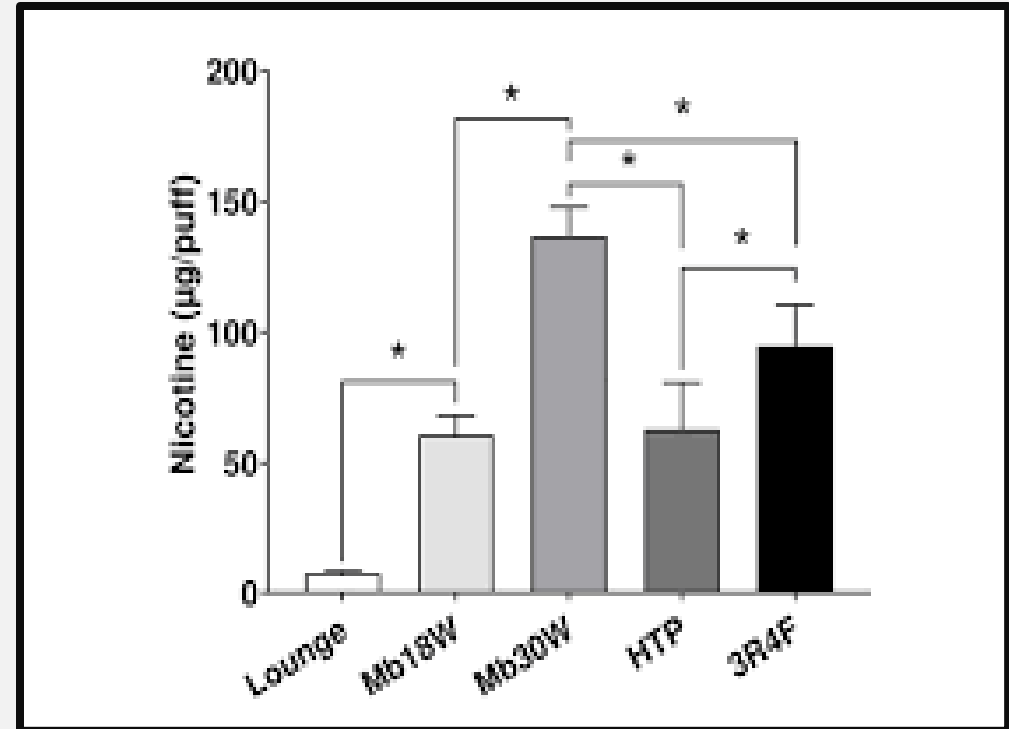
- Vitalità cellulare
- Livelli di glutazione totale
- Analisi di espressione genica
- Determinazione dei mediatori di infiammazione



Risultati

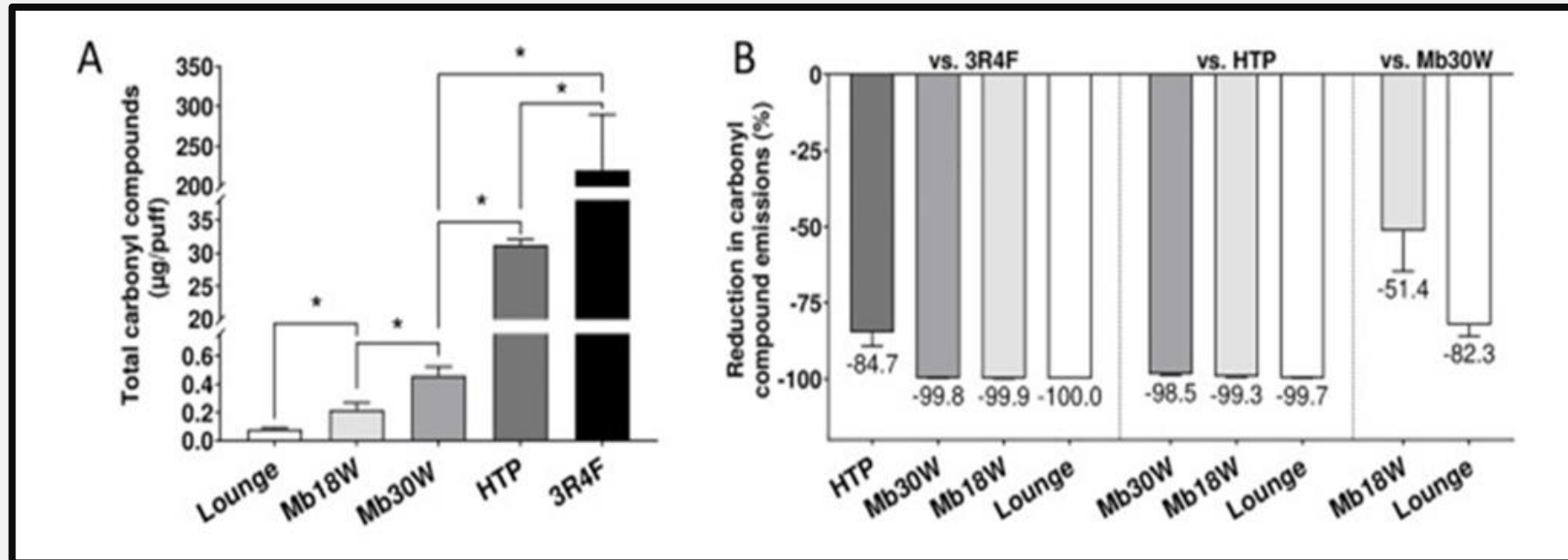
Nicotina

- HTP ha erogato circa il 30% in meno di nicotina, rispetto alla sigaretta 3R4F;
- Per le emissioni delle e-cigs, il modello Lounge ha fornito quantità di nicotina molto inferiori rispetto agli altri 2 modelli testati;
- il modello Modbox produce una quantità di nicotina superiore a Lounge (60 µg/boccata a 18 W e 137 µg/boccata a 30 W).



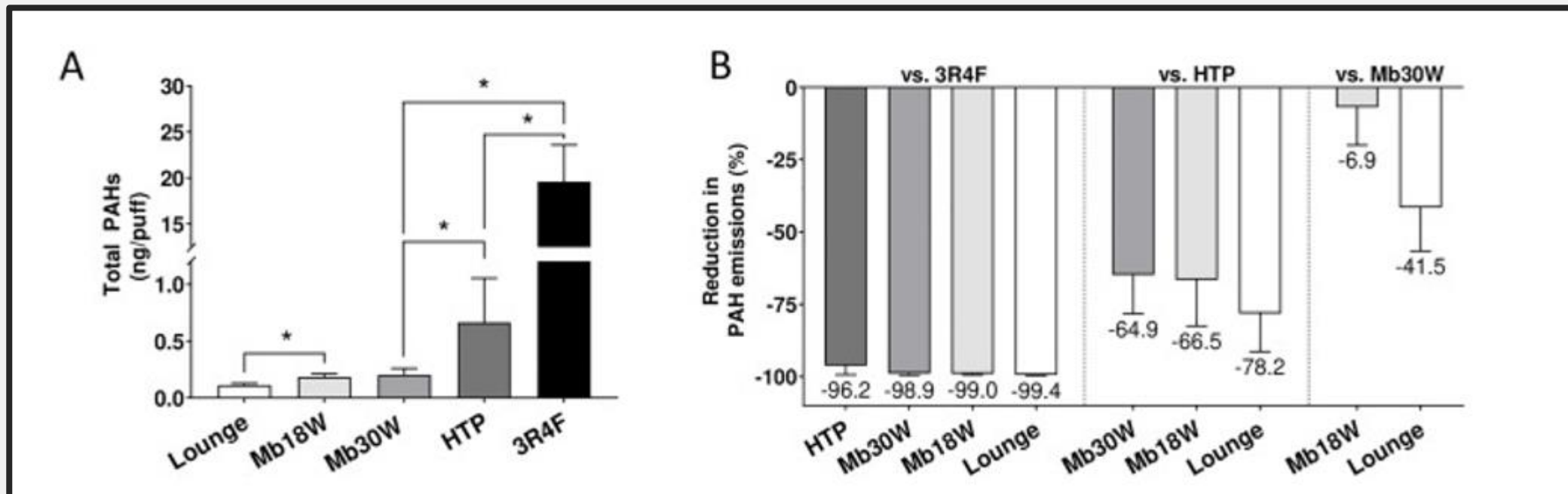
Carbonili

- La Fig. A rappresenta i carbonili totali misurati nell'aerosol di e-cigs, HTP e 3R4F. I livelli di carbonili per le e.cigs e HTP sono sempre inferiori rispetto a quelli misurati nell'aerosol delle sigarette convenzionali. Infatti, l'HTP produce l'84,7% in meno di composti carbonilici rispetto alla sigaretta 3R4F (Fig. B). Le concentrazioni di composti carbonilici misurati nei vapori di diversi modelli di e-cigs sono anche inferiori (98,5%) di quelli presenti negli aerosol degli HTP.
- Per le e-cigs, il modello Lounge e il modello ModBox Mb18 W emettono rispettivamente l'82,3% e il 51,4% di composti carbonilici in meno rispetto al modello ModBox Mb30 W (0,4 µg/puff) (Fig.A e B).



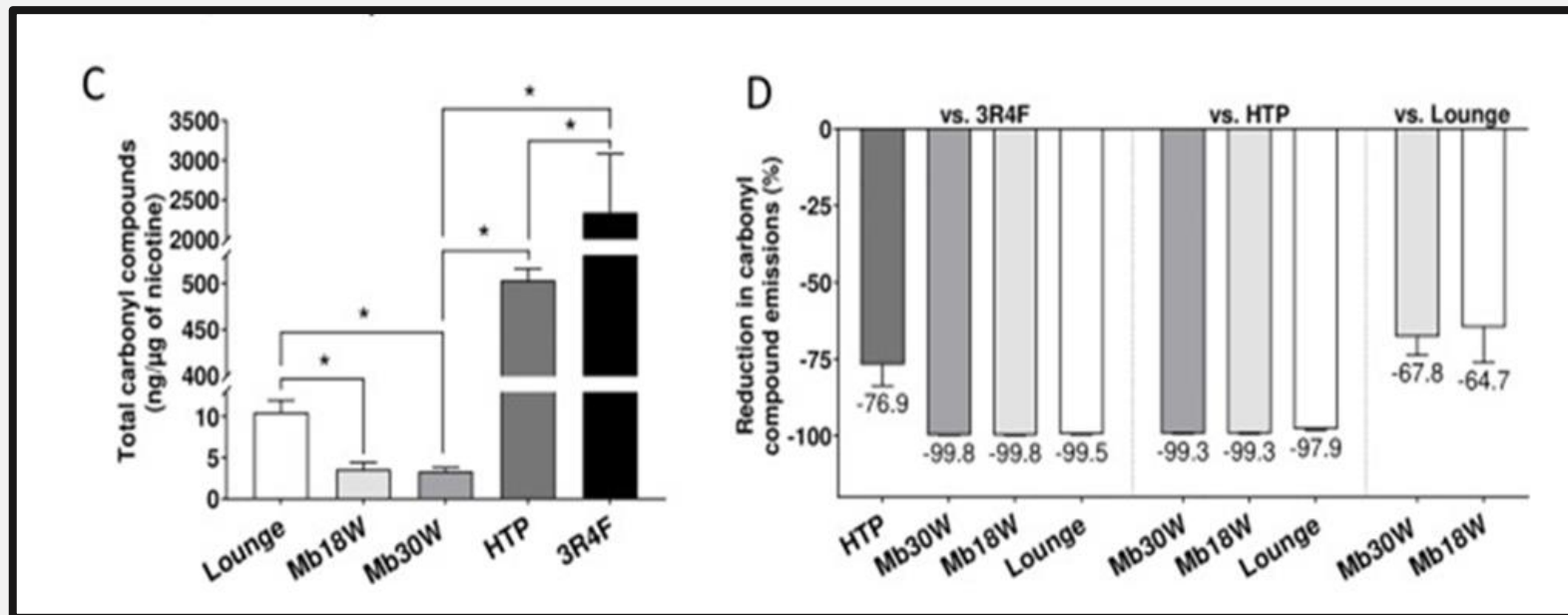
IPA

- Le concentrazioni degli IPA totali misurati per HTP è di 0,7 ng/boccata ed è il 96,2% in meno rispetto a quello presente nell'aerosol della sigaretta 3R4F (19,6 ng/boccata).
- Le sigarette elettroniche emettono il 64,9-78,2% in meno di IPA rispetto all'HTP. Il confronto dei modelli di e-cigs non ha mostrato differenze statisticamente significative nel contenuto di IPA tra Mb18 W e Mb30 W, ma circa il 40% in meno di IPA totali sono emessi dal modello Lounge rispetto a quelli Modbox.



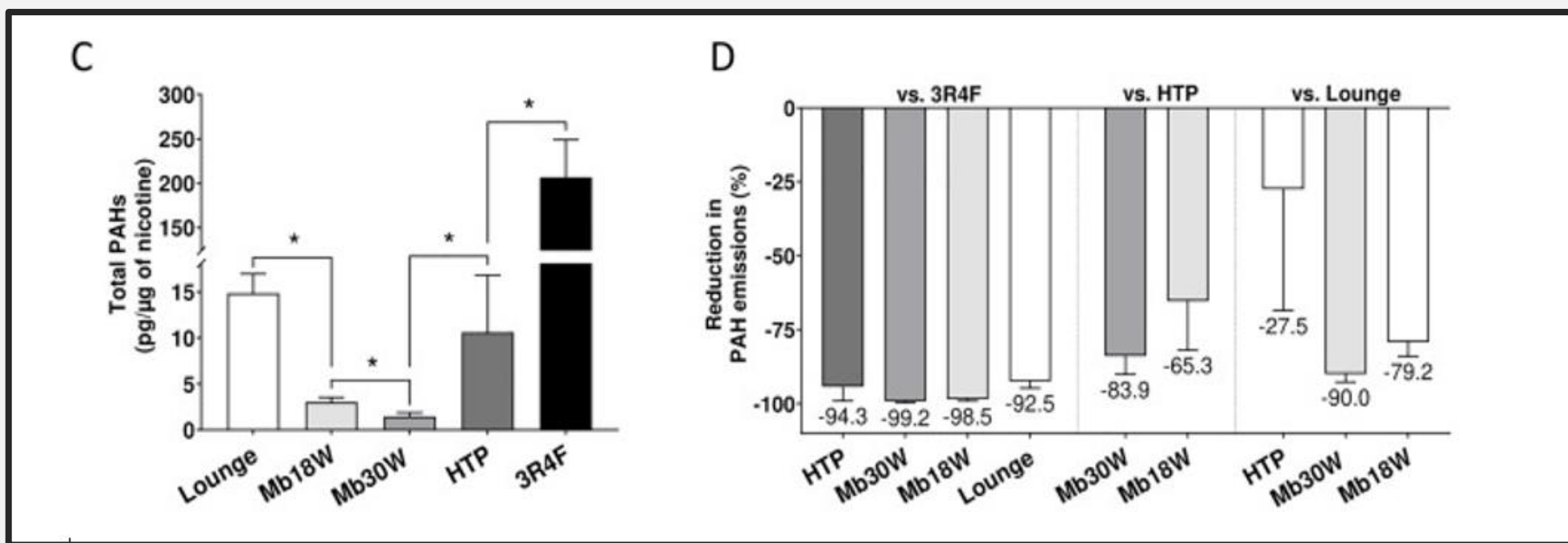
Composti carbonilici dopo normalizzazione della nicotina

- Il confronto dei livelli dei **composti carbonilici** totali dopo la normalizzazione della nicotina (Fig. C e D) ha mostrato che l'HTP emette il 76,9% in meno di composti carbonilici (497 ng/μg di nicotina) rispetto la sigaretta convenzionale (2308 ng/μg di nicotina), ma concentrazioni superiori almeno del 97,9% rispetto ai vapori delle sigarette elettroniche (<10 ng/μg di nicotina).
- Per le e-cigs, il modello Lounge ha emesso più **composti carbonilici** rispetto al modello Modbox, e non è stata rilevata differenza tra Mb18W e Mb30W.



IPA carbonilici dopo normalizzazione della nicotina

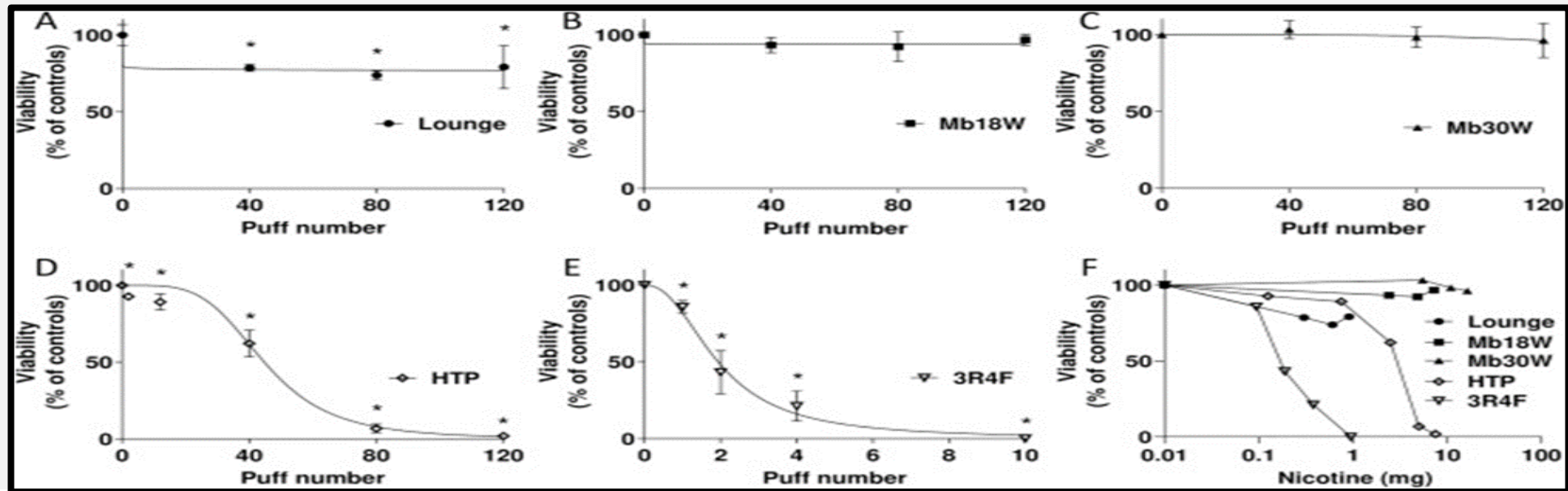
- Anche il confronto delle concentrazioni di **IPA** dopo normalizzazione con nicotina ha mostrato una riduzione sostanziale (94,3%) del loro contenuto nelle emissioni di HTP (11 pg/ μ g di nicotina) rispetto al fumo di sigaretta (207 pg/ μ g di nicotina)
- Per quanto riguarda le e-cigs invece si è riscontrato che il modello Lounge emette più IPA (15 pg/ μ g) rispetto sia ai modelli Modbox (79,2-90%) che al HTP (27.5%).



Citotossicità, stress ossidativo e risposta infiammatoria su BEAS-2B

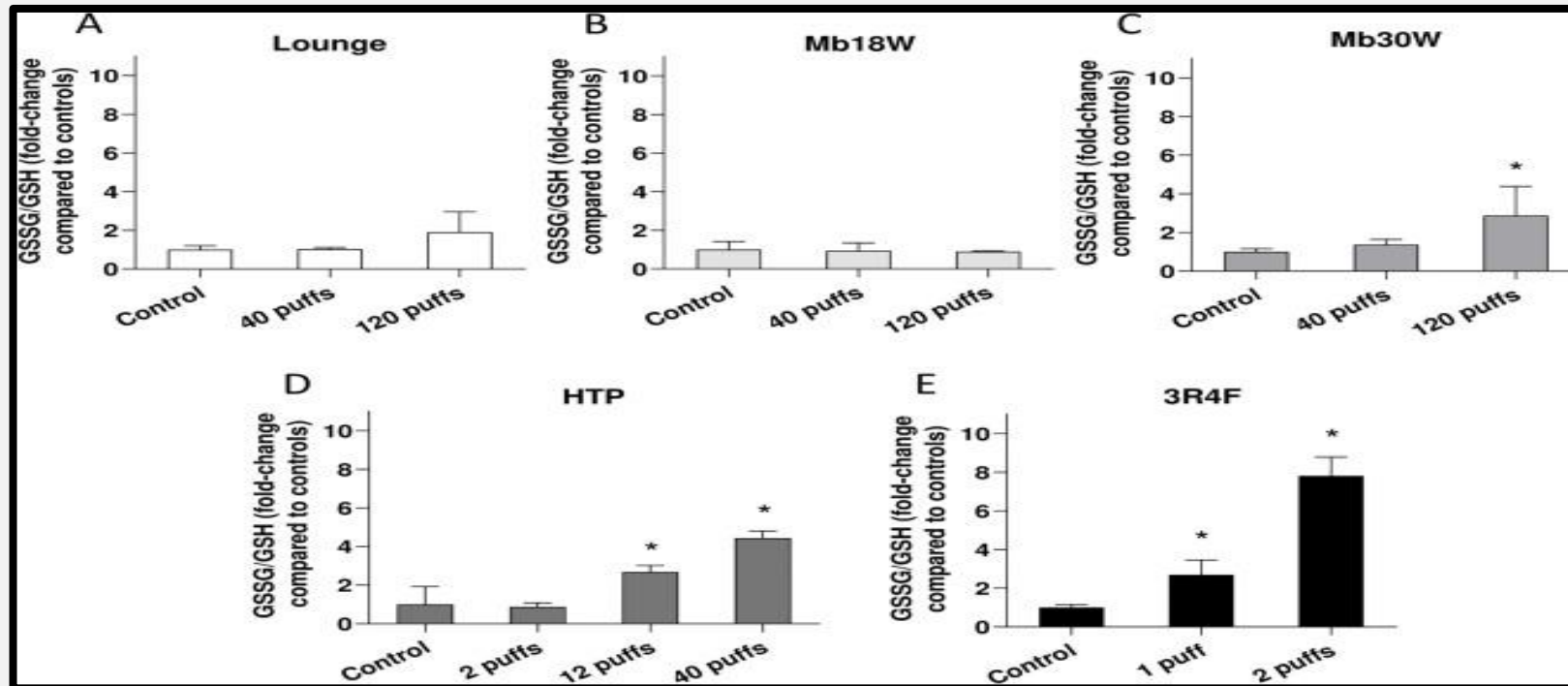
CITOTOSSICITA'

- L'aerosol delle sigarette elettroniche non ha causato effetti citotossici sulle cellule epiteliali bronchiali (modello Modbox).
- Effetti limitati di citotossicità sono stati evidenziati nelle cellule esposte all'aerosol del modello Lounge (vitalità cellulare > 75%).
- Gli aerosol degli HTP hanno causato cambiamenti: da una riduzione della vitalità cellulare già dopo 12 erogazioni (89% di vitalità) a una forte riduzione della vitalità (2%) dopo 120 puff.
- Anche il fumo di sigaretta ha dimostrato una curva dose-risposta completa, ma la sua citotossicità è comparsa con un numero inferiore alle 10 boccate.



STRESS OSSIDATIVO

- Valutato misurando il contenuto intracellulare di glutazione totale (ossidato GSSG e ridotto GSH).
- L'HTP ha indotto un aumento significativo del rapporto GSSG/GSH rispetto al controllo (2,7 e 4,5 volte rispettivamente dopo 12 e 40 erogazioni). Anche la sigaretta 3R4F ha indotto un aumento del rapporto GSSG/GSH dopo una sola erogazione (2,7 volte).
- Per le sigarette elettroniche, il rapporto GSSG/GSH aumenta solo dopo un'esposizione più lunga di 120 erogazioni nel modello Mb30W (variazione di 2,9 volte).



RISPOSTA INFIAMMATORIA:

- Solo quattro mediatori sono stati misurati con livelli quantificabili (IL-6, IL-8, GRO α e MCP-1).
- Un aumento significativo della secrezione di IL-6 è stato osservato nel terreno di coltura delle cellule esposte agli aerosol dei modelli Mb18W (dopo 120 erogazioni) e Mb30W (dopo 40 e 120 erogazioni).
- Nessuna variazione significativa è stata osservata nella secrezione di IL-8.
- In riferimento agli HTP è stata osservata una risposta bifasica nella secrezione di IL-6 e IL-8 con un maggiore aumento della secrezione dopo 12 erogazioni (rispettivamente 3 e 3,3 volte) rispetto a 40 erogazioni (1,3 volte).
- La secrezione di MCP-1 e GRO- α è diminuita in seguito alle esposizioni più lunghe di aerosol prodotto dagli HTP, dal fumo di sigaretta 3R4F e dal vapore prodotto dal modello Mb30W.

	IL-6	IL-8	MCP-1	GRO- α
Lounge				
40 puffs	2.1 \pm 0.6	0.8 \pm 0.3	0.7 \pm 0.2	0.7 \pm 0.1
120 puffs	2.2 \pm 1.0	0.6 \pm 0.1	0.6 \pm 0.2	0.6 \pm 0.1
Mb18W				
40 puffs	2.5 \pm 1.1	1.1 \pm 0.6	1.0 \pm 0.1	1.0 \pm 0.2
120 puffs	2.3 \pm 0.6	1.0 \pm 0.3	0.8 \pm 0.1	0.8 \pm 0.1
Mb30W				
40 puffs	3.3 \pm 0.4	0.9 \pm 0.1	0.8 \pm 0.1	0.7 \pm 0.2
120 puffs	2.4 \pm 0.1	0.6 \pm 0.1	0.6 \pm 0.1	0.4 \pm 0.1
HTP				
2 puffs	0.4 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0	0.6 \pm 0.0	0.9 \pm 0.1
12 puffs	3.0 \pm 3.0	3.3 \pm 0.4	0.6 \pm 0.1	0.7 \pm 0.1
40 puffs	1.3 \pm 1.0	1.3 \pm 1.5	0.2 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1
3R4F				
1 puff	1.4 \pm 0.5	1.4 \pm 0.3	1.0 \pm 0.1	0.7 \pm 0.1
2 puffs	1.5 \pm 0.5	1.8 \pm 0.8	0.2 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1

Conclusioni

- Dagli studi è emerso che l'HTP fornisce una quantità inferiore di nicotina, IPA e carbonili rispetto alle sigarette 3R4F.
- Le emissioni di HTP contengono composti cancerogeni (es. Formaldeide, acetaldeide e benzo [a] pirene) e le quantità di carbonili ed IPA sono maggiori rispetto alle e-cigs.
- HTP ed e-cigs possono indurre lo stress ossidativo e la risposta infiammatoria, in un modo molto simile a quello del fumo di sigaretta, ma solo dopo un'esposizione più intensa. I dati dimostrano che anche l'uso di e-cigs, ad impostazioni di potenza più elevate, emette composti carbonilici ed IPA in quantità maggiori, e quindi genera più stress ossidativo.
- Questi studi dimostrano che l'HTP potrebbe essere meno dannoso della sigaretta convenzionale (3R4F), ma notevolmente più dannoso delle sigarette elettroniche (e-cigs).
- Dovrebbero essere condotti ulteriori studi a lungo termine su modelli animali per confermare questi risultati in vitro e per consentire anche una valutazione della tossicità in seguito all'esposizione cronica ai prodotti emergenti del tabacco.

Bibliografia:

R., Dusautoira , G., Zarcone , M., Verrieleb , G., Garçona , I., Fronvalb , N., Beauvala , D., Allorgea ,V., Riffaultb , N., Locogeb , J., Lo-Guidicea , S., Anthérieua. (2021). Comparison of the chemical composition of aerosols from heated tobacco products, electronic cigarettes and tobacco cigarettes and their toxic impacts on the human bronchial epithelial BEAS-2B cells. Journal of Hazardous Materials 401, 123417

Sitografia:

<https://www.idroponica.it/sigaretta-elettronica-s-1101.html>

<https://www.ilgiornale.it/news/cronache/guerra-i-giganti-delle-sigarette-sui-nuovi-prodotti-tabacco-1901709.html>

<https://www.doveecomemicro.it/enciclopedia/benessere/sigaretta-elettronica>

<https://tobaccoendgame.it/storia/prodotti-a-tabacco-riscaldato/>

<https://www.tabac-stop-center.ch/it/il-tabacco-e-la-salute/composizione-delle-sigarette/>

https://www.researchgate.net/figure/Schematic-representation-of-Vype-ePen-e-cigarette-compared-to-the-3R4F-reference_fig1_316496062

<https://www.reuters.com/investigates/special-report/tobacco-iqos-science/>

<https://it.wikipedia.org/wiki/Nicotina>

<https://it.wikipedia.org/wiki/Carbonile>

[https://it.wikipedia.org/wiki/Benzo\(a\)pirene](https://it.wikipedia.org/wiki/Benzo(a)pirene)

<https://jblabresearch.wordpress.com/2016/10/29/speed-mail-10-colture-cellulari-lezione-7-la-coltura-delle-cellule-animale-parte-i/>





Grazie

Tommaso Come

✉ Tommy.Come16@gmail.com