

Relazione scientifica Progetto Compar-ER



COntaMinazione da composti Perfluoroalchilici in latte mAteRno in Emilia Romagna

Riassunto

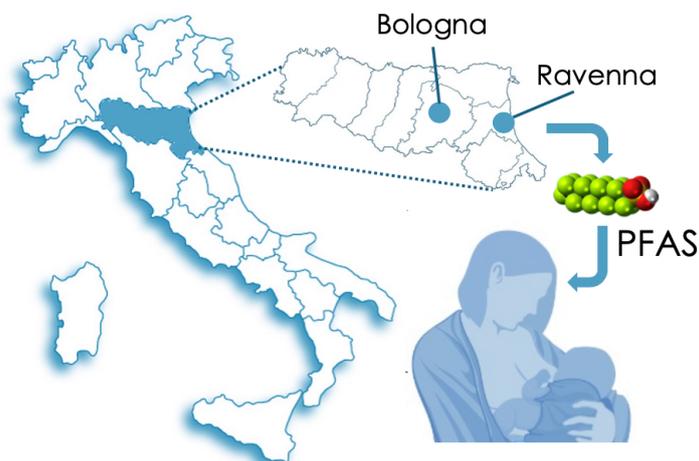
Le sostanze perfluoroalchiliche e polifluoroalchiliche (PFAS) sono contaminanti ambientali persistenti noti per la loro interferenza con i processi biologici e la loro associazione con diverse condizioni di salute, in particolare nelle popolazioni vulnerabili come i neonati.

Questo studio ha investigato le concentrazioni di 17 diversi PFAS nel latte materno raccolto da madri del nord Italia. I campioni sono stati ottenuti da madri di neonati sia a termine che prematuri, nonché da donatrici di latte. I livelli di PFAS sono stati misurati in 268 campioni di latte umano utilizzando la cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS).

I composti PFAS più persistenti, come PFOS e PFOA, sono stati rilevati in una significativa proporzione di campioni (76%), indicando un'esposizione diffusa. Tuttavia, questa indagine ha rivelato un declino dei livelli di PFAS rispetto a precedenti misurazioni nella Regione, suggerendo miglioramenti nella contaminazione ambientale.

In particolare, livelli più alti di PFOS sono stati trovati a Bologna rispetto a Ravenna, indicando differenze geografiche nell'esposizione ai PFAS. Non sono state osservate differenze significative nei livelli totali di PFAS tra le madri di neonati a termine e prematuri, né nel tempo nei campioni di latte pretermine.

Sebbene l'assunzione giornaliera stimata di PFAS attraverso il latte materno fosse nell'intervallo più basso di esposizione riportato dall'EFSA per i neonati, le implicazioni a lungo termine per la salute dell'esposizione ai PFAS nella prima infanzia rimangono una preoccupazione, soprattutto considerando la recente classificazione del PFOA come cancerogeno umano. Saranno necessari ulteriori studi per comprendere pienamente queste implicazioni e per valutare i potenziali rischi associati all'esposizione ai PFAS durante l'infanzia.



1. Introduzione

Le sostanze perfluoroalchiliche e polifluoroalchiliche (PFAS) sono un gruppo di sostanze chimiche sintetiche fluorurate utilizzate fin dagli anni '50. Sono ampiamente utilizzate in prodotti di uso quotidiano come tensioattivi, detersivi, tessuti, tappeti, schiume antincendio e persino imballaggi alimentari (Wang et al., 2016). I PFAS sono spesso definiti "sostanze chimiche eterne"; sono resistenti alla degradazione chimica e biologica, mostrando una significativa tendenza a bioaccumularsi nell'ambiente, nella fauna selvatica e negli esseri umani, il che è elemento di preoccupazione (Wang et al., 2016).

Gli studi suggeriscono potenziali effetti negativi sulla salute umana dall'esposizione ai PFAS, anche a basse concentrazioni (Deji et al., 2021). In particolare, i PFAS sono stati collegati a una disfunzione della tiroide (Deji et al., 2021). Inoltre, sono state investigate le associazioni tra l'esposizione ai PFAS e varie condizioni di salute, tra cui dislipidemia, iperglicemia, ipertensione gestazionale e problemi legati alla fertilità e alla funzione tiroidea (Deji et al., 2021).

Nel 2020, la valutazione del rischio dell'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) di quattro specifici PFAS (acido perfluorottanoico-PFOA, acido perfluorononanoico-PFNA, acido perfluoroesansolfonico-PFHxS e acido perfluorottanesolfonico-PFOS), scelte per la loro caratteristica di lunga emivita e comportamento simile nel corpo, ha identificato potenziali impatti sul sistema immunitario, fegato, sviluppo e sistemi ormonali, suggerendo persino una potenziale cancerogenicità (Hartmann et al., 2024; EFSA, 2020).

Per proteggere dai potenziali rischi per la salute, l'EFSA ha stabilito un'Assunzione Settimanale Tollerabile (DST) di 4,4 ng/kg di peso corporeo, considerando l'assunzione complessiva di PFOA, PFNA, PFHxS e PFOS, dando priorità alle preoccupazioni sull'impatto sul sistema immunitario (EFSA, 2020).

Successivamente, il Regolamento (UE) 2023/915 ha fissato i limiti massimi per questi quattro PFAS in vari prodotti alimentari, tra cui uova, pesce, carne e molluschi.

In precedenza, la Direttiva UE sulle acque potabili (2020/2184) aveva fissato due limiti per i PFAS: 0,5 µg/L per i PFAS totali e 0,1 µg/L per la somma di 20 specifici PFAS che destano particolare preoccupazione, ma questi limiti non hanno un collegamento diretto con il valore DST dell'EFSA.

È importante sottolineare che nel 2023, sulla base di prove ritenute sufficienti, l'Agenzia internazionale per la ricerca sul cancro (IARC) ha classificato il PFOA come cancerogeno per l'uomo (Gruppo 1) (Zahm et al., 2023). Questi sviluppi evidenziano l'importanza per la salute pubblica dell'esposizione ai PFAS, con i costi totali annuali legati alla salute nei paesi dell'Area Economica Europea stimati in 52-84 miliardi di euro (Goldenman et al., 2019).

L'esposizione umana ai PFAS può avvenire attraverso varie vie. Queste includono l'ingestione di cibo e acqua contaminati, il consumo di cibo confezionato con materiali contenenti queste sostanze chimiche, l'uso di prodotti per la casa come utensili da cucina antiaderenti e tessuti antimacchia e l'esposizione occupazionale nella produzione o nell'uso di PFAS.

In aggiunta, l'esposizione ai PFAS può iniziare già durante la gravidanza, data la loro capacità di attraversare la placenta (Wang et al., 2024; Lamichhane et al., 2023; LaKind et al., 2023; Mahfouz et al., 2023; McAdam and Bell, 2023; Macheke et al., 2022; Tansel, 2022; EFSA, 2020; Rovira et al., 2019; Tian et al., 2018; Manzano Salgado et al., 2016), e continuare attraverso le prime fasi della vita. I neonati possono essere esposti ai PFAS attraverso il latte materno, che può contenere livelli elevati a causa dell'esposizione materna prima e durante la gravidanza, sia attraverso la dieta che attraverso fattori ambientali (Hartmann et al., 2024; Wang et al.,

2024; Blomberg et al., 2023; Mahfouz et al., 2023; Timmermann et al., 2023; Lakind et al., 2022; Macheka et al., 2022; Aceti et al., 2021; Girardi et al., 2021; Lamichhane et al., 2021; Serrano et al., 2021; Zheng et al., 2021; EFSA 2020; Ledda et al., 2018; Lee et al., 2018; Brantsæter et al., 2013; Guerranti et al., 2013).

E' interessante notare che l'allattamento al seno può anche agire come una via di escrezione, potenzialmente riducendo le concentrazioni di PFAS materne e nel latte materno nel tempo (Serrano et al., 2021).

I feti e i neonati sono particolarmente vulnerabili all'esposizione ai PFAS, per via dello sviluppo ancora in corso (Wang et al., 2024). Inoltre, il fenomeno dell'esposizione precoce può portare a significative conseguenze sulla salute (ad es., influenzando la crescita e lo sviluppo) che possono manifestarsi più tardi nel corso della vita (Kim et al., 2023; Zhang et al., 2023). Pertanto, l'esposizione precoce ai PFAS costituisce un elemento di forte preoccupazione.

L'EFSA ha stimato che i livelli critici nel latte materno sono 60 ng/L per PFOA e PFNA, 73 ng/L per PFHxS e PFOS, e 133 ng/L per la somma dei 4 PFAS (EFSA, 2020). In generale, gli studi presenti in letteratura mostrano livelli rilevabili di PFAS nel latte materno in tutto il mondo, ma le concentrazioni possono subire ampie variazioni.

PFOS e PFOA sono i due PFAS più comunemente rilevati nel latte materno. Tuttavia, le tendenze rivelano un cambiamento preoccupante: i livelli di PFAS di "vecchia generazione" a catena lunga (probabilmente a causa delle restrizioni d'uso) stanno diminuendo, mentre i PFAS più nuovi a catena corta sono in aumento nel latte materno (Zheng et al., 2021). L'attuale ricerca ha dati limitati anche sulle strutture di PFAS di ancor più recente introduzione, comprese quelle con meno di 8 atomi di carbonio (LaKind et al., 2023, McAdam and Bell, 2023). I livelli di PFAS nel latte materno possono variare a seconda di diversi fattori, come la posizione geografica, la dieta, lo stile di vita, la dimensione del campione e i metodi analitici impiegati.

Inoltre, la nostra comprensione di come questi fattori contribuiscano alla variabilità rimane limitata, creando lacune di conoscenza che ostacolano lo sviluppo di interventi efficaci di sanità pubblica volti a ridurre al minimo l'esposizione sia per i neonati che per le madri. (Kim et al., 2023; Serrano et al., 2021; Antignac et al., 2018; Lee et al., 2018; Tian et al., 2018; Wang et al., 2016).

Questo aspetto critico dovrebbe essere affrontato, soprattutto perché la contaminazione da PFAS ha costituito una preoccupazione significativa nel Nord-Est Italia, in particolare nella regione del Veneto (OMS, 2017). Nel 2013, è stata identificata una diffusa contaminazione delle acque sotterranee, che ha colpito milioni di residenti. (Mastrantonio et al., 2018). Uno studio del 2006 che esaminava i livelli di PFAS nei principali fiumi europei ha documentato le più alte concentrazioni di PFOA nel fiume Po, che attraversa le regioni Lombardia, Veneto ed Emilia-Romagna (Mclachlan et al., 2007).

Successive analisi della fauna ittica del Po raccolte nel 2018 hanno rivelato il PFOS come il PFAS più prevalente, presente in tutti i campioni alle concentrazioni più elevate, insieme agli acidi perfluoroalchilcarbossilici a catena lunga (acido perfluorodecanoico-PFDA e acido perfluoroundecanoico-PFUnDA) (Giari et al., 2023). Inoltre, un'indagine nazionale sui livelli di PFAS nei campioni di capelli ha dimostrato la presenza di PFAS in una parte significativa della popolazione italiana, con Emilia-Romagna e Veneto che mostravano livelli di PFAS analoghi (Piva et al., 2021).

I dati sulla contaminazione ambientale in Emilia-Romagna sono piuttosto limitati, ma sono in corso attività per raccogliere maggiori informazioni al fine di garantire la conformità alle rigorose normative ambientali dell'UE. La Direttiva (UE) 2013/39 include il PFOS come sostanza pericolosa prioritaria, fissando uno standard di qualità ambientale (EQS) di 0,65 ng/L nelle acque superficiali e richiedendo agli Stati membri dell'UE di monitorare e segnalare i livelli di

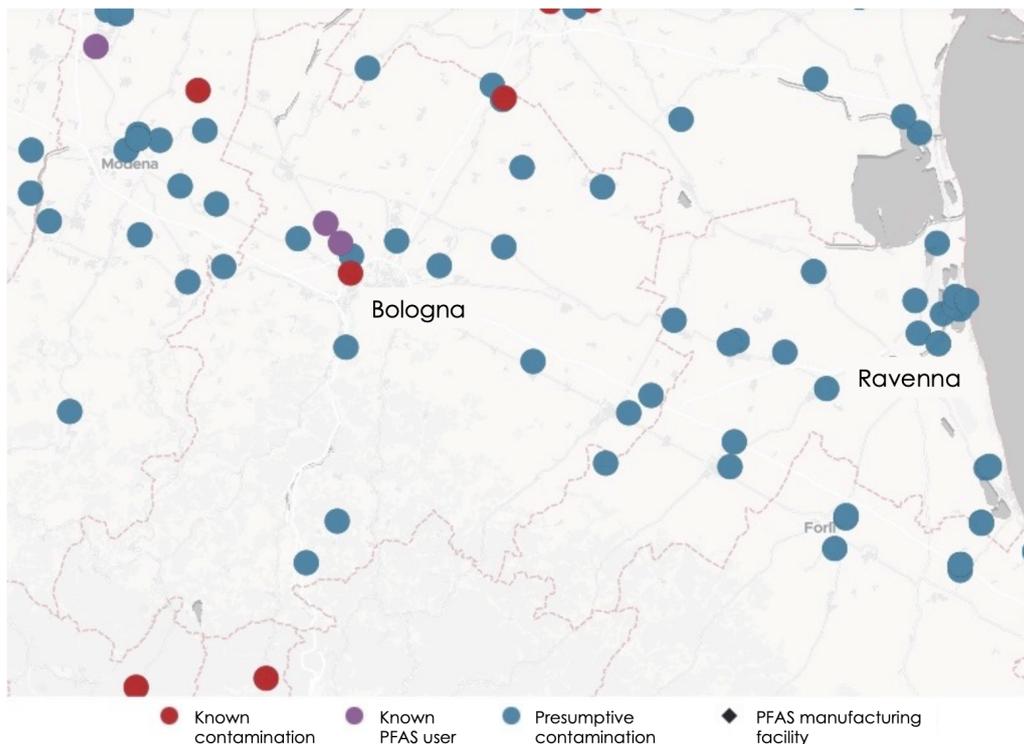
PFOS. Nel 2018, l'Agenzia Regionale per la Prevenzione, l'Ambiente e l'Energia dell'Emilia-Romagna (Arpae) ha condotto un monitoraggio che non ha mostrato una diffusa contaminazione da PFAS. Tuttavia, il rapporto del 2020 (Arpae, 2020) ha rivelato che i livelli di PFOS superavano l'EQS in 27 delle 161 stazioni, di cui 3 a Bologna e 7 a Ravenna.

Il monitoraggio delle acque sotterranee ha rivelato una diffusa contaminazione da PFAS, superando le soglie nazionali esistenti in molti luoghi dell'UE. Per affrontare questo problema, la Commissione Europea ha proposto una nuova soglia di sicurezza di 4,4 ng/L per la concentrazione totale di 24 PFAS nelle acque sotterranee (Commissione Europea, 2022).

Secondo i dati più recenti pubblicati dall'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA) sul portale WebGIS, per l'anno 2022 (ISPRA, 2022), sono stati misurati livelli quantificabili di PFOS in 9 campioni di acque sotterranee in Emilia-Romagna. Nello specifico, 3 campionamenti nella provincia di Bologna hanno mostrato valori compresi tra 0,4 e 3,2 ng/L, mentre 6 campionamenti nella provincia di Ravenna sono risultati compresi tra 0,4 e 2,4 ng/L. Inoltre, due misurazioni effettuate nello stesso punto di campionamento a Ravenna hanno rivelato concentrazioni di PFOA pari a 416,0 ng/L e 672,0 ng/L.

Infine, secondo quanto riportato da "The Forever Pollution Project" (<https://foreverpollution.eu>), un'inchiesta collaborativa di giornalisti di tutta Europa che ha evidenziato una diffusa contaminazione da PFAS, esistono un totale di 15 e 21 siti presumibilmente contaminati rispettivamente nelle province di Bologna e Ravenna (Figura 1). Questi siti includono aree industriali, impianti di gestione dei rifiuti, aeroporti, siti militari e aree di addestramento antincendio. Inoltre, a Bologna si trovano 2 siti con evidenza di utilizzo di PFAS e 2 località in cui sono stati rilevati PFAS.

Figura 1. Mappa dei siti con sospetta o evidente contaminazione da PFAS nelle province di Bologna e Ravenna (fonte: Forever Pollution Project)



Sulla base del parere scientifico dell'EFSA del 2020, che ha sottolineato la critica necessità di ricerca sulle specifiche fonti ambientali che contribuiscono alla contaminazione del latte materno, questo studio mira a quantificare e confrontare le concentrazioni di PFAS nel latte materno di tre gruppi distinti: madri di neonati a termine, madri di neonati prematuri e donatrici di latte materno. L'ipotesi centrale suggerisce che la concentrazione di queste sostanze varierà tra i gruppi, venendo influenzata sia dal momento della nascita (pretermine/a termine) che dal momento del prelievo del campione (immediatamente dopo la nascita o nei primi mesi *postpartum*).

Inoltre, un obiettivo secondario è quello di confrontare i livelli di PFAS nel latte materno raccolto a Bologna e Ravenna, due aree geografiche della regione Emilia-Romagna.

Lo studio ipotizza che l'origine geografica possa influenzare significativamente l'esposizione ai PFAS nelle donne in età fertile e durante la gravidanza, portando a concentrazioni variabili nel loro latte. Scoprendo questi schemi, la ricerca ha il potenziale di informare le politiche di sanità pubblica, in particolare le linee guida sull'allattamento al seno, con un focus speciale sulle comunità con elevata esposizione ai PFAS.

2. Materiali e metodi

2.1. Prodotti chimici e materiali

La miscela di standard analitici puri di PFAS (sigla EPA-537PDSL-R1) è stata acquistata da Wellington Laboratories (Guelph, Ontario, Canada), così come gli standard deuterati M2-PFOA, d3-N-MeFOSAA e M-PFOS (EPA-537IS). I singoli composti sono elencati in Tabella 1. Acetonitrile, metanolo, acido formico, idrossido di ammonio e solfato di zinco ($ZnSO_4$) per la preparazione e la purificazione dei campioni sono stati acquistati da Merck (Milano, Italia). Le cartucce SPE Oasis WAX (6 cc/150 mg) sono state acquistate da Waters (Milford, MA, USA). I filtri a siringa in nylon (0,22 μm) sono stati ottenuti da FAVS, Bologna, Italia. Acetato di ammonio, metanolo e acqua ultrapura per l'analisi LC-MS/MS sono stati acquistati da Sigma Aldrich (Milano, Italia).

2.2. Soluzioni di lavoro

La soluzione di PFAS (2 mg/L in metanolo, EPA-537PDSL-R1) è stata diluita in metanolo per preparare in serie le soluzioni di lavoro necessarie per i calibratori e i campioni di controllo qualità (QC). In particolare, le soluzioni di lavoro avevano concentrazioni di 2,0 e 20,0 $\mu g/L$. La soluzione di lavoro dello standard interno (IS) è stata preparata diluendo l'EPA-537IS 1.000 volte in metanolo. Tutte le soluzioni standard sono state conservate a $-20\text{ }^\circ C$.

2.3. Raccolta dei campioni

Lo studio è stato approvato dai Comitati Etici (CE-AVEC a Bologna e CEROM a Ravenna; ID studio 703/2022/Sper/AOUBo) dei due centri di reclutamento (Ospedale Sant'Orsola a Bologna e Ospedale Santa Maria delle Croci a Ravenna, Italia). Le madri che hanno fornito campioni di latte hanno firmato un consenso informato scritto.

I campioni (10 ml ciascuno) sono stati raccolti utilizzando un tiralatte in contenitori di polipropilene sterili, immediatamente congelati a $-20\text{ }^\circ C$ e quindi consegnati al laboratorio di analisi.

- Latte a termine: Campioni di latte da madri che avevano partorito a termine (≥ 37 settimane di età gestazionale), reclutate presso la Nursery o la Clinica Ambulatoriale Neonatologica dell'Ospedale Sant'Orsola (Bologna) e dell'Ospedale Santa Maria delle Croci (Ravenna) entro 1 settimana dal parto (preferibilmente entro 72 ore dal parto).
- Latte pretermine: Campioni di latte da madri di neonati pretermine con età gestazionale < 34 settimane, reclutate presso l'Unità di Terapia Intensiva Neonatale dell'Ospedale Sant'Orsola (Bologna) e dell'Ospedale Santa Maria delle Croci (Ravenna). In questo gruppo, un primo campione è stato raccolto entro 1 settimana dal parto, mentre un secondo campione è stato raccolto tra 30 e 45 giorni dopo il parto.
- Latte da donatrici: Campioni di latte raccolti dalle donatrici del Banco del Latte di Bologna, che di solito vengono reclutate come donatrici entro 3 mesi dopo aver partorito il proprio bambino.

Durante la fase di arruolamento sono state raccolte informazioni sull'età materna, il luogo di residenza (zona urbana o rurale), l'assunzione di farmaci durante la gravidanza, il tipo di alimentazione, la data del parto, il peso del neonato, l'età gestazionale alla nascita e il tempo trascorso tra il parto e il prelievo del latte materno.

Al momento dell'arruolamento allo studio è stato somministrato un questionario sull'alimentazione materna in gravidanza precedentemente validato. (Vioque et al., 2013)

Il questionario, composto da 123 item (Allegato 1), esplora diverse abitudini alimentari, come l'adesione a diete vegetariane, vegane, prive glutine o l'esclusione di alcuni alimenti per motivi

religiosi (carne di maiale e alcool). Esamina inoltre la frequenza di consumo di diversi specifici alimenti suddivisi in categorie (latticini, carne, pesce, crostacei, frutta, verdura), il tipo di acqua bevuta (in bottiglia o del rubinetto), il consumo di alcolici così come le modalità di cottura, oppure l'assunzione di cibi bruciati, fritti o di grasso animale. I dati raccolti dai questionari saranno correlati ai livelli di PFAS riscontrati nei campioni di latte materno e sono attualmente in fase di elaborazione.

2.4 Estrazione e purificazione

L'estrazione dei campioni è stata condotta secondo la metodologia messa a punto da Zheng et al. (2021), mentre il processo di purificazione si è basato sull'approccio descritto da Rawn et al. (2022), con le seguenti modifiche. Tre millilitri di campioni di latte scongelati sono stati trasferiti in provette di polipropilene da 15 ml e successivamente fortificati con 150 µL della soluzione di lavoro dello standard interno. A ciascuna provetta sono stati aggiunti 20 µL di metanolo, 68 µL di una soluzione di solfato di zinco ($ZnSO_4$) 2 M e 6 ml di acetonitrile. I campioni sono stati vortexati e sonicati per 15 minuti. Quindi i campioni sono stati centrifugati a 3000 giri/min per 5 minuti a 4 °C e i surnatanti sono stati trasferiti in nuove provette. Ogni campione è stato sottoposto a due ulteriori estrazioni combinando i surnatanti di tutte e tre le estrazioni. I surnatanti combinati sono stati concentrati a circa 3 ml in flusso di N_2 a 45 °C e quindi diluiti con 4 ml di 0,1% di acido formico in acqua.

Le soluzioni diluite sono state sottoposte a purificazione utilizzando cartucce SPE Oasis WAX (6 cc/150 mg), poste su un collettore. Le cartucce sono state preconizionate con 10 ml di ammoniaca allo 0,1% in metanolo, seguiti da 12 ml di acqua. Ogni cartuccia è stata quindi lavata sequenzialmente con i) 3 ml di acetato di ammonio 20 mM: metanolo (80:20, v/v) aggiustato a pH 4 con acido formico; ii) 6 ml di metanolo: acqua (50:50, v/v); iii) 2 ml di metanolo. Dopo un passaggio sottovuoto di 1 minuto, gli eluenti di lavaggio sono stati scartati. Gli analiti sono stati eluiti utilizzando 6 ml di ammoniaca al 2% in metanolo. I campioni eluiti sono stati evaporati a quasi secchezza sotto N_2 a 45 °C e quindi ricostituiti in 400 µL di metanolo: acqua (50:50, v/v). Prima dell'analisi, ogni soluzione è stata filtrata utilizzando un filtro a siringa da 13 mm (0,22 µm) e trasferita in vial di polipropilene. Infine, 7,5 µL di campioni sono stati iniettati nel sistema analitico.

2.5 Analisi LC-MS/MS

L'analisi è stata eseguita utilizzando una pompa binaria Waters Acquity UPLC® (Waters Corporation, Milford, MA, USA) equipaggiata con un kit isolatore PFC per prevenire la contaminazione di fondo. La separazione cromatografica è stata ottenuta utilizzando una colonna Waters Acquity UPLC® BEH Shield C18 (50 × 2,1 mm, 1,7 µm), dotata di una pre-colonna di guardia Waters VanGuard contenente lo stesso materiale di riempimento (Waters Corporation, Milford, MA, USA), entrambe mantenute a 35 °C. La fase mobile consisteva in una soluzione acquosa di acetato di ammonio 5 mM (solvente A) e metanolo (solvente B). L'eluizione, con flusso costante di 0,3 mL/min, seguiva un gradiente lineare dal 50% A e 50% B al 10% A e 90% B in 8 minuti. Questa composizione è stata mantenuta per 2,0 minuti, seguita da un gradiente di 0,5 minuti di ritorno alle condizioni iniziali e mantenuta per altri 1,5 minuti. La colonna è stata quindi equilibrata alle condizioni iniziali per ulteriori 1,5 minuti prima della successiva iniezione.

Il cromatografo era accoppiato con uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo micro Waters Xevo® TQ-S (Waters Corporation, Milford, MA, USA) operante in modalità ionizzazione elettrospray negativa (ESI-) con una tensione capillare di 0,50 kV. Le analisi sono state eseguite in modalità di monitoraggio della reazione multipla (MRM), selezionando due transizioni per

ciascun analita target e una per gli standard interni. Le transizioni monitorate, insieme al corrispondente voltaggio del cono e all'energia di collisione, sono dettagliate nella Tabella 1. L'acquisizione e l'elaborazione dei dati sono state eseguite utilizzando il software MassLynx 4.2 (Waters Corporation, Milford, MA, USA).

2.6 Gestione del progetto

Il progetto è stato gestito secondo il Sistema di Gestione della Qualità ISO 9001 certificato del DIMEVET che attraverso specifiche procedure e registrazioni, inclusa la redazione di un piano di progetto, ha garantito la verifica della conformità delle attività e dei risultati agli obiettivi prefissati.

Tabella 1. Parametri di rilevamento MS/MS (le transizioni in grassetto sono quelle utilizzate per la quantificazione).

Analyte		MRM-transition	Cone Voltage (V)	Collision energy (eV)
Potassium-perfluoro-1-butanefluorobutanesulfonic acid	L-PFBS	299.00 > 79.85 299.00 > 98.85	28	30 25
Perfluoro-n-hexanoic acid	PFHxA	313.00 > 269.00 313.00 > 118.94	20	7 20
Ammonium-perfluoro (2-methyl-3-oxahexanoate)	HFPO-DA- GenX	285.00 > 169.00 285.00 > 118.91 285.00 > 203.00	12	7 28 9
Perfluoro-n-heptanoic acid	PFHpA	363.00 > 319.00 363.00 > 169.00	15	8 16
Sodium dodecafluoro-3H-4,8- dioxanonanoate	NaDONA	377.00 > 250.96 377.00 > 84.93	22	10 28
Sodium-perfluoro-1-hexane sulfonate	L-PFHxS	399.0 > 79.91 399.0 > 98.91	16	36 32
Perfluoro-n-octanoic acid	PFOA	413.00 > 369.00 413.00 > 169.00	20	9 18
Perfluorononanoic acid	PFNA	463.00 > 419.00 463.00 > 219.00	20	9 15
Perfluorooctane sulfonic acid	L-PFOS	499.00 > 98.91 499.00 > 80.00	30	35 45
Perfluoro-n-decanoic acid	PFDA	513.00 > 469.00 513.00 > 219.00	20	10 18
N-Methylperfluorooctanesulfonamidoacetic acid	N-MeFOSAA	570.00 > 419.00	30	18
2-(N-Ethylperfluorooctanesulfonamido)acetic acid	N-EtFOSAA	584.00 > 419.00	28	18
Perfluoroundecanoic acid	PFUdA	563.00 > 519.00 563.00 > 269.00	20	10 18
11-chloroeicosafuoro-3-oxaundecane-1-sulfonic acid	11Cl-PF3OUdS	631.10 > 451.00 631.10 > 82.52	35	26 32
Perfluorododecanoic acid	PFDoA	613.16 > 569.00 613.16 > 169.00	28	10 26
Perfluorotridecanoic acid	PFTTrDA	663.00 > 619.00 663.00 > 169.00	25	11 28
Perfluorotetradecanoic acid	PFTeDA	713.20 > 699.00 713.20 > 369.00	30	12 20
Perfluoro-n-[1,2- ¹³ C ₂]octanoic acid	M2PFOA	415.00 > 370.00	20	9
Sodium perfluoro-1-[1,2,3,4- ¹³ C ₄]octanesulfonate	MPFOS	503.00 > 80.00	30	45
N-methyl-d3-perfluoro-1-octanesulfonamidoacetic acid	d3- N-MeFOSAA	573.00 > 419.00	25	20

2.7 Valutazione delle prestazioni del metodo

I parametri analitici sono stati verificati per garantire la conformità al documento EURL POPs "Guidance Document on Analytical Parameters for the Determination of Per- and Polyfluoroalkyl Substances (PFAS) in Food and Feed" (EURL POPs, 2022)

Le curve di calibrazione in matrice, inclusi un campione zero e le soluzioni a sei livelli di concentrazione (10, 20, 50, 100, 200 e 500 ng/L), sono state preparate giornalmente seguendo la procedura riportata nella sezione 2.3., aggiungendo 150 µL di soluzione di lavoro dello standard interno. Sono stati correlati i rapporti tra l'area del picco dei PFAS e gli standard interni in funzione delle loro concentrazioni.

Per valutare l'accuratezza e la precisione intra- e inter-giorno del metodo, sono stati preparati campioni di controllo qualità (QC) a tre diverse concentrazioni (10, 50 e 200 ng/L) in triplicato insieme alla curva di calibrazione e ai campioni reali per ciascuna sessione analitica.

Il criterio di accettazione per la linearità è stato stabilito come una deviazione della concentrazione retro calcolata dalla concentrazione vera $\leq 20\%$. Secondo le linee guida EURL POPs, ai fini del monitoraggio, la valutazione dell'esattezza richiede che la media del recupero apparente a ciascun livello di fortificazione, espressa come "bias", non deve superare $\pm 35\%$. Inoltre, la riproducibilità intra-laboratorio (precisione intermedia) deve essere $\leq 25\%$.

Per determinare il limite di quantificazione (LOQ) è stato utilizzato l'approccio del livello più basso validato.

Per l'analisi LC-MS/MS, per valutare l'identificazione dei picchi, il rapporto tra il tempo di ritenzione cromatografico (RT) dell'analita e quello dell'IS deve corrispondere a quello dello standard di calibrazione con una deviazione massima dell'1%. Per gli estratti dei campioni, il rapporto ionico dei due ioni prodotto deve rientrare in un intervallo di $\pm 30\%$ del rapporto ionico medio osservato negli standard di calibrazione della stessa sequenza analitica.

2.8 Analisi statistiche

Tutte le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando IBM SPSS Statistics for Windows, Versione 28.0. Armonk, NY: IBM Corp. La distribuzione dei dati è stata esaminata attraverso il test di Kolmogorov-Smirnov. Poiché la maggior parte delle variabili non seguiva una distribuzione normale, sono state applicate analisi non parametriche.

Le concentrazioni di PFAS sono state confrontate con i dati precedentemente raccolti utilizzando il test di Mann Whitney, che è stato anche applicato per esaminare le differenze nella concentrazione sia dei singoli PFAS che del totale PFAS in base al luogo di campionamento (Bologna vs. Ravenna). Le differenze tra i gruppi di campioni (latte a termine, pretermine e donatrici) sono state valutate attraverso i test di Kruskal Wallis con il test post-hoc di Bonferroni per i confronti a coppie. I cambiamenti nel tempo della concentrazione sia dei singoli PFAS che del totale PFAS all'interno della popolazione pretermine sono stati testati utilizzando il test di Wilcoxon Signed Rank.

È stato considerato statisticamente significativo un valore di $p < 0,05$.

3. Risultati e discussione

3.1. Raccolta dei campioni

Sono state arruolate complessivamente 234 madri tra aprile 2023 e maggio 2024 (156 madri di Bologna e 78 di Ravenna), per un totale di 268 campioni di latte (180 campioni di Bologna e 88 di Ravenna). I campioni sono stati suddivisi nelle categorie sopra menzionate come segue: 173 campioni di latte a termine (102 di Bologna e 71 di Ravenna), 73 campioni di latte pretermine (56 di Bologna e 17 di Ravenna) e 22 campioni di latte da donatrici.

3.2. Preparazione ed analisi dei campioni

Dopo aver testato due diversi volumi di campione (2 e 3 mL) e i metodi di estrazione e clean-up proposti da Zheng et al. (2021) e Rawn et al. (2022), i migliori risultati in termini di cromatografia e recupero degli analiti sono stati ottenuti utilizzando una procedura di estrazione modificata basata su Zheng et al. (2021). La modifica ha comportato la riduzione del tempo di sonicazione a 15 minuti tra i tre passaggi di precipitazione delle proteine con acetonitrile e l'aggiunta di una soluzione acquosa di 2 M ZnSO₄. Per il processo di clean-up (purificazione), è stato seguito il protocollo SPE Oasis raccomandato da Rawn et al. (2022).

Per identificare le condizioni cromatografiche ottimali, sono state testate due colonne C18 (BEH Acquity e BEH Shield, entrambe 50 × 2,1 mm, 1,7 μm) a varie temperature, con diverse combinazioni di fasi mobili e flussi. La migliore separazione cromatografica per tutti gli analiti target è stata ottenuta utilizzando la colonna BEH Shield C18 (50 × 2,1 mm, 1,7 μm), mantenuta a 35 °C. Le fasi mobili consistevano in una soluzione acquosa di acetato di ammonio 5 mM (A) e metanolo (B), con una portata di 0,3 ml/min in condizioni programmate per un tempo di esecuzione totale di 8 minuti.

3.3. Performance del metodo

Il metodo ha costantemente dimostrato linearità, accuratezza, precisione e assenza di *carry-over* soddisfacenti in ogni giornata di analisi. La specificità è stata confermata dall'assenza di picchi interferenti ai tempi di ritenzione degli analiti target dopo l'iniezione di campioni bianchi e solventi puri.

La deviazione della concentrazione retro calcolata è sempre stata ≤15%, dimostrando la linearità del metodo nell'intero intervallo di concentrazione validato.

Per tutti i livelli di QC, sia in condizioni intra-giorno che inter-giorno, l'esattezza e la precisione sono sempre state rispettivamente entro ± 20% e ≤ 17%. Il limite di quantificazione (LOQ) era di 10 ng/L per tutti i composti.

3.4 Risultati del monitoraggio

La Tabella 2 presenta una panoramica del numero e della corrispondente percentuale di campioni che hanno mostrato livelli quantificabili di PFAS, divisi per gruppo. Sono inoltre indicati gli intervalli di contaminazione totale e l'intervallo della somma dei 4 PFAS (PFOS, PFOA, PFHxS e PFNA) per i quali l'EFSA (EFSA, 2020) ha stabilito un'Assunzione Settimanale Tollerabile (TWI).

Tabella 2. Panoramica dei PFAS quantificabili nei campioni di latte materno e degli intervalli di contaminazione totale

	Termine		Pretermine		Donatrici
	Bologna	Ravenna	Bologna	Ravenna	Bologna
Campioni totali	102	71	56	17	22
Campioni quantificabili (%)	84 (82%)	51 (72%)	40 (71%)	13 (76%)	17 (77%)
Σ 17 PFAS (ng/L)	10,0-136,0	10,1-141,6	11,3-574,9	10,9-269,8	10,2-86,7
Σ 4 PFAS* (ng/L)	10,0-136,0	10,1-141,6	11,3-550,4	10,9-269,8	10,2-76,6

* Somma di PFOS, PFOA, PFHxS e PFNA

La maggior parte dei campioni sia di Bologna che di Ravenna ha mostrato livelli quantificabili di PFAS, indicando una contaminazione diffusa. La percentuale di campioni con PFAS quantificabili è stata costantemente alta in tutti i tipi di campioni (termine, pretermine e donatrici) in entrambe le aree.

L'analisi della contaminazione complessiva ha rivelato che i quattro PFAS con TWI EFSA stabilita (PFOS, PFOA, PFHxS e PFNA) costituiscono la maggior parte dei contaminanti rilevati. Tredici dei 17 PFAS studiati erano quantificabili. La Tabella 3 mostra in dettaglio i PFAS misurati nelle varie categorie di campioni, riportando il numero e le percentuali di dati quantificabili (> LOQ) e gli intervalli di contaminazione.

Tabella 3. Presenza e intervallo di concentrazione dei singoli PFAS quantificati nei campioni di latte materno

PFAS	Termine				Pretermine				Donatrici	
	<i>Bologna</i>		<i>Ravenna</i>		<i>Bologna</i>		<i>Ravenna</i>		<i>Bologna</i>	
	Campioni quantificabili (%)	Range (ng/L)								
PFHxA	1 (1,0%)	11,5	nq	/	nq	/	nq	/	nq	/
HFPO-DA	3 (2,9%)	12,6-34,9	nq	/	1 (1,8%)	15,5	nq	/	nq	/
PFBS	nq	/	nq	/	1 (1,8%)	10,4	nq	/	nq	/
PFHxS	1 (1,0%)	13,8	3 (4,2%)	11,0-14,9	6 (10,7%)	11,9-109,7	3 (17,6%)	11,2-23,6	nq	/
PFOA	73 (71,6%)	10,0-67,4	49 (69,0%)	10,1-89,9	24 (42,9%)	11,5-252,4	13 (76,5%)	10,9-109,7	15 (68,2%)	10,2-33,4
PFNA	5 (4,9%)	10,5-17,8	1 (1,4%)	10,0	6 (10,7%)	10,7-42,7	1 (5,9%)	17,1	1 (4,5%)	10,7
PFOS	52 (51,0%)	10,1-56,9	26 (36,6%)	10,6-40,7	33 (58,9%)	11,3-267,8	7 (41,2%)	14,0-121,5	14 (63,6%)	10,7-47,7
PFDA	nq	/	nq	/	2 (3,6%)	11,5-12,5	nq	/	nq	/
PFUdA	nq	/	nq	/	3 (5,4%)	12,0-32,5	nq	/	nq	/
11Cl-PF3OUdS	1 (1,0%)	19,2	nq	/	nq	/	nq	/	nq	/
PFDoA	2 (2,0%)	20,2-23,8	nq	/	nq	/	1 (5,9%)	10,4	1 (4,5%)	21,3
PFTTrDA	8 (7,8%)	12,3-46,6	1 (1,4%)	12,9	nq	/	1 (5,9%)	19,9	2 (9,1%)	11,8-12,3
PFTeDA	1 (1,0%)	55,7	nq	/	1 (1,8%)	19,0	nq	/	nq	/

nq: non quantificati (<LOQ)

3.5 Analisi dei dati

La concentrazione totale mediana di PFAS era di 22,3 ng/L (intervallo interquartile [IQR] 33,7 ng/dl). La concentrazione dei quattro principali PFAS (PFOS, PFOA, PFHxS e PFNA) nell'intera popolazione è riportata nella Tabella 4. Tutti gli altri PFAS (PFHxA, HFPO-DA, PFHpA, NaDONA, PFBS, PFDA, N-Me-FOSAA, N-EtFOSAA, PFUdA, 11Cl-PF3OUdS, PFDaA, PFTrDA, PFTeDA) avevano sia mediana che IQR pari a zero.

Tabella 4. Concentrazione dei quattro principali PFAS nell'intera popolazione, espressa in ng/L come mediana e intervallo interquartile (IQR).

PFAS	Mediana	IQR
PFOS	0	18,3
PFOA	12,9	23,8
PFHxS	0	0
PFNA	0	0
Σ PFHxS, PFOA, PFNA, PFOS	20,2	42,3

Le concentrazioni di PFAS sono state confrontate con dati precedentemente raccolti: le concentrazioni di PFOS, PFOA, PFHxS e PFNA nel latte materno erano significativamente inferiori rispetto a quelle rilevate in uno studio precedente condotto otto anni prima nella stessa regione geografica (Tabella 5, Aceti et al., 2021).

Tabella 5. Concentrazione dei quattro principali PFAS nell'intera popolazione, espressa in ng/L come mediana (intervallo interquartile [IQR]), in base all'anno di campionamento. Le differenze significative tra i gruppi ($p < 0,005$) sono in grassetto.

PFAS	Anno		p value Overall
	2016	2024	
PFOS	40,0 (50,0)	0 (18,3)	<0,001
PFOA	86,0 (39,0)	12,9 (23,8)	0,000
PFHxS	0 (0)	0 (0)	0,596
PFNA	0 (14)	0 (0)	<0,001
Σ PFHxS, PFOA, PFNA, PFOS	130 (102)	20,2 (42,3)	0,000

Quando sono state valutate le differenze legate al luogo di campionamento, si è riscontrato che la concentrazione di PFOS era significativamente più alta nei campioni di Bologna rispetto a quelli di Ravenna (mediana [IQR] 11,4 [20,38] vs. 0,0 [14,8] ng/L, $p=0,008$). Non è stata documentata alcuna differenza significativa in base al luogo di campionamento per gli altri singoli PFAS né per la quantità totale di PFAS.

Le concentrazioni di PFAS sono state quindi confrontate tra i gruppi (termine, pretermine e donatrici): le concentrazioni di PFOS, PFHxS e PFUdA erano significativamente diverse tra i gruppi ($p=0,027$, $0,002$ e $0,018$, rispettivamente).

Nel confronto a coppie, non è stata documentata alcuna differenza significativa tra i singoli gruppi nella concentrazione di PFOS, nonostante valori più elevati rilevati sia nei campioni pretermine che in quelli di donatrice (mediana [IQR] termine 0,0 [17,1], pretermine 12,6 [24,6], donatore 15,4 [27,2] ng/L, $p>0,05$ per tutti i confronti a coppie).

La concentrazione di PFHxS era più alta nei campioni di latte pretermine rispetto a quelli a termine: essendo le mediane uguali a zero in tutti i gruppi, vengono riportati i valori di media e

deviazione standard (DS): termine 0,3 (2,0), pretermine 4,1 (15,4), donatore HM 0,0 (0,0) ng/L (termine vs. pretermine $p=0,002$, termine vs. donatore 1,000, pretermine vs. donatore 0,053). Analogamente, la concentrazione di PFUdA era più alta nei campioni di latte pretermine rispetto a quelli a termine: essendo le mediane uguali a zero in tutti i gruppi, vengono riportati i valori di media e DS: termine 0,0 (0,0), pretermine 0,9 (4,6), donatore HM 0,0 (0,0) ng/L (termine vs. pretermine $p=0,016$, termine vs. donatore 1,000, pretermine vs. donatore 0,327).

Quando i campioni di latte pretermine sono stati valutati nel tempo, non è stata documentata alcuna differenza significativa nella concentrazione totale di PFAS (mediana [IQR] 22,0 [44,1] ng/L nel primo campione vs. 22,9 [46,3] ng/L nel secondo campione, $p=0,360$) né nella concentrazione di alcun singolo PFAS ($p>0,05$ per tutti i confronti).

Per valutare la potenziale esposizione dei neonati ai PFAS attraverso l'allattamento al seno, la concentrazione totale di PFAS in ciascun campione è stata moltiplicata per l'assunzione raccomandata di latte all'alimentazione enterale completa (160 mL/kg/die), ottenendo un'assunzione giornaliera stimata di PFAS (EDI - ng/kg/die). L'EDI è stato confrontato con i valori mediani e i percentili 95 dei range di esposizione dietetica al limite inferiore per il gruppo di età infantile (< 12 mesi) riportati nel parere scientifico dell'EFSA (EFSA, 2020).

La mediana [IQR] dell'EDI calcolato per i PFAS totali nella popolazione generale è stata di 3,6 [5,4] ng/kg/die, che rientra nell'intervallo di esposizione al limite inferiore (2,4-12,2 ng/kg/die) ed è inferiore ai percentili 95 dei range di esposizione dietetica (4,5-27,9 ng/kg/die) riportati dall'EFSA per i lattanti (EFSA, 2020). La mediana [IQR] dell'EDI è stata di 3 [5,7] ng/kg/die per i lattanti a termine, di 2,9 [7,4] per i lattanti pretermine alimentati con il latte materno e di 4,6 [6,1] per i lattanti pretermine alimentati con latte di donatrice ($p=0,894$). La mediana [IQR] dell'EDI per i campioni raccolti a Bologna è stata di 4,0 [5,6] vs. 2,8 [6,8] ng/kg/die per i campioni raccolti a Ravenna ($p=0,234$).

4. Conclusioni

Questo studio ha indagato la presenza e i potenziali rischi dei PFAS nel latte materno di madri residenti in due aree urbane dell'Emilia-Romagna. Lo studio ha rivelato in particolare una significativa riduzione dei livelli di PFAS rispetto a precedenti misurazioni nella stessa regione, suggerendo un declino della contaminazione ambientale. Tuttavia, sono presenti variazioni geografiche, con livelli più alti di PFOS osservati a Bologna rispetto a Ravenna. Inoltre, sebbene non siano state riscontrate differenze significative nei livelli totali di PFAS tra le madri di neonati a termine e pretermine, o nel tempo nei campioni di latte pretermine, questi risultati richiedono ulteriori approfondimenti per comprendere i potenziali fattori che influenzano l'esposizione ai PFAS per i neonati alimentati con latte materno.

Sebbene l'assunzione giornaliera stimata di PFAS attraverso il latte materno sia risultata più bassa del limite inferiore dell'intervallo di esposizione riportato dall'EFSA per i lattanti, gli effetti sulla salute a lungo termine dell'esposizione precoce rimangono una preoccupazione critica, soprattutto dopo la recente classificazione del PFOA come cancerogeno umano. Ulteriori ricerche sono essenziali per chiarire questi potenziali rischi e sviluppare strategie efficaci per ridurre l'esposizione dei neonati a queste sostanze chimiche dannose.

Bibliografia

Aceti, A., Barbarossa, A., Gazzotti, T., Zironi, E., Pagliuca, G., Vitali, F., and Corvaglia, L., 2021. Exposure to perfluoroalkyl substances through human milk in preterm infants. *Eur. J. Pediatr.* 180, 3047-3051. <https://doi.org/10.1007/s00431-021-04073-4>

Antignac, J. P., Veyrand, B., Kadar, H., Marchand, P., Oleko, A., Le Bizec, B., and Vandentorren, S., 2013. Occurrence of perfluorinated alkylated substances in breast milk of French women and relation with socio-demographical and clinical parameters: results of the ELFE pilot study. *Chemosphere*, 91(6), 802-808. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.088>

Arpae (Agency for Prevention, Environment, and Energy of Emilia-Romagna), 2020. Report sulla qualità delle acque superficiali fluviali della regione Emilia-Romagna. https://www.arpae.it/it/temi-ambientali/acqua/report-bollettini/acque-superficiali/report_acque-superficiali-fluviali-2020 (accessed on 10/08/2024)

Blomberg, A. J., Norén, E., Haug, L. S., Lindh, C., Sabaredzovic, A., Pineda, D., and Nielsen, C. (2023). Estimated transfer of perfluoroalkyl substances (PFAS) from maternal serum to breast milk in women highly exposed from contaminated drinking water: a study in the Ronneby mother-child cohort. *EHP*, 131(1), 017005. <https://doi.org/10.1289/EHP11292>

Brantsæter, A. L., Whitworth, K. W., Ydersbond, T. A., Haug, L. S., Haugen, M., Knutsen, H. K., and Longnecker, M. P., 2013. Determinants of plasma concentrations of perfluoroalkyl substances in pregnant Norwegian women. *Environ. Int.* 54, 74-84. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2012.12.014>

Deji, Z., Liu, P., Wang, X., Zhang, X., Luo, Y., and Huang, Z., 2021. Association between maternal exposure to perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances and risks of adverse pregnancy outcomes: A systematic review and meta-analysis *Sci. Total Environ.* 783, 146984. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146984>

Directive (EU) 2020/2184 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2020 on the quality of water intended for human consumption

EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (EFSA CONTAM Panel), Schrenk, D., Bignami, M., Bodin, L., Chipman, J. K., del Mazo, J., and Schwerdtle, T., 2020. Risk to human health related to the presence of perfluoroalkyl substances in food. *EFSA journal*, 18(9), e06223. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6223>

EURL for halogenated POPs in feed and food, 2022. Guidance Document on Analytical Parameters for the Determination of Per- and Polyfluoroalkyl Substances (PFAS) in Food and Feed, version 1.2 of 11 May 2022. Available online under https://eurl-pops.eu/working-groups#_pfas. (Accessed on 10/17/24)

European Commission, 2022. Directive of the European Parliament and of the council amending Directive 2000/60/EC establishing a framework for Community action in the field of water policy, Directive 2006/118/EC on the protection of groundwater against pollution and deterioration and Directive 2008/105/EC on environmental quality standards in the field of

water policy. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A52022PC0540> (accessed on 10/08/2024).

Giari, L., Guerranti, C., Perra, G., Cincinelli, A., Gavioli, A., Lanzoni, M., and Castaldelli, G., 2023. PFAS levels in fish species in the Po River (Italy): New generation PFAS, fish ecological traits and parasitism in the foreground. *Sci. Total Environ.* 876, 162828. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162828>

Girardi, P., Lupo, A., Mastromatteo, L. Y., and Scrimin, S., 2022. Mothers living with contamination of perfluoroalkyl substances: an assessment of the perceived health risk and self-reported diseases. *ESPR*, 29(40), 60491-60507. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-20085-5>

Goldenman, G., Fernandes, M., Holland, M., Tugran, T., Nordin, A., Schoumacher C., and McNeill A., 2019. The cost of inaction, a socioeconomic analysis of environmental and health impacts linked to exposure to PFAS . *TemaNord* 2019:516. <http://dx.doi.org/10.6027/TN2019-516>

Guerranti, C., Perra, G., Corsolini, S., and Focardi, S. E., 2013. Pilot study on levels of perfluorooctane sulfonic acid (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) in selected foodstuffs and human milk from Italy. *Food Chem.* 140(1-2), 197-203. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.12.066>

Hartmann, C., Kaiser, A. M., Moche, W., Weiss, S., Rafflesberg, W., Scharf, S., and Uhl, M., 2024. Persistent Organic Pollutants in Austrian Human Breast Milk Collected between 2013 and 2016. *J. Xenobiot.* 14(1), 247-266. <https://doi.org/10.3390/jox14010015>

ISPRA, 2022. Sistema Informativo Nazionale per la Tutela delle Acque Italiane https://www.sintai.isprambiente.it/public/GIS/map_page.xhtml (accessed on 10/08/2024)

Kim, J. H., Moon, N., Lee, J. W., Mehdi, Q., Yun, M. H., and Moon, H. B., 2023. Time-course trend and influencing factors for per-and polyfluoroalkyl substances in the breast milk of Korean mothers. *Chemosphere*, 310, 136688. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136688>

LaKind, J. S., Verner, M. A., Rogers, R. D., Goeden, H., Naiman, D. Q., Marchitti, S. A., and Fenton, S. E., 2022. Current breast milk PFAS levels in the United States and Canada: after all this time, why don't we know more?. *EHP*, 130(2), 025002. <https://doi.org/10.1289/EHP10359>

Lamichhane, S., Härkönen, T., Vatanen, T., Hyötyläinen, T., Knip, M., and Orešič, M., 2023. Impact of exposure to per-and polyfluoroalkyl substances on fecal microbiota composition in mother-infant dyads. *Environ. Int.* 176, 107965. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2023.107965>

Lamichhane, S., Siljander, H., Duberg, D., Honkanen, J., Virtanen, S. M., Orešič, M., and Hyötyläinen, T., 2021. Exposure to per-and polyfluoroalkyl substances associates with an altered lipid composition of breast milk. *Environ. Int.* 157, 106855. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106855>

Ledda, C., La Torre, G., Cinà, D., Paravizzini, G., Vitale, E., Pavone, P., and Rapisarda, V., 2018. Serum concentrations of perfluorinated compounds among children living in Sicily (Italy). *Toxicol. Lett.* 298, 186-193. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.09.001>

Lee, S., Kim, S., Park, J., Kim, H. J., Choi, G., Choi, S., and Moon, H. B., 2018. Perfluoroalkyl substances (PFASs) in breast milk from Korea: time-course trends, influencing factors, and infant exposure. *Sci. Total Environ.* 612, 286-292. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.094>

Macheka, L. R., Abafe, O. A., Mugivhisa, L. L., and Olowoyo, J. O., 2022. Occurrence and infant exposure assessment of per and polyfluoroalkyl substances in breast milk from South Africa. *Chemosphere*, 288, 132601. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132601> Get rights and content

Mahfouz, M., Harmouche-Karaki, M., Matta, J., Mahfouz, Y., Salameh, P., Younes, H., and Narbonne, J. F., 2023. Maternal serum, cord and human milk levels of per-and polyfluoroalkyl substances (PFAS), association with predictors and effect on newborn anthropometry. *Toxics*, 11(5), 455. <https://doi.org/10.3390/toxics11050455>

Manzano-Salgado, C. B., Casas, M., Lopez-Espinosa, M. J., Ballester, F., Martinez, D., Ibarluzea, J., and Vrijheid, M., 2016. Variability of perfluoroalkyl substance concentrations in pregnant women by socio-demographic and dietary factors in a Spanish birth cohort. *Environ. Int.* 92, 357-365. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.04.004>

Mastrantonio, M., Bai, E., Uccelli, R., Cordiano, V., Screpanti, A., and Crosignani, P., 2018. Drinking water contamination from perfluoroalkyl substances (PFAS): an ecological mortality study in the Veneto Region, Italy. *Eur. J. Public Health*, 28(1), 180-185. <https://doi.org/10.1093/eurpub/ckx066>

McAdam, J., and Bell, E. M., 2023. Determinants of maternal and neonatal PFAS concentrations: a review. *Environ. Health*. 22(1), 41. <https://doi.org/10.1186/s12940-023-00992-x>

McLachlan, M. S., Holmström, K. E., Reth, M., and Berger, U., 2007. Riverine discharge of perfluorinated carboxylates from the European continent. *ES&T*, 41(21), 7260-7265. <https://doi.org/10.1021/es071471p>

Piva, E., Giorgetti, A., Ioime, P., Morini, L., Freni, F., Faro, F. L., and Pascali, J. P., 2021. Hair determination of per-and polyfluoroalkyl substances (PFAS) in the Italian population. *Toxicology*, 458, 152849. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2021.152849>

Rawn, D. F., Dufresne, G., Clément, G., Fraser, W. D., and Arbuckle, T. E., 2022. Perfluorinated alkyl substances in Canadian human milk as part of the Maternal-Infant Research on Environmental Chemicals (MIREC) study. *Sci. Total Environ.* 831, 154888. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154888>

Regulation (EU) 2023/915 of 25 April 2023 on maximum levels for certain contaminants in food and repealing Regulation (EC) No 1881/2006

Rovira, J., Martínez, M. Á., Sharma, R. P., Espuis, T., Nadal, M., Kumar, V., and Schuhmacher, M., 2019. Prenatal exposure to PFOS and PFOA in a pregnant women cohort of Catalonia, Spain. *Environ. Res.* 175, 384-392. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.05.040>

- Serrano, L., Iribarne-Durán, L. M., Suárez, B., Artacho-Cordón, F., Vela-Soria, F., Pena-Caballero, M., and Freire, C., 2021. Concentrations of perfluoroalkyl substances in donor breast milk in Southern Spain and their potential determinants. *J. Hyg. Environ.* 236, 113796. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2021.113796>
- Tansel, B., 2022. PFAS risk propagation terminology in spatial and temporal scales: Risk intensification, risk attenuation, and risk amplification. *Sci. Total Environ.* 835, 155503. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155503>
- The Forever Pollution Project, 2023. Journalists tracking PFAS across Europe. <https://foreverpollution.eu> (accessed on 10/08/2024)
- Tian, Y., Zhou, Y., Miao, M., Wang, Z., Yuan, W., Liu, X., and Liang, H., 2018. Determinants of plasma concentrations of perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances in pregnant women from a birth cohort in Shanghai, China. *Environ. Int.* 119, 165-173. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.06.015>
- Timmermann, A., Avenbuan, O. N., Romano, M. E., Braun, J. M., Tolstrup, J. S., Vandenberg, L. N., and Fenton, S. E., 2023. Per-and Polyfluoroalkyl substances and breastfeeding as a vulnerable function: a systematic review of epidemiological studies. *Toxics*, 11(4), 325. <https://doi.org/10.3390/toxics11040325>
- J. Vioque et al., "Reproducibility and validity of a food frequency questionnaire among pregnant women in a Mediterranean area," *Nutr J*, vol. 12, no. 1, 2013, doi: 10.1186/1475-2891-12-26.
- Wang, B., Chen, Q., Shen, L., Zhao, S., Pang, W., and Zhang, J., 2016. Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances in cord blood of newborns in Shanghai, China: implications for risk assessment. *Environ. Int.*, 97, 7-14. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.10.008>
- Wang, B., Chen, Q., Shen, L., Zhao, S., Pang, W., and Zhang, J., 2016. Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances in cord blood of newborns in Shanghai, China: implications for risk assessment. *Environ. Int.* 97, 7-14. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.10.008>
- Wang, Y., Gui, J., Howe, C. G., Emond, J. A., Criswell, R. L., Gallagher, L. G., and Romano, M. E., 2024. Association of diet with per-and polyfluoroalkyl substances in plasma and human milk in the New Hampshire Birth Cohort Study. *Sci. Total Environ.* 933, 173157. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.173157>
- WHO (World Health Organization), 2017. Keeping our water clean: the case of water contamination in the Veneto Region, Italy. ISBN 978 92 890 5246 7
- Zahm, S., Bonde, J. P., Chiu, W. A., Hoppin, J., Kanno, J., Abdallah, M., and Schubauer-Berigan, M. K., 2024. Carcinogenicity of perfluorooctanoic acid and perfluorooctanesulfonic acid. *The Lancet Oncology*, 25(1), 16-17. DOI: 10.1016/S1470-2045(23)00622-8
- Zhang, Y., Mustieles, V., Sun, Q., Coull, B., McElrath, T., Rifas-Shiman, S. L., and Messerlian, C., 2023). Association of early pregnancy perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substance exposure with birth outcomes. *JAMA Netw. Open*, 6(5), e2314934-e2314934. doi:10.1001/jamanetworkopen.2023.14934

Zheng, G., Schreder, E., Dempsey, J. C., Uding, N., Chu, V., Andres, G., and Salamova, A., 2021. Per-and polyfluoroalkyl substances (PFAS) in breast milk: concerning trends for current-use PFAS. *ES&T*, 55(11), 7510-7520. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c06978>

QUESTIONARIO SULLE ABITUDINI ALIMENTARI

IDNUM | | | | |

Cara donatrice, il seguente questionario è finalizzato alla raccolta di informazioni sulla dieta che ha seguito negli ultimi mesi della gravidanza. I dati raccolti saranno utili per cercare di scoprire il ruolo che la dieta gioca in relazione allo sviluppo della gravidanza e del nascituro. Le sue risposte saranno molto utili e, pertanto, le chiediamo di prestare la massima attenzione e collaborazione. Nel caso in cui non consumi abitualmente un determinato alimento, cerchi di approssimare la sua risposta alle quantità indicate, con l'aiuto degli esempi e delle indicazioni fornite.

Per ciascun alimento indichi quante volte in media ha assunto la quantità indicata dall'ultimo colloquio. Dovrebbe considerare le volte in cui ha assunto l'alimento da solo e quelle in cui l'ha aggiunto a un altro alimento o piatto. Ad esempio, nel caso delle uova, consideri quando lo consuma da solo (es. fritto, sodo) e quando aggiunto o mescolato ad altri piatti. Se in questa finestra temporale ha mangiato una frittata di 2 uova ogni 2 giorni dovrà quindi indicare 1 al giorno". Non deve invece considerare l'uovo contenuto nei prodotti di pasticceria e altri dolci.

I. LATTICINI

	Mai o <1 al mese	1-3 al mese	1 alla sett.	2-4 alla sett.	5-6 alla sett.	1 al giorno	2-3 al giorno	4-5 al giorno	6+ al giorno
1. Latte intero (1 bicchiere, 200 cc)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
2. Latte parzialmente scremato (1 bicchiere, 200cc)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
3. Latte scremato (1 bicchiere, 200cc)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
4. Latte condensato (1 cucchiaino)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
5. Crema o panna (1 cucchiaino)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
6. Yogurt intero (uno, 125 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
7. Yogurt scremato (uno, 125 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
8. Ricotta, formaggio bianco o fresco (una porzione, 100 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
9. Formaggio stagionato, semi-stagionato o cremoso (un pezzo, 50 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
10. Crema pasticcera, budino (uno)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
11. Gelato (1 cono, coppetta o palla)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨

II. UOVA, CARNE, PESCE

	Mai o <1 al mese	1-3 al mese	1 alla sett.	2-4 alla sett.	5-6 alla sett.	1 al giorno	2-3 al giorno	4-5 al giorno	6+ al giorno
12. Uova di gallina (uno)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
13. Pollo con pelle (1 piatto medio o pezzo)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
14. Pollo senza pelle (1 piatto medio o pezzo)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
15. Manzo, maiale, agnello come piatto principale (1 porzione media)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
16. Carne di selvaggina: coniglio, quaglia, anatra (1 piatto)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
17. Fegato di manzo, maiale, pollo (1 piatto o pezzo)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
18. Visceri: trippa, cervelli, ventrigli (1 porzione, 100 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
19. Salumi: prosciutto, salsiccia, salame, mortadella, (1 porzione di circa 50 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
20. Salsicce e simili (una media)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
21. Paté, foie-gras (mezza porzione, 50 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
22. Hamburger (uno medio, 100 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
23. Pancetta, lardo (2 strisce o fette, 50 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
24. Pesce fritto (1 porzione media)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
25. Pesce bianco bollito o alla piastra: merluzzo, sogliola, orata (piatto o porzione)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
26. Pesce azzurro bollito o alla piastra: tonno, pesce spada (piatto o porzione)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
27. Altri pesci azzurri: sgombro, sardine, acciughe, salmone	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
28. Tonno sottolio (1 lattina piccola)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
29. Sardine o sgombro sottolio (1 lattina piccola)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
30. Pesce sotto sale o affumicato: acciughe, salmone (mezza porzione, 50 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
31. Vongole, cozze, ostriche (1 porzione, 100 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
32. Frutti di mare: gamberi, gamberetti, granchi, aragosta (1 porzione, 100 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
33. Calamari, seppie, polpo (1 porzione, 100 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨

III. VERDURE, LEGUMI	Mai o <1 al mese	1-3 al mese	1 alla sett.	2-4 alla sett.	5-6 alla sett.	1 al giorno	2-3 al giorno	4-5 al giorno	6+ al giorno
34. Spinaci cotti o bietole (1 porzione media)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
35. Cavolo, cavolfiore, broccoli cotti (1 porzione media)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
36. Lattuga, indivia, broccoli cotti (1 porzione media)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
37. Pomodoro (uno medio)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
38. Cipolla (una media)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
39. Carota, zucca (una o un piatto piccolo)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
40. Fagiolini (una porzione)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
41. Melanzana, zucchina, cetriolo (uno)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
42. Peperone (uno)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
43. Carciofi (1 porzione media, 100 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
44. Asparagi (1 porzione o piatto)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
45. Mais bollito (lattina piccola, 80 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
46. Legumi: lenticchie, fagioli, ceci (1 porzione media)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨

IV. FRUTTA	Mai o <1 al mese	1-3 al mese	1 alla sett.	2-4 alla sett.	5-6 alla sett.	1 al giorno	2-3 al giorno	4-5 al giorno	6+ al giorno
47. Arancia, mandarino (uno)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
48. Succo d'arancia naturale (un piccolo bicchiere, 125 cc)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
49. Banana (uno)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
50. Mela, pera (uno)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
51. Pesca, albicocca (uno)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
52. Anguria, melone (1 fetta)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
53. Uva (1 grappolo medio)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
54. Prugne fresche/secche (una)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
55. Kiwi (uno)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
56. Olive (15 pezzi)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
57. Frutta a guscio: mandorle, arachidi, noci, nocciole (1 porzione, 30 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨

V. PANE, CEREALI E SIMILI	Mai o <1 al mese	1-3 al mese	1 alla sett.	2-4 alla sett.	5-6 alla sett.	1 al giorno	2-3 al giorno	4-5 al giorno	6+ al giorno
58. Pane bianco (1 piccolo pezzo o 3 fette, 60 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
59. Pane integrale (1 piccolo pezzo o 3 fette, 60 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
60. Cereali per colazione (30 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
61. Patatine fritte (1 porzione, 100 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
62. Patate cotte, arrostiti (1 patata media)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
63. Patatine in sacchetto (1 sacchetto piccolo, 25-30 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
64. Riso (1 porzione media)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
65. Pasta (1 piatto)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
66. Pizza (1 porzione, 200 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨

VI. OLI, GRASSI E DOLCI	Mai o <1 al mese	1-3 al mese	1 alla sett.	2-4 alla sett.	5-6 alla sett.	1 al giorno	2-3 al giorno	4-5 al giorno	6+ al giorno
67. Olio d'oliva aggiunto a insalata, pane e piatti (1 cucchiaio)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
68. Altri oli vegetali: girasole, mais, soia (1 cucchiaio)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
69. Margarina aggiunta al pane o al cibo (1 cucchiaio)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
70. Burro aggiunto al pane o al cibo (1 cucchiaio o spalmato)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
71. Biscotti (uno)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
72. Biscotti al cioccolato (uno)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
73. Pasticceria: croissant, ciambella, muffin, torta o simili (uno o porzione)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
74. Cioccolato, cioccolatini e simili (1 barretta o 2 cioccolatini)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
75. Cioccolato in polvere e simili (1 cucchiaio)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨

VII. BEVANDE E VARIE	Mai o <1 al mese	1-3 al mese	1 alla settim.	2-4 alla settim.	5-6 alla settim.	1 al giorno	2-3 al giorno	4-5 al giorno	6+ al giorno
76. Vino rosso (1 bicchiere, 125 cc)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
77. Vino bianco o rosé (1 bicchiere, 125 cc)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
78. Vino secco, vermut, sherry (1 bicchiere piccolo, 50 cc)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
79. Birra (una lattina o una bottiglia piccola, 200 cc)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
80. Birra senza alcool (una lattina o una bottiglia piccola, 200 cc)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
81. Liquori (20-25°) (1 bicchiere piccolo, 50 cc)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
82. Superalcolici (30-40°): rum, whisky, vodka, brandy (1 bicchiere piccolo, 50 cc)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
83. Bevande zuccherate: cola, aranciata, limonata (una, 250 cc)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
84. Bevande senza zucchero: cola, aranciata, limonata (una, 250 cc)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
85. Acqua del rubinetto	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
86. Acqua naturale in bottiglia (1 bicchiere, 250 cc)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
87. Acqua frizzante in bottiglia (1 bicchiere, 250 cc)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
88. Succo di frutta confezionato (1 bicchiere o una confezione, 250 cc)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
89. Caffè (1 tazza)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
90. Caffè decaffeinato (1 tazza)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
91. Tè o infusi (1 tazza)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
92. Zuppa o purè di verdure (1 piatto)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
93. Crocchette di pollo (una)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
94. Crocchette fritte, bastoncini di pesce (uno)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
95. Maionese (1 cucchiaio)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
96. Salsa di pomodoro (mezza tazza)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
97. Ketchup (un cucchiaio)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
98. Sale aggiunto al piatto (1 pizzico)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
99. Aglio (1 spicchio)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
100. Marmellata, miele (1 cucchiaio)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
101. Zucchero aggiunto a caffè e dessert (1 cucchiaino)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨

Consuma altri alimenti regolarmente almeno una volta alla settimana?

_____	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
_____	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨

Consumo di integratori vitaminici o minerali (riferito alle ultime settimane, successive alla visita precedente)

Marca e prodotto	Dose settimanale (cp./sett.)	Data inizio (mese/anno)	Lo sta tuttora assumendo?	Se no, data interruzione (mese/anno)
a. Sale iodato _____	_____	____/____	① Sì ② No	____/____
b. Latte con vitamine A+D _____	_____	____/____	① Sì ② No	____/____
c. Latte ricco in calcio _____	_____	____/____	① Sì ② No	____/____
d. Fibra/ integratori ricchi di fibra _____	_____	____/____	① Sì ② No	____/____
e. Multivitaminici _____	_____	____/____	① Sì ② No	____/____
f. Acido folico _____	_____	____/____	① Sì ② No	____/____
g. Complesso A+E _____	_____	____/____	① Sì ② No	____/____
h. Vitamina A _____	_____	____/____	① Sì ② No	____/____
i. Vitamina E _____	_____	____/____	① Sì ② No	____/____
j. Vitamina C _____	_____	____/____	① Sì ② No	____/____
k. Ferro _____	_____	____/____	① Sì ② No	____/____
l. Calcio _____	_____	____/____	① Sì ② No	____/____
m. Complesso B _____	_____	____/____	① Sì ② No	____/____
n. Zinco _____	_____	____/____	① Sì ② No	____/____
o. Altri integratori _____	_____	____/____	① Sì ② No	____/____

1. Ha seguito qualche tipo di dieta dall'ultimo colloquio?

(Se risponde **NO** vada alla domanda 3)

- ① Sì ② No ③ Non sa / non risponde

2. Potrebbe indicare il motivo per seguire questa dieta?

Può contrassegnare più di una risposta

- ① Per controllare il suo peso
- ② Perché ha il colesterolo
- ③ Perché ha iperglicemia o diabete
- ④ Perché ha problemi di stomaco
- ⑤ Perché ha problemi alla cistifellea o al fegato
- ⑥ Perché ha la pressione alta o problemi cardiaci
- ⑦ Perché ha problemi renali
- ⑧ Perché ha un'allergia ad alcuni alimenti
- ⑨ Perché ha acido urico o gotta
- ⑩ Perché è vegetariana
- ⑪ Per un altro motivo, quale? _____

3. Come è cambiata l'assunzione per i seguenti gruppi alimentari rispetto all'anno precedente la gravidanza?

	Eliminato	↓	Uguale	↑	Non sa
a. Latticini e derivati	①	②	③	④	⑤
b. Uova	①	②	③	④	⑤
c. Carne	①	②	③	④	⑤
d. Pesce	①	②	③	④	⑤
e. Verdura	①	②	③	④	⑤
f. Legumi	①	②	③	④	⑤
g. Frutta	①	②	③	④	⑤
h. Pane	①	②	③	④	⑤
i. Olio di oliva	①	②	③	④	⑤
j. Burro/margarina	①	②	③	④	⑤
k. Zucchero/dolci	①	②	③	④	⑤
l. Bevande alcoliche	①	②	③	④	⑤

4. Quanto spesso mangia cibi fritti?

- ① Ogni giorno
- ② 5-6 volte alla settimana
- ③ 2-4 volte alla settimana
- ④ 1 volta alla settimana
- ⑤ Meno di 1 volta alla settimana
- ⑥ Non sa / non risponde

5. Quando mangia carne, come le piace mangiarla?

- ① Non mangia carne (saltare alla domanda 9)
- ② Al sangue
- ③ Poco cotta
- ④ Cotta
- ⑤ Molto cotta
- ⑥ Non sa / non risponde

6. Cosa fa del grasso visibile, quando mangia carne?

- ① Lo rimuove tutto
- ② Ne rimuove la maggior parte
- ③ Ne rimuove un po'
- ④ Non toglie nulla
- ⑤ Non sa / non risponde

7. Come cuoce solitamente la carne?

	Volte al				
	Mai	Mese	Sett.	Giorno	Non sa
a. Alla piastra	___	___	___	___	___
b. Alla griglia	___	___	___	___	___
c. Arrosto	___	___	___	___	___
d. Fritta in olio	___	___	___	___	___
e. Stufata	___	___	___	___	___

8. Quanto spesso mangia parti di carne abbrustolita?

- ① Mai o meno di una volta al mese
- ② Una volta al mese
- ③ 2-3 volte al mese
- ④ 1 volta a settimana
- ⑤ 2 o più volte a settimana
- ⑥ Non sa / non risponde

9. Quanto spesso mangia parti di pesce abbrustolite?

- ① Mai o meno di una volta al mese
- ② Una volta al mese
- ③ 2-3 volte al mese
- ④ 1 volta a settimana
- ⑤ 2 o più volte a settimana
- ⑥ Non sa / non risponde

10. Quanto spesso mangia la parte abbrustolita dei prodotti da forno (es. pizza)?

- ① Mai o meno di una volta al mese
- ② Una volta al mese
- ③ 2-3 volte al mese
- ④ 1 volta a settimana
- ⑤ 2 o più volte a settimana
- ⑥ Non sa / non risponde

11. Che tipo di grasso o olio usa per:

	Burro	Margarina	Olio oliva	Olio EVO	Olio vegetale	Oli misti
Condire	___	___	___	___	___	___
Cucinare	___	___	___	___	___	___
Friggere	___	___	___	___	___	___

