



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA – TRABALHO FINAL

ANA RITA ORMONDE BETTENCOURT

***MARCADORES INFLAMATÓRIOS NO CONDENSADO DE AR EXPIRADO
EM UTILIZADORES DE DISPOSITIVOS ELETRÓNICOS DE NICOTINA E
TABACO***

Bettencourt, A¹; Alfaro, TM¹; Cruz, C²; Tomé, A³; Donato, MM⁴; Robalo Cordeiro, C¹.

E-mail: anabett20@gmail.com

ARTIGO CIENTÍFICO ORIGINAL

ÁREA CIENTÍFICA DE PNEUMOLOGIA

Orientação: Dr. Tiago Alfaro

Coorientação: Dra. Cristiana Cruz

MARÇO/2017

¹ Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal

² Serviço de Pneumologia A do Centro Hospitalar Universitário de Coimbra

³ Grupo de Neuromodulação - Centro de Neurociências e Biologia Celular, Universidade de Coimbra

⁴ Centro de Pneumologia da Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra

Índice

Resumo	1
Abstract.....	2
Lista de Abreviaturas.....	3
Introdução	5
Materiais e Métodos	8
Resultados	11
Discussão e Conclusões.....	14
Agradecimentos.....	16
Referências.....	17

Resumo:

Introdução: O objetivo deste estudo é averiguar se há alteração de marcadores de lesão oxidativa a curto prazo após uso de dispositivos eletrônicos de nicotina versus o uso de tabaco, numa altura em que o cigarro eletrónico (CE) é propagandeado como alternativa ao tabaco, isenta de riscos para a saúde.

Métodos: O método utilizado consistiu na recolha do condensado do exalado brônquico (CEB) de fumadores de CE e de tabaco, antes e 5 minutos após o uso de cada um destes, e de não fumadores. Participaram neste estudo 5 utilizadores saudáveis de CE e de tabaco e 4 não fumadores saudáveis. Neste artigo apresentamos os resultados relativos ao pH.

Resultados: Não se verificaram alterações significativas entre o pH do CEB de controlos e de fumadores, assim como no pH antes e imediatamente após a utilização de CE e de tabaco ($p > 0,05$).

Discussão: Apesar deste estudo não revelar alterações significativas, o poder do estudo foi baixo face ao pequeno número de voluntários. Estudos com amostras maiores e outro tipo de parâmetros analisados podem revelá-las e tornam-se, portanto, necessários para complementar o conhecimento atual dos efeitos do CE na saúde humana.

Palavras-chave: cigarro eletrónico, testes respiratórios, inflamação, pH, tabaco, stress oxidativo.

Abstract:

Background: This study's purpose is to look for a pattern of oxidative stress markers on short-term vaping vs smoking, as electronic cigarettes are nowadays marketed as healthy substitutes of tobacco.

Methods: Samples of exhaled breath condensate were taken before and five minutes after the use of electronic cigarette and tobacco in users of both, and in non-smokers. The exhaled breath condensate was collected from 4 non-smokers, as controls, and 5 dual users of tobacco and electronic cigarette. In this report, we present the results regarding pH.

Results: No significant pH changes were observed between control group and smokers, as well as before and after use of electronic cigarette and tobacco ($p>0.05$).

Conclusions: Even though this study shows no evidence of important pH changes with the use of electronic cigarette, it was underpowered due to the low number of volunteers. Studies with bigger samples and analysis of other parameters might show differences, so they are required to ascertain the health effects of electronic cigarette use in humans.

Keywords: electronic cigarette; breath tests; inflammation; pH; tobacco, oxidative stress.

Lista de Abreviaturas

AC	Antes do cigarro eletrónico
AT	Antes do tabaco
<i>BTS</i>	<i>British Thoracic Society</i>
CE	Cigarro eletrónico
CEB	Condensado do exalado brônquico
COVs	Compostos orgânicos voláteis
CHUC	Centro Hospitalar Universitário de Coimbra
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crónica
<i>ENDS</i>	<i>Electronic nicotine delivery devices</i>
FEF25	Fluxo expiratório forçado a 25% da capacidade vital forçada
FeNO	Fração excretada de óxido nítrico
FEV1	Volume expiratório forçado em 1 segundo
FMUC	Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra
PC	Pós cigarro eletrónico
PT	Pós tabaco
RGE	Refluxo gastroesofágico
SPP	Sociedade Portuguesa de Pneumologia
<i>SPSS</i>	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>

Introdução

O tabaco e o tabagismo passivo são dois dos principais fatores de risco modificáveis em saúde, ambos associados a uma elevada morbimortalidade, face aos quais o cigarro eletrónico (CE) se apresenta como alternativa saudável e auxiliar da cessação tabágica, sem que haja evidência científica para tal.

Assim, o CE tem vindo a afirmar-se no mercado como o principal produto do grupo dos dispositivos eletrónicos de nicotina (*ENDS - electronic nicotine delivery devices*). É um dispositivo que se pretende assemelhar a um cigarro normal, baseado na inalação de uma solução de nicotina vaporizada por uma resistência integrada. Todavia, e apesar desta solução não integrar muitos dos componentes presentes no tabaco convencional, contém outras potenciais fontes de lesão do trato respiratório, nomeadamente glicerol, propilenoglicol, nitrosaminas específicas do tabaco, dietilenoglicol, cotinina, anabasina, miosmina (1), alguns deles conhecidos irritantes das vias aéreas. Por outro lado, as temperaturas mais elevadas (baterias mais potentes e o uso prolongado) aumentam a taxa de degradação térmica dos componentes (2), potenciando estes efeitos. Esta degradação térmica pode gerar óxido de propileno, acroleína, formaldeído e acetaldeído, potenciais carcinogéneos, a níveis, embora inferiores aos do tabaco, superiores ao recomendado (3, 4). Toda esta situação é ainda agravada pela variabilidade da composição do líquido e por uma regulamentação insuficiente. Para além dos riscos da utilização regular de CE, há também vários casos de intoxicação, principalmente em crianças, via ingestão, inalação, exposição cutânea e ocular (5), assim como casos de explosão das baterias, causando sérias lesões, principalmente a nível da face, mãos, coxas/virilha (6).

Para que haja melhor regulamentação é necessário mais conhecimento sobre os efeitos dos ENDS na saúde humana. Estes estudos são ainda escassos e os seus resultados são

frequentemente pouco conclusivos ou até mesmo díspares. Vardavas et al. (7) descreve o aumento da resistência das vias aéreas periféricas e a diminuição da fração excretada de óxido nítrico (FeNO), sem alterações de provas de função respiratória, enquanto que Flouris et al. (8) obteve resultados semelhantes, mas sem alterações da FeNO. Por sua vez, Ferrari et al. (9) demonstra a diminuição do fluxo expiratório forçado a 25% da capacidade vital forçada (FEF25) e do volume expiratório forçado em 1 segundo (FEV1) em fumadores após o uso de CE sem nicotina.

Em termos de efeito do CE na cessação tabágica, segundo Manzoli et al. (10), ter-se-á verificado a diminuição da taxa de recaída a curto prazo em utilizadores de CE, mas pelo contrário, nos casos dos utilizadores de ambas as formas de uso de nicotina, não se terá observado qualquer benefício. Apesar da falta de evidência de resultados a longo prazo, a *British Thoracic Society (BTS)*, em posição publicada e revista em 2013, assume que fumadores que já experimentaram outros métodos para deixar de fumar, sem sucesso, possam ser encorajados a experimentar CE, e recomenda que os serviços de cessação tabágica ofereçam apoio comportamental nesse sentido. Já em Portugal, a posição da Sociedade Portuguesa de Pneumologia (SPP) é mais cautelosa, desincentivando o seu uso para cessação tabágica ou redução do risco associada ao tabaco (11). Mais uma vez, tornam-se necessários mais estudos sobre os efeitos do CE na saúde humana. Por outro lado, o abuso da própria nicotina não é de todo inofensivo. Esta liberta catecolaminas com efeitos a nível hemodinâmico, provoca alterações do metabolismo lipídico, causando lesão endotelial e resistência à insulina. Em termos de uso de CE com nicotina, está demonstrado que este provoca o aumento da frequência cardíaca e da tensão arterial diastólica, embora em menor dimensão que o tabaco (12).

No que toca à evidência de mecanismo de lesão pelo CE, segundo Aud et al. (13), o conteúdo do CE altera o metaboloma das células epiteliais humanas a um nível parcialmente sobreponível ao espectro de ação do fumo do tabaco convencional, sugerindo que um dos mecanismos de

lesão comum seja o *stress* oxidativo. Outro estudo *in vitro* (14) mostra níveis de *stress* oxidativo menores no CE comparativamente ao tabaco, mas ainda assim aumentados.

Neste projeto, procura-se estudar o nível de *stress* oxidativo no ser humano gerado pelo CE, através da recolha do condensado do exalado brônquico (CEB). Trata-se de uma técnica relativamente recente, não invasiva, na qual, a partir do simples ato de respirar calmamente, se obtém uma amostra representativa do revestimento fluido das vias aéreas. Existem três principais componentes no CEB: água (>99% do volume), compostos orgânicos voláteis (COVs) solúveis em fase aquosa e micropartículas aerossolizadas, constituídas por componentes não voláteis e voláteis que nelas se dissolveram. Pela facilidade em obter amostras, torna-se uma área de grande potencial em investigação médica, sendo um exemplo disto o fato de haver elevado número de estudos em que se investigam padrões de marcadores do CEB, e, em específico, de COVs associados a patologia respiratória, oncológica, cardiovascular e gastrointestinal (15).

A lesão oxidativa pode ser gerada por várias vias: peroxidação lipídica (associada a radicais hidroxilo), lesão de ácidos nucleicos e oxidação proteica. Pela primeira, podemos detetar dois produtos finais, o malondialdeído e 4-hidroxi-2-nonenal, assim como outros: etano, propanol, butanol, hexanal, octanal ou nonanal. Em relação aos COVs a nível pulmonar, segundo Calenic et al. (15), os mais associados à lesão oxidativa são os aldeídos, o etano, o pentano e outros alcanos, hexanal, octanal e nonanal. Dá particular destaque também aos produtos finais da peroxidação lipídica: o malondialdeído e o 4-hidroxi-2-nonenal, este último com reconhecido potencial mutagénico. Em termos de produtos de lesão proteica poder-se-á também medir, por exemplo, do grupo dos carbonilos, o aminocetobutirato.

Num estudo de COVs no CEB de fumadores e utilizadores de CE (16), a quantidade total detetada no respeitante ao CE foi muito inferior à do tabaco, sendo, no entanto, detetados

acetona e isopreno (de provável origem endógena), benzeno, tolueno e 2,5-dimetilfurano (este último específico do tabaco).

Face a estes dados, este estudo propõe a análise de vários parâmetros indicativos de lesão oxidativa no CEB, antes e imediatamente após o uso de tabaco e CE, nomeadamente o pH e COVs. Neste artigo, apresentar-se-á apenas os resultados relativos ao pH, sendo, das que se pretende realizar, a análise mais conhecida, reprodutível e estável ao longo do tempo (17, 18). É uma medida representativa da acidificação das vias aéreas que por sua vez surge com a alteração da homeostasia dos mecanismos antioxidantes, ou seja, pela lesão oxidativa. Sabe-se também que se correlaciona com a gravidade da doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC) e que está alterado na asma.

Materiais e Métodos

Ética

Este projeto foi realizado sob os princípios da Declaração de Helsínquia e aprovado pela Comissão de Ética da FMUC (protocolo CE-007/2017). Todos os participantes tiveram consentimento informado oral e escrito e todos os dados foram anonimizados.

Participantes

Os participantes foram recrutados através de contato pessoal, de lista de email institucional e de redes sociais. Constituíram-se dois grupos: utilizadores de CE e tabaco convencional (de forma a não haver exposição de novo) e não fumadores, sendo em todo o caso excluídos menores, portadores de patologia respiratória e grávidas. A todos os voluntários foi oferecida consulta médica de cessação tabágica.

Os voluntários foram informados que não deveriam fumar nas 3 horas prévias ao estudo e que deveriam evitar refeições copiosas, consumo de álcool, café ou exercício físico intenso imediatamente antes da sessão de recolha de CEB (19).

Desenho do estudo

Cada fumador participou em duas sessões em dias diferentes: uma para o tabaco e outra para o CE. Ambas sessões se iniciaram com uma amostragem de CEB: antes do tabaco (AT) e antes do CE (AC). Depois do período de consumo de CE/tabaco (5 minutos de consumo *ad libitum*), passaram 5 minutos até ser colhida nova amostra, pós cigarro eletrónico (PC) ou pós tabaco (PT). A amostra foi, no prazo de 30 minutos da colheita, mantida a -80°C até posterior análise.

As sessões foram realizadas entre as 17h e 20h, no sentido de limitar o efeito da variabilidade dos parâmetros do CEB ao longo do dia.

Materiais

As colheitas foram realizadas no aparelho EcoScreen® (Jaeger, Alemanha) através de um bucal e válvula esterilizados, *saliva trap* integrado, e uso de clip nasal. A colheita teve uma duração mínima de 12 minutos, colhendo 0,5 a 1 mL de CEB, pipetado para 2 *ependorfs*. O tabaco utilizado foi Marlboro® Silver Blue (Philip Morris USA Inc., Miami, Florida, EUA) e o cigarro eletrônico da marca eGo AIO® (Joyetech, China) 25W, 5V com solução Virginia®, nicotina a 5 mg/mL (constituintes rotulados: propilenoglicol, glicerina vegetal, água destilada, aromatizantes).

Análise laboratorial

A análise foi submetida ao ar ambiente em gelo, durante um período de exposição de 2 horas, para desgaseificação de CO₂, dado que segundo Lin et al. (20), são atingidos valores de pH semelhantes aos obtidos após desgaseificação com argon. Foi posteriormente analisada, em duplicado, com microsonda de pH (método referência WTW pH 3210, pontos de calibração de pH a 4, 7 e 10) a 0°C.

Análise estatística

O programa de análise estatística usado foi *SPSS Statistics 24*® (IBM Corporation, Armonk, Nova Iorque, EUA). Primeiro foi realizada a estatística descritiva de todas as variáveis, representadas pela média \pm desvio padrão. De seguida, foi realizado o teste de Shapiro Wilk

para averiguar a distribuição normal das variáveis AT, AC, PT, PC, AU (não fumadores) e das variáveis derivadas da diferença de amostras obtidas na mesma sessão: DifTabaco e DifCigarroEletrónico. Para comparar distribuições, que não verificaram os pressupostos da normalidade, realizou-se teste de Wilcoxon para estudo das medianas e, para as variáveis que verificaram os pressupostos de uma distribuição normal, teste t de Student para amostras emparelhadas para estudo das médias. Para comparar as amostras basais dos dois grupos de voluntários utilizou-se o teste t de Student para amostras independentes. Para todo o estudo, foi estabelecido nível de significância 0,05 a duas caudas.

Resultados

As características dos participantes do estudo estão descritas na Tabela 1. Um dos voluntários fumadores apenas completou uma das sessões e uma das amostras basais de outro fumador foi invalidada por erro técnico e substituída pela outra.

Tabela 1 – Características da amostra

	Não fumadores	Fumadores
N	4	5
Idade média (anos)	28,75 ± 8,50	25,00 ± 7,52
Volume médio (mL)	0,98 ± 0,24	0,75 ± 0,18
pH médio das amostras base	6,40 ± 0,13	6,73 ± 0,30

Fumadores versus não fumadores

Na Tabela 1, podemos verificar que a média do pH em fumadores foi mais alta que o pH dos não fumadores. No entanto, não se verificou a significância estatística deste fato ($p = 0,082$) em teste t de Student para amostras independentes.

Tabaco versus cigarro eletrônico

As médias de pH AT, PT, AC e PC estão representados na Figura 1. Os valores obtidos para cada participante por sessão estão nas Figuras 2 e 3.

Para a comparação de valores de pH AT e PT foi usado teste de Wilcoxon, dado que a amostra AT não verificava os pressupostos de uma distribuição normal. Com $p=0,625$, não se verificaram alterações estatisticamente significantes entre as duas amostras, apesar de demonstrar *ranks* superiores para o aumento do pH após o uso de tabaco.

No caso das sessões de cigarro eletrônico, ambas as amostras AC e PC verificaram os pressupostos de distribuição normal, portanto foi realizado teste t de Student para amostras

emparelhadas. Mais uma vez, não se verificaram alterações estatisticamente significativas ($p=0,261$) ao nível de significância estabelecido.

Por fim, compararam-se as distribuições DifTabaco e DifCigarroEletrónico através do teste t de Student para amostras emparelhadas. Tal como os resultados anteriores, não se verificaram diferenças significativas ($p=0,325$).

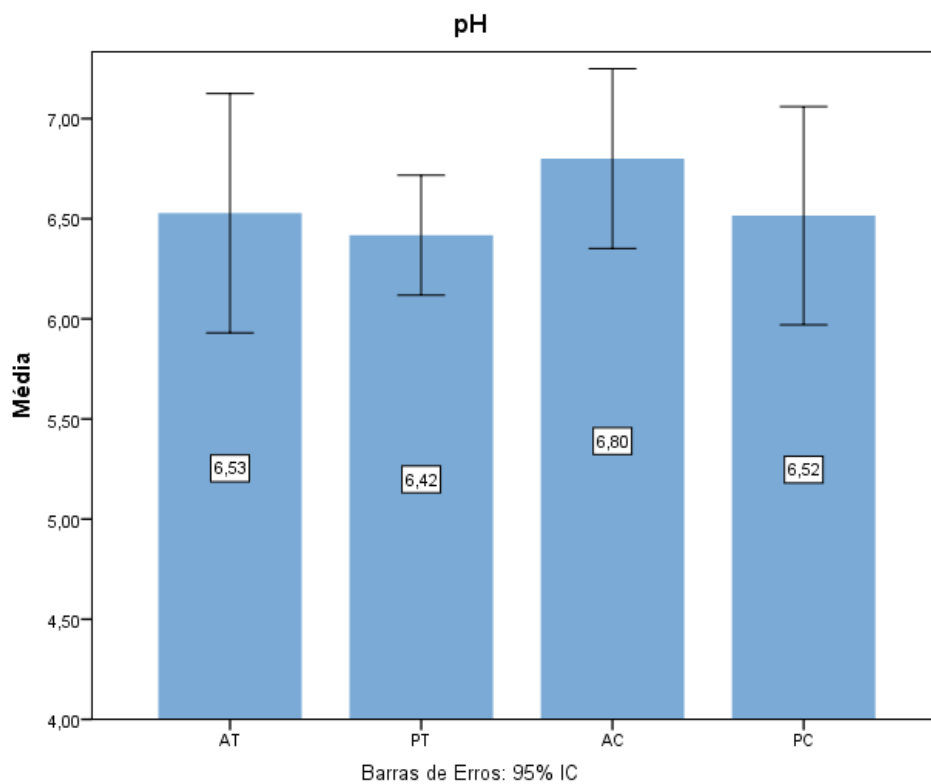


Figura 1 – Médias de pH em cada momento de colheita

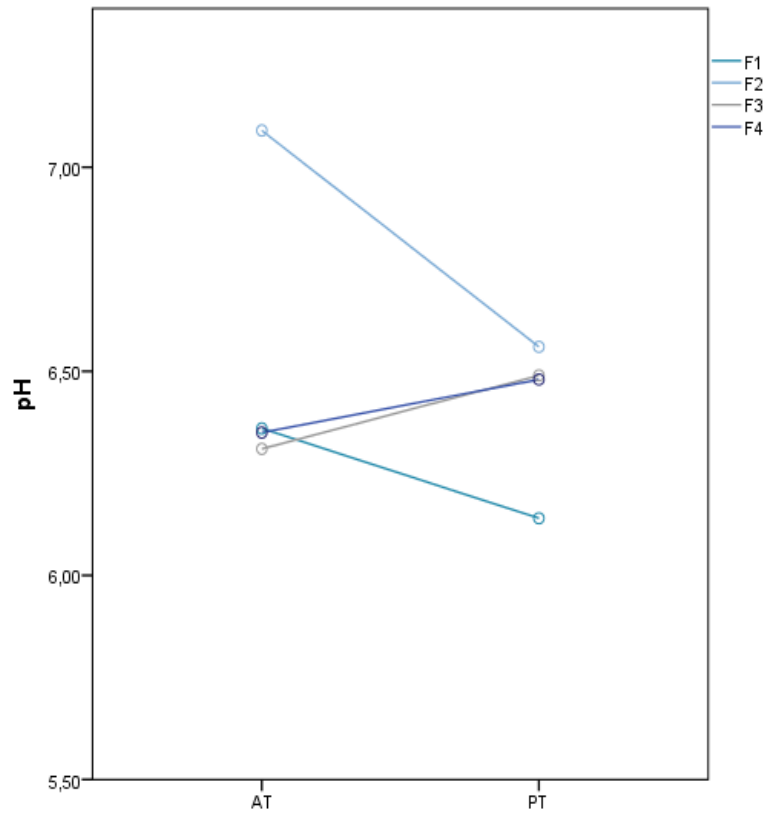


Figura 2 - Medições do pH no CEB colhido antes (AT) e pós consumo de tabaco (PT) em fumadores

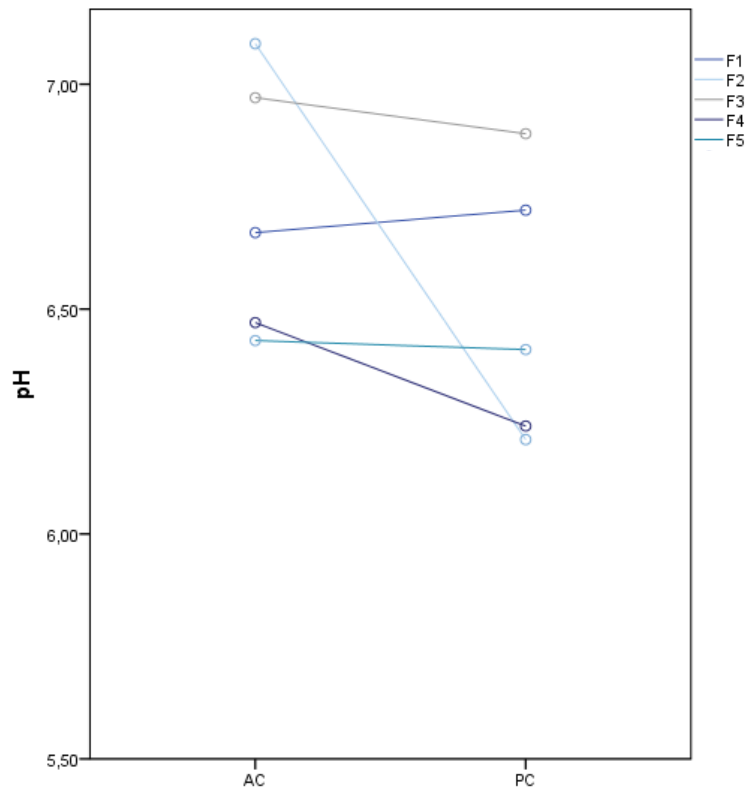


Figura 3- Medições do pH do CEB colhido antes (AC) e pós consumo de CE (PC) em fumadores

Discussão e Conclusões

Neste projeto, verifica-se que tanto o uso de tabaco como o de CE não teve impacto significativo no pH do CEB a curto prazo.

Muito embora o baixo número da amostra constitua um fator limitativo, este resultado é, no que toca a avaliação de lesão oxidativa associada a utilização de tabaco e CE, coerente com o estudo de Poulianiti et al. (21) no qual não se verificaram alterações significativas na atividade da catalase, capacidade antioxidante e níveis de glutatíão reduzido imediatamente e 1 hora após a utilização de CE e tabaco. Todavia, e apenas acerca do tabaco, Inonu et al. relata o aumento basal de 8-isoprostano e H_2O_2 , também marcadores de lesão oxidativa, em fumadores saudáveis (22).

O pH do CEB oferece uma medida representativa relativa, mas não quantitativamente precisa, da acidificação das vias aéreas. Este é determinado principalmente pelos componentes voláteis ácidos, aumentados se a sua fonte (revestimento fluido das vias aéreas) também for ácida. A acidificação por sua vez reflete uma alteração da homeostasia dos mecanismos antioxidantes, provocada por processos inflamatórios/oxidativos, ou a influência de confundidores. A nível patológico, estão estudadas alterações em asma, DPOC, tosse associada ao refluxo gastroesofágico (RGE), lesão pulmonar aguda e síndrome de dificuldade respiratória aguda (23, 24). Neste trabalho, potenciais confundidores, como RGE e consumo de álcool ou café, foram excluídos por indicação prévia direta a cada voluntário. Segundo Do et al.(17), a análise de pH no CEB não é influenciada por condições de armazenamento ou volume da amostra, sendo um bom indicador do estado oxidativo das vias aéreas em medições seriadas em fumadores, conforme realizado neste trabalho.

Os resultados obtidos mostraram pH basal inferior ao descrito noutros estudos de CEB de indivíduos saudáveis (25). Sabe-se que este tipo de amostra biológica é de relativa instabilidade.

Por outro lado, ainda que a análise do CEB seja uma técnica de crescente relevância, todas as suas potenciais aplicações estão em estudo, são, portanto, análises pouco padronizadas. No que toca à avaliação do pH, o principal fator de instabilidade é a presença de CO₂. Deste modo, este tipo de análise requer métodos eficazes e reprodutíveis para a sua desgaseificação, sendo que diferentes tempos de exposição ao ar ambiente podem ter sido uma das causas de erro, apesar de todas as amostras terem tido no mínimo 2 horas de exposição, tal como descrito por Lin et al.(20).

Para além de nunca ter sido feito um estudo do efeito do CE nestes termos, outro aspeto positivo deste trabalho foi a amostragem seriada do CEB em fumadores. Visto serem análises pouco estandardizadas, esta seriação aumenta significativamente o seu valor no estudo do estado oxidativo das vias aéreas. Outra vantagem foi a própria utilização do CEB, uma técnica com elevado e diversificado potencial em investigação e clínica, merecendo, pois, mais estudo. De futuro será ainda importante realizar projetos conjugando este tipo de modelo com outros marcadores de lesão oxidativa/inflamatória, tais como aldeídos (malondialdeído, 4-hidroxihexanal, formaldeído), tolueno, benzeno, 2,5-dimetilfurano. Estes últimos sendo específicos do tabaco, foram, todavia, detetados no CEB após utilização de CE, como já referido.

Em conclusão, não se verificaram alterações no pH do CEB imediatamente após utilização de tabaco e CE, o que apenas significa a importância de se continuar a fazer mais estudos sobre os efeitos da exposição ativa e passiva ao CE na saúde humana, a curto e longo prazo, indispensáveis como suporte de uma regulamentação mais conhecedora e eficaz.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço ao meu orientador, Dr. Tiago Alfaro, pela orientação e, sobretudo, pela disponibilidade e colaboração que tornaram este projeto possível.

À minha coorientadora Dr.^a Cristiana Cruz, agradeço o apoio em cessação tabágica aos voluntários.

Ao Professor Dr. Carlos Robalo Cordeiro, Diretor do Serviço de Pneumologia A do Centro Hospitalar Universitário de Coimbra (CHUC), agradeço o apoio institucional ao disponibilizar o espaço e o material utilizado no estudo.

Ao Dr. Ângelo Tomé pela pronta e indispensável disponibilidade em colaborar através da técnica laboratorial descrita.

À Dr.^a Maria Manuel Donato pelo importante contributo científico na área do CEB e, em especial, dos COVs.

Às enfermeiras Ana Cecília Lopes e Cláudia Reis pela colaboração prestada na esterilização diária do material.

Por último, mas não menos importante, aos amigos e familiares que me ajudaram ao longo dos últimos meses.

Referências

1. Westenberger BJ. Evaluation of e-cigarettes Saint Louis, MO: Department of Health and Human Services Food and Drug Administration; 2009 [cited March 2017]. Available from: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/ScienceResearch/UCM173250.pdf>.
2. Sleiman M, Logue JM, Montesinos VN, Russell ML, Litter MI, Gundel LA, et al. Emissions from electronic cigarettes: key parameters affecting the release of harmful chemicals. *Environmental Science & Technology*. 2016;50(17):9644-51.
3. Uchiyama S, Inaba Y, Kunugita N. Determination of acrolein and other carbonyls in cigarette smoke using coupled silica cartridges impregnated with hydroquinone and 2,4-dinitrophenylhydrazine. *Journal of Chromatography A*. 2010;1217(26):4383-8.
4. Kosmider L, Sobczak A, Fik M, Knysak J, Zaciera M, Kurek J, et al. Carbonyl Compounds in Electronic Cigarette Vapors: Effects of Nicotine Solvent and Battery Output Voltage. *Nicotine & Tobacco Research*. 2014;16(10):1319-26.
5. Meo SA, Al Asiri SA. Effects of electronic cigarette smoking on human health. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2014;18(21):3315-9.
6. Brownson EG, Thompson CM, Goldsberry S, Chong HJ, Friedrich JB, Pham TN, et al. Explosion Injuries from E-Cigarettes. *New England Journal of Medicine*. 2016;375(14):1400-2.
7. Vardavas CI, Anagnostopoulos N, Kougias M, Evangelopoulou V, Connolly GN, Behrakis PK. Short-term pulmonary effects of using an electronic cigarette: impact on respiratory flow resistance, impedance, and exhaled nitric oxide. *Chest*. 2012;141(6):1400-6.
8. Flouris AD, Chorti MS, Poulianiti KP, Jamurtas AZ, Kostikas K, Tzatzarakis MN, et al. Acute impact of active and passive electronic cigarette smoking on serum cotinine and lung function. *Inhal Toxicol*. 2013;25(2):91-101.

9. Ferrari M, Zanasi A, Nardi E, Morselli Labate AM, Ceriana P, Balestrino A, et al. Short-term effects of a nicotine-free e-cigarette compared to a traditional cigarette in smokers and non-smokers. *BMC Pulm Med.* 2015;15:120.
10. Manzoli L, Flacco ME, Fiore M, La Vecchia C, Marzuillo C, Gualano MR, et al. Electronic Cigarettes Efficacy and Safety at 12 Months: Cohort Study. *PLoS One.* 2015;10(6):e0129443.
11. Ferreira JMR, Figueiredo A, Boléo-Tomé JP, Cordeiro CR. Cigarro Eletrónico: Posição da Sociedade Portuguesa de Pneumologia. *Acta Med Port.* 2015;28(5):548-50.
12. Yan XS, D’Ruiz C. Effects of using electronic cigarettes on nicotine delivery and cardiovascular function in comparison with regular cigarettes. *Regulatory Toxicology and Pharmacology.* 2015;71(1):24-34.
13. Aug A, Altraja S, Kilk K, Porosk R, Soomets U, Altraja A. E-Cigarette Affects the Metabolome of Primary Normal Human Bronchial Epithelial Cells. *PLoS One.* 2015;10(11):e0142053.
14. Taylor M, Carr T, Oke O, Jaunky T, Breheny D, Lowe F, et al. E-cigarette aerosols induce lower oxidative stress in vitro when compared to tobacco smoke. *Toxicology Mechanisms and Methods.* 2016;26(6):465-76.
15. Calenic B, Miricescu D, Greabu M, Kuznetsov AV, Troppmair J, Ruzsanyi V, et al. Oxidative stress and volatile organic compounds: interplay in pulmonary, cardio-vascular, digestive tract systems and cancer. *Open Chemistry.* 2015;13(1).
16. 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. *Journal of Chromatography A.* 2015;1410:51-9.

17. Do R, Bartlett KH, Chu W, Dimich-Ward H, Kennedy SM. Within- and between-person variability of exhaled breath condensate pH and NH₄⁺ in never and current smokers. *Respir Med*. 2008;102(3):457-63.
18. Davis MD, Montpetit A, Hunt J. Exhaled Breath Condensate: An Overview. *Immunology and Allergy Clinics of North America*. 2012;32(3):363-75.
19. Ahmadzai H, Huang S, Hettiarachchi R, Lin JL, Thomas PS, Zhang Q. Exhaled breath condensate: a comprehensive update. *Clin Chem Lab Med*. 2013;51(7):1343-61.
20. Lin J-L, Bonnichsen MH, Thomas PS. Standardization of exhaled breath condensate: effects of different de-aeration protocols on pH and H₂O₂ concentrations. *Journal of breath research*. 2011;5(1):011001.
21. Poulianiti K, Karatzaferi C, Flouris AD, Fatouros IG, Koutedakis Y, Jamurtas AZ. Antioxidant responses following active and passive smoking of tobacco and electronic cigarettes. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 2016;26(6):446-52.
22. Inonu H, Doruk S, Sahin S, Erkorkmaz U, Celik D, Celikel S, et al. Oxidative stress levels in exhaled breath condensate associated with COPD and smoking. *Respiratory care*. 2012;57(3):413-9.
23. Bajaj P, Ishmael FT. Exhaled breath condensates as a source for biomarkers for characterization of inflammatory lung diseases. 2013.
24. Kostikas K, Papatheodorou G, Ganas K, Psathakis K, Panagou P, Loukides S. pH in expired breath condensate of patients with inflammatory airway diseases. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165(10):1364-70.
25. Hunt J. Exhaled breath condensate pH assays. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2007;27(4):597-606; vi.