



Università degli Studi di Ferrara

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE CHIMICHE

CICLO XXIX

COORDINATORE Prof. Carlo Alberto Bignozzi

**STUDI CHIMICO-MOLECOLARI DI
PROFILI NUTRIZIONALI
IDENTIFICATIVI DI DIVERSE
SPECIE ITTICHE**

Settore Scientifico Disciplinare CHIM/10

Dottorando

Dott.ssa Tosi Federica

(firma)

Tutore

Prof. Brandolini Vincenzo

(firma)

Dott. Arcangeli Giuseppe

(firma)

Anni 2014/2016

INDICE

	Pagina
1. INTRODUZIONE	1
1.1 Consumo dei prodotti ittici	5
1.2 Classificazione dei prodotti ittici	8
1.3 L'etichettatura dei prodotti ittici	9
1.4 Caratteristiche nutrizionali dei prodotti ittici	12
1.5 Le frodi alimentari	19
2. SCOPO	24
3. MATERIALI E METODI	26
3.1 Prelievo e preparazione dei campioni	26
3.2 Identificazione morfologica	27
3.3 Analisi Genetiche	28
3.4 Analisi per la determinazione del profilo in acidi grassi	34
3.5 Analisi degli isotopi stabili	36
4. RISULTATI E DISCUSSIONE	37
4.1 Studio della variabilità genetica dei campioni	37

4.2 Studio dei profili lipidici delle specie ittiche	42
4.3 Utilizzo preliminare degli isotopi stabili per la tracciabilità dei campioni	66
4.4 ITTIODATABASE: una risorsa informatica creata per la tutela della salute del consumatore.	69
4.5 Sviluppo nel campo delle metodiche biomolecolari di tecniche ad hoc per indagare le sostituzioni di specie.	75
5. CONCLUSIONI	86
6. BIBLIOGRAFIA	88
INDICE DELLE FIGURE	98
INDICE DELLE TABELLE	101
RINGRAZIAMENTI	103

1. INTRODUZIONE

Nel sistema produttivo italiano uno dei punti di forza è rappresentato da un'elevata variabilità di prodotti agroalimentari, molti dei quali vengono riconosciuti come "tipici" e tutelati con marchi IGP (Indicazione Geografica Protetta) o DOP (Denominazione di Origine Protetta). Attualmente quelli riconosciuti di origine animale sono 1.424 (D.M. 350/1999)^[1] e di questi, 98 risultano essere prodotti ittici.

I prodotti della pesca sono sempre stati considerati dall'uomo un ottimo alimento per le loro caratteristiche nutrizionali e come alternativa al consumo delle carni degli animali allevati o cacciati sulle terre ferme. Il mercato, in questi ultimi decenni, ha cercato di soddisfare la grande richiesta di prodotti della pesca anche attraverso l'aumento degli scambi commerciali e la seguente importazione ed esportazione da ogni parte del mondo. Ciò ha comportato un aumento dei rischi sanitari connessi al consumo del pescato e soprattutto all'incremento delle frodi. In particolare il mercato ittico ha ampliato la sua diffusione diventando sempre più globalizzato, oggi infatti è possibile acquistare prodotti provenienti da tutti i continenti. Lo sviluppo degli scambi internazionali insieme all'enorme valore economico e all'intrinseca deperibilità di queste merci, ha inevitabilmente portato a una proliferazione di comportamenti scorretti da parte di commercianti e venditori a danno del consumatore attraverso frodi commerciali; a volte mettendo anche in grave pericolo la salute pubblica. Al riguardo sono stati emanati decreti e regolamenti per tutelare il consumatore, sia nei confronti dei rischi sanitari (poiché trattasi di prodotti di origine animale che necessitano di trattamenti specifici di conservazione che variano da prodotto a prodotto) sia per l'ambito più strettamente commerciale. L'Autorità competente svolge un ruolo di controllo a tutela della salute pubblica fornendo le giuste indicazioni al consumatore al momento dell'acquisto. Tuttavia, la peculiarità di questa filiera pone dei limiti tecnici e logistici all'attuazione di controlli più capillari.

1.1 CONSUMO DEI PRODOTTI ITTICI

Situazione in Europa

Secondo uno studio condotto da ISMEA (Istituto di Servizi per il Mercato Agricolo Alimentare) nel 2015, la produzione complessiva di pesce è prevista in crescita del 2,6% con 168,6 milioni di tonnellate nel 2015; sostenuta da una espansione del 5,0% dell'acquacoltura a quota 78,0 milioni di tonnellate e dello 0,7% della produzione da catture con 90,6 milioni di tonnellate. Secondo il *Fish Price Index* della F.A.O, nei primi sei mesi del 2015 i prezzi del pesce sono stati in media l'8% più bassi rispetto allo stesso periodo dell'anno precedente, riflettendo in gran parte il calo del 12% nel settore dell'acquacoltura e del 2% per il pesce catturato. La prospettiva generale, per il commercio internazionale in volume di pesce è in generale positiva, anche se la flessione dei prezzi per alcune specie rischia di tradursi in scambi commerciali in valore più bassi.

La domanda dei consumatori per il pesce resta forte, si pensi che il consumo umano diretto, che rappresenta oltre 85% di tutti gli usi di pesce, è oggi stimato in crescita del 2%, a 147,5 milioni di tonnellate. Ciò si è tradotto in un leggero aumento dell'assunzione *pro-capite* di pesce, da 20,0 kg nel 2014 a 20,1 kg nel 2015. D'altra parte, il recupero atteso nel settore delle catture dovrebbe favorire nei prossimi anni un rimbalzo del 9% nell'uso di pesce come mangime, destinato principalmente all'acquacoltura.^[2]

La tabella 1.1 riporta i dati del mercato mondiale dei prodotti ittici (mln di ton. in peso vivo):

	2013	2014	2015	var. % 15/14
Produzione	162,8	164,3	168,6	2,6
Pesca	92,6	90,0	90,6	0,7
Acquacoltura	70,2	74,3	78,0	5,0
Commercio mondiale Valore (export in miliardi di US \$)	136,1	143,5	129,8	-9,6
Utilizzazione	162,8	164,3	168,6	2,6
Consumo umano	141,0	144,6	147,5	2,0
Oli e farine di pesce (mangimi)	16,8	15,0	16,4	9,7
Altri usi	5,0	4,8	4,7	-2,1
Consumo pro capite (kg/anno)	19,7	20,0	20,1	0,9
Prodotto pescato	9,9	9,7	9,5	-2,2
Prodotto allevato	9,8	10,3	10,6	3,8

Tabella 1.1: dati del mercato mondiale dei prodotti ittici (mln di ton. in peso vivo).

Situazione in Italia

Se nel 2015, in Italia, si era registrato un lieve recupero della spesa per l'agroalimentare, i dati elaborati da ISMEA sui risultati del Panel-Nielsen (tabella 1.2) evidenziano per questi primi nove mesi del 2016, una nuova contrazione della spesa. La tendenza degli acquisti in valore rimane negativa per molti comparti di analisi, soprattutto, ancora una volta, per i prodotti proteici che rappresentano ad oggi un terzo della spesa totale per l'agroalimentare.

Variazioni % (in valore)			Quota % valore vs tot. Agroalimentare	
	2015 vs 2014	Cumulato gen-set 2016 vs 2015	2015	Gennaio settembre 2016
Totale agroalimentare	0,3	-1,0	100	100
Generi alimentari	0	-1,0	88,8	88,7
Bevande analcoliche e alcoliche	3,2	-0,8	11,2	11,3
Generi alimentari	0,00	-1,0	88,8	88,7
Derivati dei cereali	-0,5	0,1	14,2	14,1
Carni	-5,8	-5,6	10,6	10,1
Salumi	-1	-5,2	6,4	6,3
Latte e derivati	-3,4	-3,6	14,7	14,4
Ittici	4,3	2,6	7,2	7,4
Uova fresche	-3,4	-0,7	1,0	1,0
Ortaggi	2,1	-0,3	10,3	10,5
Frutta	3,8	1,7	8,9	9,3
Oli e grassi vegetali	10,7	-1,9	2,1	2,0
Altri prodotti alimentari	2	2,0	13,2	13,5

Tabella 1.2: dinamica degli acquisti domestici nazionali di prodotti agroalimentari, variazioni e quote %* (Fonte: Ismea-Nielsen).

In tale scenario, alcuni distinguo sono tuttavia doverosi, per le diverse e contrapposte tendenze seguite dai comparti del “fresco sfuso” rispetto a quelli del “confezionato”.

In particolare, i prodotti confezionati (provvisi di codice EAN) con un'incidenza complessiva di quasi i due terzi (61%) sul carrello della spesa, hanno segnato nei primi nove mesi del 2016 una dinamica positiva con un recupero sui valori del 2015 del +1,2%, per il contributo soprattutto dei cereali, della frutta fresca confezionata e dell'ittico surgelato, segmenti in cui il prodotto confezionato dotato di codice EAN rappresenta rispettivamente il 75% il 27% ed il 74% del venduto in termini di spesa. Considerando

complessivamente il segmento del confezionato e del fresco sfuso, nello specifico dei beni alimentari, tra i comparti che hanno riportato un trend positivo di crescita della spesa, nei primi nove mesi del 2016, si ravvisano solo i prodotti ittici, la frutta ed alcuni prodotti da scaffale quali: aceto, zucchero e dolcificanti, cioccolata ed altri snack. Ai prodotti ittici le famiglie italiane hanno dedicato il 7,4% della loro spesa agroalimentare complessiva, (era il 7,2% nel 2015). L'aumento della spesa per gli ittici rispetto ai primi nove mesi del 2015 è del 2,6%. Dopo il +2% segnato nel primo semestre, questo segmento continua a migliorare la sua performance, registrando un ulteriore incremento di oltre 3,8 punti percentuali nel terzo trimestre. Confermato il buon apprezzamento soprattutto per il pesce fresco (il più importante in termini economici: pesa da solo la metà dell'intero comparto ed il 3,6% del totale della spesa agroalimentare) per il quale la spesa cresce del 4,8%; crescono anche gli acquisti di conserve di pesce (+1%) e pesce congelato (+1%), che insieme rappresentano in termini di spesa quasi l'altra metà del comparto (45%), in lieve flessione solo i prodotti ittici affumicati ed essiccati (-1,5%).^[3]

1.2 CLASSIFICAZIONE DEI PRODOTTI ITTICI

La normativa attuale fornisce la seguente definizione di “prodotto ittico”: “sono prodotti ittici tutti gli animali marini o di acqua dolce (ad eccezione dei molluschi bivalvi vivi, echinodermi vivi, tunicati vivi e gasteropodi marini vivi e di tutti i mammiferi, rettili o rane), selvatici o di allevamento, e tutte le forme, parti e prodotti commestibili di tali animali” (Allegato I del Reg. CE 853/2004 punto 3.1). Il seguente regolamento inoltre suddivide i prodotti della pesca in tre differenti categorie secondo le seguenti definizioni.

- Prodotti **FRESCHI**: i prodotti della pesca non trasformati, interi o preparati, compresi i prodotti imballati sotto vuoto o in atmosfera modificata che, ai fini della conservazione, non hanno subito alcun trattamento diverso dalla refrigerazione, inteso a garantirne la conservazione” (Allegato I del Reg. (CE) 853/2004, punto 3.5).
- Prodotti **PREPARATI**: i prodotti della pesca non trasformati sottoposti ad un’operazione che ne abbia modificato l’integrità anatomica, quali l’eviscerazione, la decapitazione, l’affettatura, la sfilettatura e la tritatura” (Allegato I del Reg. (CE) 853/2004, punto 3.6).
- Prodotti **TRASFORMATI**: i prodotti risultanti dalla trasformazione, la quale avviene per mezzo di aggiunta di ingredienti (esempio: salamoie, panatura, olio), trattamenti fisici (esempio: congelamento, marinatura, affumicatura, essiccamento) dei prodotti della pesca freschi o dall’ulteriore trasformazione di prodotti già precedentemente trasformati (Allegato I del Reg. (CE) 853/2004, punto 3.7).^[4]

1.3 L'ETICHETTATURA DEI PRODOTTI ITTICI

Nel settore ittico negli ultimi anni sta maturando e affermando la rintracciabilità del prodotto, seguendo la strada già elaborata per i prodotti a base di carne, per assicurare al consumatore un prodotto che corrisponde alle caratteristiche descritte ma soprattutto che si rispetti le caratteristiche d'igiene e di sicurezza alimentare. L'etichettatura dei prodotti alimentari e la relativa pubblicità devono rispettare quanto espresso nel D.Lgs. 27.01.1992, n. 109 (attuazione delle direttive (CE) n. 89/395 e n. 89/396) in cui si definisce: "l'etichettatura come l'insieme delle menzioni, delle indicazioni, delle immagini o dei simboli che si riferiscono al prodotto alimentare e che figurano direttamente nell'imballaggio o su un'etichetta appostavi o sul dispositivo di chiusura o su cartelli, anelli o fascette legati al prodotto medesimo". L'etichetta è pertanto lo strumento con cui il produttore comunica al consumatore tutte le informazioni riguardanti il prodotto alimentare acquistato.

Le norme che disciplinano le attività di pesca e di acquacoltura, così come la commercializzazione dei prodotti ittici, sono riportate di seguito, in ordine cronologico:

- Reg. (CE) 104/2000. Relativo all'organizzazione comune dei mercati nel settore dei prodotti della pesca e dell'acquacoltura. G.U.C.E n. 17/22 del 21/01/2000 (normativa base del settore, oggi superata dal Reg. 1379/2013).^[5]
- Reg. (CE) n. 2065/2001 della Commissione del 22/10/2001 che stabilisce le modalità di applicazione del Reg. (CE) n. 104/2000 del Consiglio per quanto concerne l'informazione dei consumatori nel settore dei prodotti della pesca e dell'acquacoltura.^[6]
- Reg. (CE) n. 178/2002 del Parlamento europeo e del Consiglio dell'Unione europea che stabilisce i principi ed i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Agenzia alimentare e fissa le procedure del campo della sicurezza e rintracciabilità dei prodotti agroalimentari e dei mangimi, in tutte le fasi di lavorazione, trasformazione e produzione.^[7]
- Il Regolamento (UE) n. 1169/2011, del Parlamento europeo e del Consiglio del 25 ottobre 2011, relativo alla fornitura di informazioni sugli alimenti ai consumatori. Questo regolamento è entrato in vigore il 13 dicembre 2011, ha trovato applicazione a decorrere dal 13 dicembre 2014 per le disposizioni in materia di etichettatura, presentazione e pubblicità degli alimenti, e dal 13 dicembre 2016 per quanto riguarda le disposizioni sull'etichettatura nutrizionale.^[8]

- Reg. (UE) n. 1379/2013 capo IV Art. 35 del Parlamento europeo e del Consiglio dell'11 dicembre 2013 che definisce le informazioni obbligatorie da inserire in etichetta dei prodotti della pesca e dell'acquacoltura.^[9]

Più in particolare, all'art. 35 il Reg. 1379/2013 pone alcuni obblighi riguardo le informazioni da fornire al consumatore finale, precisando che in etichetta devono comparire, ai fini della identificazione e tracciabilità del prodotto:

- a) la denominazione commerciale della specie e il suo nome scientifico;
- b) il metodo di produzione, in particolare mediante i termini "...pescato..." o "...pescato in acque dolci..." o "...allevato...",
- c) la zona in cui il prodotto è stato catturato o allevato e la categoria di attrezzi da pesca usati nella cattura di pesci

Riguardo la corretta denominazione commerciale nei Paesi UE, il suddetto Regolamento, all'art. 37 così recita: “Stati membri redigono e pubblicano un elenco delle denominazioni commerciali ammesse nel proprio territorio, accompagnate dal loro nome scientifico”.

Tale elenco reca:

- a) il nome scientifico di ciascuna specie quale riportato nel sistema d'informazione FishBase o nel database ASFIS dell'organizzazione per l'alimentazione e l'agricoltura (FAO), se del caso;
- b) la denominazione commerciale:
 - i) il nome della specie nella lingua o nelle lingue ufficiali dello Stato membro interessato;
 - ii) se del caso, ogni altro nome accettato o autorizzato a livello locale o regionale.

Infine, all'art. 38 viene riportato l'obbligo di identificare l'origine del prodotto specificandone la zona F.A.O (tabella 1.3) basata su una precisa area geografica che fa riferimento ad uno specifico numero.

Zona di cattura	Numerazione zona
Atlantico nord-occidentale	Zona F.A.O n. 21
Atlantico nord-orientale	Zona F.A.O n. 27
Mar Baltico	Zona F.A.O n. 27 III d
Atlantico centro-occidentale	Zona F.A.O n. 31
Atlantico centro-orientale	Zona F.A.O n. 34
Atlantico sud-occidentale	Zona F.A.O n. 41
Atlantico sud-orientale	Zona F.A.O n. 47
Mar mediterraneo	Zona F.A.O n. 37.1 37.2 e 37.3
Mar Nero	Zona F.A.O n. 37.4
Oceano indiano	Zona F.A.O n. 51 e 57
Oceano pacifico	Zona F.A.O n. 61 67 71 81 e 87
Antartico	Zona F.A.O n. 48 58 e 88

Tabella 1.3: tabella riassuntiva delle differenti zone di cattura definite dalla F.A.O

1.4 CARATTERISTICHE NUTRIZIONALI DEI PRODOTTI ITTICI

Nessun singolo alimento può, da solo, essere la chiave della salute di una persona, tuttavia consumare una maggiore quantità di pesce è uno dei metodi che la maggior parte degli individui può adottare per migliorare la propria alimentazione e la propria salute. Molte delle ricerche sui benefici degli acidi grassi omega-3 indicano il pesce come un'ottima fonte.^[10]

A tal proposito anche l'EFSA ha espresso molti giudizi al riguardo attraverso il parere di un gruppo di esperti scientifici sui prodotti dietetici, l'alimentazione e le allergie (NDA). NDA si occupa di prodotti dietetici, nutrizione umana e allergie alimentari nonché dei nuovi prodotti alimentari. Nel suo parere l'EFSA dichiara che non esistono grandi differenze tra il pesce selvatico e il pesce di allevamento in termini sia di sicurezza che di apporto nutrizionale. Il consumo di pesce, ricco di acidi grassi polinsaturi a catena lunga n-3 e talune vitamine e minerali (vitamine A, B12 e D, iodio e selenio), risulta benefico per la salute cardiovascolare e per lo sviluppo fetale. In generale, le raccomandazioni nutrizionali suggeriscono di consumare pesce una o due volte alla settimana. E' nelle prime fasi del suo sviluppo che l'essere umano conosce il periodo di massima sensibilità ai contaminanti critici, quali il metilmercurio ed i composti diossina-simili. Gli esperti scientifici dell'EFSA quindi consigliano, soprattutto per i gruppi più vulnerabili quali i nascituri, le donne in stato di gravidanza e le donne in età fertile, che i benefici nutrizionali del consumo del pesce siano valutati tenendo conto dei rischi potenziali riconducibili alla presenza di contaminanti in taluni tipi di pesce.

Generalmente viene raccomandato dai medici di scegliere una dieta a basso contenuto di grassi saturi e colesterolo e con un apporto moderato di grassi totali. Le carni e i prodotti caseari interi sono le fonti principali di grassi saturi. I grassi insaturi si trovano principalmente in alcuni oli vegetali, come l'olio di semi di lino, l'olio di nocciole e l'olio di colza. Di conseguenza, la dieta ideale dovrebbe essere più ricca di grassi monoinsaturi e polinsaturi rispetto all'alimentazione attualmente adottata in Europa. Nella categoria dei grassi polinsaturi sono comprese due importanti sottoclassi di acidi grassi: gli omega-3 e gli omega-6. Gli oli vegetali sono ricchi di acidi grassi omega-6 e molti europei ne assumono, senza rendersi conto, grandi quantità attraverso l'alimentazione. D'altro canto, gli acidi grassi omega-3 generalmente mancano nella nostra dieta. Questi si trovano nel pesce, nei crostacei, nel tofu, nelle mandorle e nelle noci, come anche in alcuni oli vegetali come l'olio di semi di lino, l'olio di nocciole e l'olio di colza. Fonte di acidi grassi

polinsaturi possono essere microalghe come i cianobatteri, diversi lavori a carattere scientifico hanno mostrato la presenza di questi acidi nel fitoplacton ed in microalghe [11,12,13] con applicazioni sia commerciali, compresa l'alimentazione umana, che industriali.

Un'area di ricerca sugli acidi grassi omega-3 riguarda il loro ruolo sulle funzioni cerebrali anche dopo eventi traumatici^[14,15]; alcune ricerche suggeriscono che questi acidi grassi potrebbero avere anche un ruolo nella prevenzione della degenerazione maculare^[16] ed avere effetti benefici in alcune patologie depressive.^[17]

Le ricerche stanno attualmente studiando l'effetto degli omega-3 sul sistema immunitario e rivelano un ruolo positivo di questi acidi grassi nei casi di artrite reumatoide, asma, lupus, malattie renali e cancro.^[18,19,20,21]

Secondo l'EFSA gli acidi grassi polinsaturi omega-3 a catena lunga (n-3 LCPUFA), quali l'acido eicosapentaenoico (EPA), l'acido docosaesaenoico (DHA) e l'acido docosapentaenoico (DPA), svolgono un ruolo importante nella crescita e nello sviluppo del cervello, nella regolazione della pressione sanguigna, nella funzione renale, nella coagulazione del sangue e nelle reazioni infiammatorie e immunologiche. L'EFSA ha condotto una serie di valutazioni scientifiche delle indicazioni sulla salute in relazione ai benefici dell'assunzione di n-3 LCPUFA. Secondo le conclusioni del gruppo di esperti NDA, per ottenere gli effetti indicati di riduzione della pressione sanguigna e dei livelli dei trigliceridi occorre un'assunzione di EPA e DHA compresa tra 2 e 4 g al giorno, mentre per il mantenimento di una normale funzione cardiaca è sufficiente un'assunzione di 250 mg. Inoltre, per quanto riguarda i valori dietetici di riferimento, il gruppo di esperti ha concluso che l'assunzione di 250 mg al giorno è adeguata per il mantenimento della salute cardiovascolare generale negli adulti e nei bambini sani. A seguito dei timori espressi da diversi Stati membri in merito a possibili effetti avversi associati a un consumo eccessivo di n-3 LCPUFA, la Commissione europea ha chiesto all'EFSA di fornire una consulenza scientifica sui livelli di assunzione sicuri ed esaminare l'eventualità di fissare un livello massimo di assunzione tollerabile (UL) per tali sostanze. Il gruppo di esperti ha concluso che i dati disponibili non erano sufficienti per stabilire un UL relativo agli n-3 LCPUFA (DHA, EPA e DPA singolarmente o in combinazione) per alcun gruppo di popolazione. Tuttavia ha rilevato che, ai livelli di assunzione derivata dagli alimenti, gli n-3 LCPUFA non sono stati associati ad effetti avversi nei bambini o negli adulti sani e ha concluso che un'assunzione supplementare di EPA e DHA in combinazione a dosi fino a 5 g non suscita timori per la sicurezza della popolazione generale.

Gli omega-3 (o PUFA n-3) sono caratterizzati dalla posizione del primo doppio legame che, iniziando il conteggio dal carbonio terminale (carbonio ω ovvero carbonio n), occupa la terza posizione, da cui il termine omega-3 (figura 1.1). Sono noti soprattutto per la loro presenza nelle membrane cellulari e per il mantenimento della loro integrità. Talvolta sono raggruppati come vitamina F (dall'inglese fatty acids).

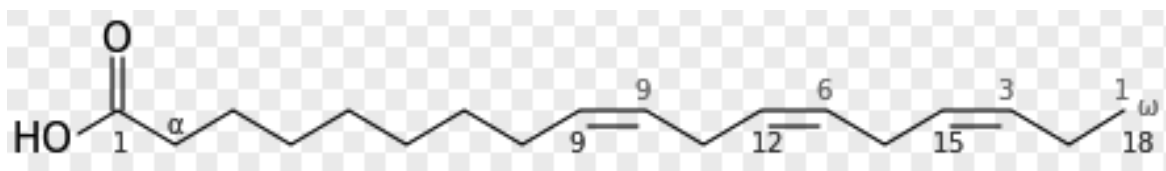


Figura 1.1: struttura molecolare dell'acido α -linolenico (ALA)

Gli acidi grassi omega-3 sono detti polinsaturi perché la loro catena comprende vari doppi legami.

I principali acidi grassi del gruppo omega-3 sono:

- l'acido α -linolenico o $\omega_3\alpha$ (18:3; ALA)
- l'acido eicosapentaenoico (20:5; EPA) acido timnodonico;
- l'acido docosaesaenoico (22:6; DHA) acido cervonico.

I numeri tra parentesi indicano che questi tre acidi hanno rispettivamente 3, 5 e 6 doppi legami nella loro catena composta da 18, 20 e 22 atomi di carbonio. Questi doppi legami sono in configurazione *cis*, ciò significa che i loro due atomi di idrogeno si trovano dalla stessa parte del piano formato dal doppio legame. Questi legami separati da un gruppo metilene danno una forma elicoidale alle molecole di omega-3.

Gli acidi EPA e DHA possono essere sintetizzati dall'organismo umano a partire dall'acido ALA, ma solamente in piccole quantità. In pratica, il tasso di DHA non varia nonostante l'aumento di apporto di ALA.

Generalmente si trovano nei seguenti alimenti:

- Pesce (EPA e DHA)
- Olio di pesce (EPA e DHA)
- Crostacei (EPA e DHA)
- Noci (ALA)
- Oli vegetali come l'olio di lino, di semi di canapa, di ribes nero, di sachainchi e l'olio di colza (ALA)
- Lecitina di soia
- Semi di chia (*Salvia hispanica*)
- Canapa (*Cannabis sativa*) (ALA)

L'acido α -linolenico (ALA) è un acido grasso n-3 insaturo della serie omega-3; è un liquido incolore a temperatura ambiente. Nella letteratura è anche chiamato 18:3 ω 3. Chimicamente, l'acido alfa-linolenico è un acido carbossilico con una catena di 18 atomi di carbonio e tre doppi legami in *cis*, il primo doppio legame si trova sul terzo carbonio a partire dalla fine del gruppo metilenico della catena carboniosa. (figura1.1) L'acido α -linolenico possiede un isomero: l'acido γ -linolenico o GLA, acido grasso della serie omega-6 che presenta tre insaturazioni in corrispondenza dei carboni 6 e 9, 12 (18:3 ω 6). L'acido α -linolenico esercita un ruolo biologico dopodiché viene trasformato in EPA e DHA. L'acido linolenico è uno dei due acidi grassi essenziali che gli esseri umani e altri animali devono assumere con gli alimenti per mantenere uno stato di buona salute; ciò perché gli organismi lo richiedono per i vari processi biologici, ed anche perché non può essere sintetizzato, in modo endogeno, dagli stessi organismi ma occorre assumerlo con gli alimenti. Questo acido grasso deve essere trasformato, dal corpo umano, in EPA (acido eicosapentenoico) e DHA (acido docosaesaenoico) che permettono di esercitare quegli effetti biologici che sono determinanti per il corretto funzionamento di alcuni organi importanti. Questo processo di conversione non sempre viene attivato ed è particolarmente inefficiente, perché consente di sfruttare dal 5% al 10% dell'acido α -linolenico assunto.

L'acido eicosapentaenoico (EPA), detto anche acido icosapentaenoico, è un acido grasso omega-3. Il suo nome in letteratura è 20:5(n-3), mentre il suo nome comune è acido timnodonico. La sua struttura chimica è quella di un acido carbossilico con una catena di 20 atomi di carbonio e cinque doppi legami in *cis*; il primo doppio legame è localizzato sul terzo carbonio dall'estremità omega. (figura 1.2) L'EPA è un acido grasso polinsaturo

(PUFA) che agisce come precursore della prostaglandina 3 (la quale inibisce l'aggregazione piastrinica), trombossano 3 e i gruppi di leucotrieni 5 (tutti eicosanoidi).

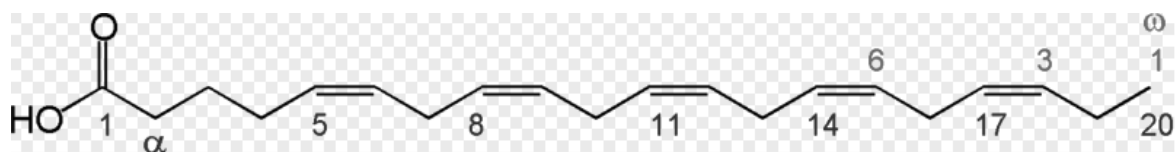


Figura 1.2: struttura molecolare dell'acido eicosapentaenoico (EPA)

L'EPA viene assunto con la dieta mediante l'ingestione di alcuni pesci, come merluzzi, aringhe, sgombri, salmone e sardine. Si trova anche nel latte materno umano. L'EPA che si trova nei pesci, comunque, non viene prodotto naturalmente da essi, ma assunto a sua volta dalle alghe di cui si cibano. L'EPA solitamente non si trova nelle piante superiori, anche se è stata riportata una sua presenza in tracce nella portulaca.^[22]

Il corpo umano può anche ricavare l'EPA dalla trasformazione dell'acido alfa-linolenico (ALA), questa conversione è molto meno efficiente rispetto all'assorbimento di EPA dalla dieta; inoltre, l'ALA è esso stesso un acido grasso essenziale, per cui l'organismo deve esserne costantemente rifornito. L'EPA è anche un precursore dell'acido docosaesaenoico (DHA), per cui avere livelli sufficienti di EPA in una dieta priva sia di EPA che di DHA è molto difficile, sia per il lavoro metabolico in più richiesto per sintetizzare l'EPA che per l'uso di EPA per sintetizzare DHA. Alcune patologie, come il diabete o certe allergie, possono limitare considerevolmente la capacità dell'organismo di metabolizzare l'ALA ad EPA.^[23]

Il *National Institutes of Health* degli Stati Uniti elenca le condizioni mediche per cui è certo o supposto un effetto benefico dell'EPA (da solo o in associazione con altre fonti di ω-3).^[24]

La maggior parte di queste si basa sulla sua capacità di diminuire l'infiammazione. Tra gli acidi grassi omega-3, si suppone che l'EPA in particolare posseda un potenziale benefico nei confronti di patologie mentali, come la schizofrenia.^[25,26]

Diversi studi riportano una diminuzione dei sintomi nelle scale di gravità abitualmente usate per queste patologie quando viene assunto un quantitativo extra di EPA. Alcune ricerche suggeriscono anche che l'EPA potrebbe migliorare la risposta dei pazienti alla chemioterapia, probabilmente modulando la produzione di eicosanoidi.^[27]

Potrebbe anche ridurre il rischio di sviluppare alcuni tipi di tumore, come il mieloma multiplo.^[28]

L'acido docosaesaenoico (DHA) è un grasso omega-3 o PUFA n-3. Nella struttura chimica, il DHA è un acido carbossilico con una catena di 22 atomi di carbonio e 6 doppi legami in posizione *cis*; il primo doppio legame si trova sul terzo carbonio dalla posizione terminale omega. (figura 1.3)

Il suo nome comune è acido cervonico, il suo nome sistematico è all-cis-docosa-4,7,10,13,16,19-enoico acido, e il suo nome abbreviato è 22:6 (n-3) secondo la nomenclatura degli acidi grassi.

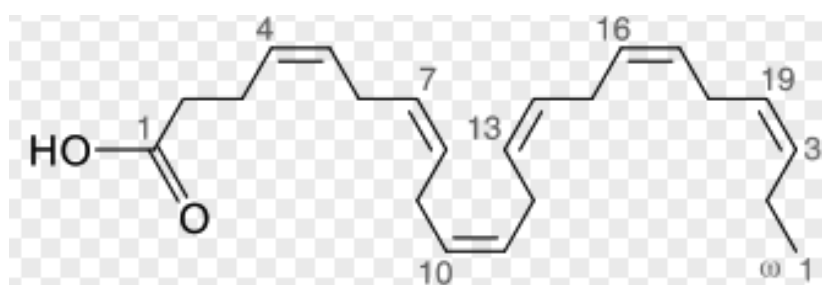


Figura 1.3: struttura molecolare dell'acido docosaesaenoico (DHA)

La maggior parte del DHA presente nei pesci e negli organismi complessi, che vivono nelle fredde acque oceaniche, proviene dalle alghe fotosintetiche; diventando sempre più concentrata negli organismi man mano che si sale lungo la catena alimentare. Il DHA è anche prodotto commercialmente da microalghe, *Cryptocodinium cohnii* che è un microrganismo del genere *Schizochytrium*.

Negli erbivori e nei carnivori che non mangiano il pesce, il DHA è prodotto interamente a partire dall'acido α -linolenico prodotto dalle piante (e anche da animali che si nutrono di piante). Anche se l'acido α -linolenico (ALA) si riesce a convertire in DHA, il processo è scarsamente efficiente e molto limitato, ciò accade anche negli individui sani.

Il DHA è metabolizzato a formare i docosanoidi, che comprende diverse famiglie di potenti ormoni. Infatti, il DHA è un acido grasso importante per la sintesi dello sperma, mentre nel cervello è utile per la sintesi dei fosfolipidi. L'assunzione con la dieta di DHA può ridurre il rischio di malattie cardiache riducendo nell'uomo il livello nel sangue dei trigliceridi. Grazie a vari studi si è osservato che bassi livelli di DHA sono associati con la malattia di Alzheimer.^[29,30]

Gli acidi grassi omega-6 (chiamati anche $n-6$ o acidi grassi $\omega-6$) sono una famiglia di acidi grassi polinsaturi, di origine vegetale, aventi il primo doppio legame C=C sul sesto atomo di carbonio contando dal fondo dell'acido grasso, il cui ultimo atomo è, appunto, definito carbonio ω (omega, ultima lettera dell'alfabeto greco). Gli effetti biologici degli $\omega-6$ sono ampiamente mediati dalla loro interazione con gli acidi grassi omega-3, di cui sono antagonisti. L'acido linoleico (18:2), l'omega-6 a catena più corta, è un acido grasso essenziale. L'acido arachidonico (20:4) è anch'esso un omega-6 particolarmente significativo ed è precursore delle prostaglandine e di altre molecole attive fisiologicamente.

L'acido linoleico è uno degli acidi grassi essenziali e appartiene al gruppo degli omega-6. L'acido linoleico (o acido allcis-9,12-ottadecadienoico) è un acido carbossilico insaturo a 18 atomi di carbonio della serie omega-6. (figura 1.4). Si presenta come un liquido incolore, con punto di fusione $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

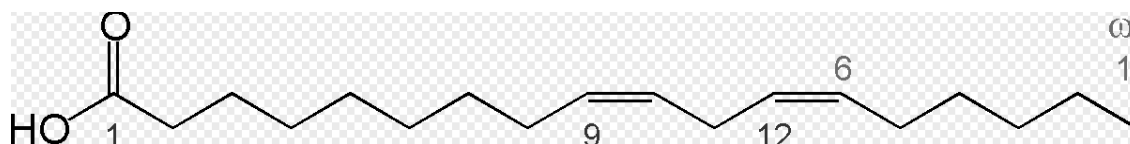


Figura 1.4: struttura molecolare dell'acido linoleico

La classe di acidi grassi a cui appartiene sono i precursori chimici che il corpo usa per creare endocannabinoidi. L'acido linoleico è inoltre il bioprecursore che l'organismo umano utilizza per la sintesi di acido arachidonico, che nonostante ciò è anch'esso un acido grasso essenziale in quanto la sua biosintesi endogena non è in grado di soddisfare il fabbisogno dell'organismo. L'acido linoleico viene convertito in acido arachidonico e prostaglandine. L'acido linoleico è presente in tutti gli oli vegetali ed è abbondante in molti di questi, tra cui in particolare nell'olio di semi di cannabis, l'olio di cartamo e l'olio di girasole, ma anche, in minor misura, l'olio di mais, l'olio di soia, nella pianta di caffè verde e altri. È presente anche in alcuni grassi di origine animale. Viene studiato il suo ruolo nella prevenzione o nel trattamento di diverse malattie, tra cui il cancro ed il diabete.^[31] Sembrerebbe inoltre che tale acido grasso fosse implicato nell'abbassamento della colesterolemia, agendo sull'assorbimento intestinale di questo.^[32,33]

1.5 LE FRODI ALIMENTARI

Nella storia dell'umanità le frodi sono considerate "attività criminali" tra le più antiche, che hanno riguardato molteplici settori: finanziario, alimentare, abbigliamento, giocattoli ed altre attività di interesse commerciale. In Italia le prime norme risalgono al 1888, con la legge Crispi-Pagliani, con la quale fu istituito il Sistema Sanitario Nazionale e la tutela della salute dei cittadini divenne un dovere dello Stato; seguì il Testo Unico delle leggi sanitarie del 1907 ed il relativo regolamento del 1908. La frode è intesa come condotta illecita dettata da intenzione dolosa e tale da creare danno ad altri.

Nel settore alimentare sono considerate condotte illecite quelle che ledono i diritti legali e commerciali (contrattuali/patrimoniali) del consumatore. Il reato di frode in commercio si realizza indipendentemente da un'effettiva e concreta lesione del patrimonio. È un atto che si configura in una diminuzione del valore della merce, economico o nutritivo.^[34]

Il reato di frode è stato inserito nel D.Lgs 231/2001, insieme ad altri reati di natura industriale, tra i presupposti atti a determinare la concorrente responsabilità amministrativa dipendente dal reato, della persona giuridica cioè della società/azienda che accoglie l'agente del reato stesso.

Quando si parla di frodi alimentari si fa riferimento alla produzione, trasformazione, distribuzione e quindi al commercio di alimenti non conformi alla normativa vigente. I casi più frequenti di frodi alimentari a danno dei consumatori si realizzano attraverso false dichiarazioni per provenienza, qualità, composizione, caratteristiche di un alimento.

Le frodi alimentari si dividono in due tipologie:

- **FRODI SANITARIE** che consistono nel ledere i diritti legali del consumatore e quindi nel rendere nocive le sostanze alimentari, attentando e ledendo la salute del consumatore (art.32 Costituzione - Tutela della salute pubblica): possono essere commesse da chiunque detiene per il commercio o pone in commercio o distribuisce per il consumo, acque, sostanze o cose da altri avvelenate, adulterate o contraffatte in modo pericoloso per la salute pubblica.
- **FRODI COMMERCIALI** che ledono i diritti contrattuali e patrimoniali del consumatore (C.P. Tutela della buona fede del consumatore - lealtà degli scambi commerciali). Si tratta di reati compiuti da chi nell'esercizio del commercio "consegna all'acquirente una cosa per un'altra o diversa da quella dichiarata o pattuita per origine, provenienza, qualità o quantità". In tal modo non si rendono

“nocive” le sostanze alimentari, ma si realizza un inganno ed illecito profitto a danno del consumatore.

Sono state identificate legalmente quattro tipologie di frodi alimentari:

- **Adulterazione** (Codice Penale art. 440/442) Azione fraudolenta consistente in “modificazione” non dichiarata (in etichetta), dei componenti del prodotto alimentare. Il prodotto viene privato di una componente utile per la sua efficacia nutritiva e/o si aggiunge sostanza di scarso valore per aumentarne il peso/volume. Modificazioni nella composizione analitica del prodotto alimentare per aggiunta o sottrazione di componenti senza che il prodotto venga modificato in maniera apprezzabile.
- **Contraffazione** (Codice Penale art. 440/442) Azione fraudolenta a “imitazione perfetta” per far apparire un prodotto alimentare dotato di caratteristiche diverse da quelle che realmente possiede. Il prodotto viene presentato e dichiarato con caratteristiche di un prodotto più pregiato. Totale “sostituzione” di una sostanza alimentare con un’altra di minor pregio, ingannando il consumatore. Frode molto pericolosa quando per sostituire i componenti originali/naturali si utilizzano sostanze nocive. In questo caso si tratta di una frode sanitaria.
- **Sofisticazione** (Codice Penale art.515/art.5 L. 283/62) Azione fraudolenta consistente nel sostituire alcuni costituenti del prodotto alimentare con altri di minor pregio ma che non costituiscono un rischio per il consumatore. Il prodotto viene trattato in modo da renderlo più attraente o simile ad altri prodotti più pregiati e quindi più costosi. “Aggiunta” all’alimento di sostanze estranee alla sua composizione. Impiego di coloranti e conservanti non autorizzati o se autorizzati quando sono aggiunti in quantità superiore al limite di legge o fuori dalle procedure di legge.
- **Alterazione** (Legge.283/62 art. 5) Azione fraudolenta consistente nella “variazione” delle caratteristiche di composizione ed organolettiche e quindi nutrizionali di un prodotto alimentare, dovuta a fenomeni degenerativi spontanei o inadeguata/errata modalità di conservazione. Nei prodotti alimentari, sia naturali che composti-preparati secondo un dato disciplinare, sono presenti vari costituenti in determinate proporzioni che vanno mantenuti costanti salvo modificazioni previste per legge. I coadiuvanti tecnologici, ad esempio, usati nelle lavorazioni per coadiuvare il processo produttivo, non debbono assolutamente residuare all’interno del prodotto alimentare.^[35]

- **Sostituzione o *Aliud pro Alio*** (Codice Penale Art. 515) consiste nella sostituzione di una specie pregiata con un'altra somigliante, ma di minor valore economico sul prodotto intero.

La giurisdizione delle frodi alimentari e commerciali

I reati quali l'avvelenamento di acque o di sostanze alimentari (art. 439 c.p.), l'adulterazione o contraffazione di sostanze alimentari (art. 440 c.p.), il commercio di sostanze alimentari contraffatte o adulterate (art. 442 c.p.), il commercio di sostanze alimentari nocive (art. 444 c.p.) sono comprese nel Titolo VI del codice penale "Dei delitti contro l'incolumità pubblica" ed in particolare nel Capo I "Dei delitti di comune pericolo mediante frode". Altri delitti, quali la frode nell'esercizio del commercio (art. 515 c.p.), la vendita di sostanze alimentari non genuine come genuine (art. 516 c.p.), la vendita di prodotti industriali con segni mendaci (art. 517c.p.), la contraffazione di indicazione geografiche o denominazioni di origine dei prodotti agroalimentari (art. 517 quater) sono disciplinati nel Titolo VIII "Dei delitti contro l'economia pubblica", Capo II "dei delitti contro l'industria ed il commercio". La prima osservazione in materia di frode alimentare è rappresentata dal fatto che la distinzione tra frodi sanitarie e frodi commerciali si ripropone con riferimento al concetto di pericolosità: affinché si possa ritenere configurata la frode cosiddetta "sanitaria" occorre che possa essere ravvisato l'elemento della "pericolosità" per la salute (art. 439, 440, 442 e 444 c.p.), mentre per la configurazione di talune frodi, che possono essere compiute anche in ambito alimentare, la pericolosità non ne costituisce elemento (art. 515, 516, 517 e 517 quater c.p.). Nell'ambito delle "frodi sanitarie" il momento fraudolento costituisce uno degli elementi essenziali del delitto contro la salute pubblica, ma la frode resta – per così dire – assorbita nella più grave e complessa fattispecie penale che mira a tutelare, in primo luogo, la salute pubblica. La frode presuppone il dolo del soggetto agente, mentre nei casi in cui il dolo non è ravvisabile, come nell'art. 452 c.p. "Delitti colposi contro la salute pubblica" non si potrà parlare di frode alimentare, ma di delitti colposi di comune pericolo. La frode in commercio e gli altri attentati alla fiducia commerciale hanno un carattere generale, nel senso che si tratta di fattispecie che non fanno riferimento ad un determinato bene (es. alimenti), ma si pongono a tutela dell'economia pubblica ed in particolare di quella connessa all'industria ed al commercio. Ultima importante considerazione è che in base al principio di specialità, la frode in commercio (art. 515 c.p.) non trova applicazione nel caso di consegna di sostanze alimentari contraffatte o adulterate: comportamento punito, appunto, ai sensi dell'art.440 c.p.^[36]

Tecniche per l'identificazione delle specie ittiche utilizzate contro le frodi

L'aumento e la globalizzazione del commercio dei prodotti ittici ha accresciuto il potenziale rischio di frode per sostituzione di specie nel mercato; per individuarle e prevenirle sono state messe a punto diverse metodiche. Questi metodi devono essere rapidi, economici, affidabili e possibilmente automatizzabili.^[37] Per quanto riguarda il pesce integro, la specie può essere identificata attraverso un'analisi morfologica, sistema che presenta limiti oggettivi dovuti alla necessità di una buona esperienza da parte degli operatori addetti, il quale in alcuni casi non è condizione sufficiente viste le continue introduzioni di nuove specie nei mercati. Inoltre nel caso di prodotti ittici processati sottoforma di filetti, tranci, cubi, surimi o bastoncini risulta evidente come l'approccio morfologico non sia sufficiente. I metodi basati sull'analisi delle proteine vengono esclusi per l'identificazione di specie in matrici lavorate, in particolare se sottoposti a trattamenti termici, a causa della scarsa stabilità delle proteine alle elevate temperature. I metodi basati sull'analisi delle sequenze di DNA, invece, possiedono numerosi vantaggi, come una buona resistenza alla degradazione, una specificità e una sensibilità maggiore.^[38]

Di seguito vengono descritte le principali tecniche utilizzate per la certificazione di specie, distinguendole in “non basati su tecniche molecolari” e “ basati su tecniche molecolari”.

Metodi non basati su tecniche molecolari

- Isoelettrofocalizzazione(IEF)

Le proteine sarcoplasmatiche vengono separate in base al loro punto isoelettrico, applicando una differenza di potenziale su un supporto solido, solitamente un gel. È un metodo semplice, con un ottimo potere discriminante tra le specie e permette di creare una mappa specie-specifica caratteristica per ogni specie ittica se applicata al prodotto crudo sottoforma di tranci e filetti.^[39] Il limite principale di questa metodica si riscontra se applicata a prodotti trasformati. In particolare, prodotti che hanno subito trattamenti termici come la cottura o la pastorizzazione, risultano particolarmente ostici da analizzare a causa della bassa stabilità termica delle proteine.

- HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

È una tecnica cromatografica che permette di separare due o più composti presenti in un solvente in base alla loro affinità. Questa metodica è applicabile sia a proteine estratte da pesci appena pescati, sia irradiati con raggi gamma o con infrarossi. Uno dei maggiori vantaggi nell'utilizzo di questa tecnica sta nel tempo ridotto di preparazione del campione.

- Elettroforesi Capillare

In questo tipo di elettroforesi, le molecole vengono separate in base alle cariche ioniche. È una tecnica rapida e riproducibile, presenta inoltre una maggiore risoluzione e prezzo inferiore rispetto all'analisi con HPLC, prevedendo un minor utilizzo di reagenti.^[40]

Le tre metodiche elencate sopra risultano poco riproducibili in quanto l'espressione proteica varia in base al soggetto e alle sue caratteristiche (età, sesso, area e periodo di pesca) e devono quindi contemplare la variabilità legata all'espressione proteica.

- Saggio ELISA (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*)

Basato sull'analisi degli anticorpi specifici, è stato usato per l'identificazione di diverse specie ittiche^[41]. Il limite maggiore di questa tecnica sta nella sua bassa specificità: è infatti molto difficile discriminare due specie molto affini con anticorpi comuni e dunque è necessario sviluppare degli anticorpi specifici per ogni specie. Inoltre possono avvenire reazioni di cross-reattività a causa di anticorpi che riconoscono epitopi diversi con diversa affinità.

Metodi basati su tecniche molecolari

L'uso di tecniche di identificazione basate sul DNA presenta alcuni vantaggi rispetto a quelli basati sulle proteine, come la specificità, la sensibilità e la ripetibilità elevate anche in campioni processati. Il DNA è maggiormente termostabile rispetto alle proteine, e frammenti di DNA di circa 300bp possono essere ancora ritrovati dopo il processo di sterilizzazione. Un altro vantaggio a favore dello sviluppo di metodiche basate sull'analisi del DNA, quindi attraverso analisi di PCR, è dato dal fatto che il patrimonio genetico risulta il medesimo in ogni cellula somatica dell'organismo analizzato, mentre l'espressione proteica varia da tessuto a tessuto^[38]. Tra le tecniche basate sull'utilizzo della PCR *end-point*, il *barcoding* è certamente la più utilizzata a livello internazionale per l'identificazione di specie. Tale metodo prevede l'amplificazione ed il sequenziamento di un tratto di circa 650bp del gene mitocondriale codificante per la Citocromo Ossidasi I (COI). Questo tipo di analisi prevede fondamentalmente tre fasi distinte: 1) l'estrazione del DNA totale e l'amplificazione tramite PCR attraverso una coppia di *primers* universali che amplificano un tratto di circa 650bp; 2) sequenziamento dell'amplificato; 3) allineamento della sequenza ottenuta con le sequenze depositate nei database pubblici: BOLD o GenBank. Gli algoritmi di allineamento delle sequenze permettono di confrontare la propria sequenza con tutte quelle depositate, fornendo come output una lista di specie ordinate per percentuale di similarità.

2. SCOPO

Questo lavoro si inserisce in un progetto di collaborazione tra il Dipartimento di Scienze Chimiche e Farmaceutiche dell'Università di Ferrara e l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie – CSI sezione di Adria.

Lo scopo del progetto di ricerca, sviluppato durante il triennio 2014-2016, è il miglioramento delle informazioni e delle conoscenze dei profili nutrizionali identificativi di diverse specie ittiche, con un approccio che combina conoscenze nell'ambito delle analisi chimiche e del campo genetico-molecolare. L'obiettivo del lavoro è stato tradurre tutti i dati raccolti dalle analisi in informazioni utili per l'inserimento in un database pubblico chiamato ITTIOBASE.

La prima parte del progetto di ricerca è stata rivolta verso uno studio preliminare delle specie ittiche più rappresentative della pesca e dell'acquacoltura italiana. Sono state raccolte informazioni sulle specie ittiche, maggiormente commercializzate e presenti sul mercato nazionale e successivamente sono state reperite 13 specie ittiche diverse. Per ogni specie, ove possibile, sono stati campionati una decina di soggetti da analizzare.

La seconda parte del progetto ha previsto l'analisi genetica delle specie campionate nella prima fase. Sono stati analizzati 118 campioni.

Le analisi molecolari hanno previsto tre passaggi: una prima fase di estrazione degli acidi nucleici dai campioni di tessuto muscolare, la quantificazione del DNA (ng/μL) di ciascun campione ed un'amplificazione, utilizzando una metodica di *PCR end-point*, mediante *primers* universali (CoiFishF1 e CoiFishR1) di un tratto di circa 700bp del gene mitocondriale codificante per il Citocromo Ossidasi Prima (COI), gene di elezione per l'analisi di *Barcoding*.^[42,43,44]

Il prodotto di amplificazione di ciascun campione è stato quantificato e purificato per poterlo sottoporre a una reazione di sequenziamento. Le sequenze così ottenute sono state infine inserite in BLAST per creare allineamenti genetici e confermare genere e specie di ciascun campione.

Nella terza parte del progetto le analisi chimiche sono state eseguite su matrici di tessuto muscolare congelato al fine di valutare il profilo lipidico delle diverse specie. A tal scopo la prima parte dell'analisi ha previsto l'estrazione della componente lipidica, la successiva transesterificazione dei trigliceridi e corsa degli acidi grassi metil-esteri per la separazione

degli stessi. Sono stati valutati e confrontati i profili così ottenuti delle diverse specie evidenziando possibili differenze quali-quantitative nei profili lipidici stessi.

Visto le attuali ricerche sul legame tra assunzione di omega-3 e riduzione di malattie cardiovascolari^[45] e i recenti studi che evidenziano l'importanza degli omega-3 nell'alimentazione infantile^[46]; è stata riposta una particolare attenzione nella valutazione degli acidi grassi insaturi come EPA e DHA. Per ogni specie si è valutato il contenuto di acidi grassi saturi ed insaturi e si è cercato di trasformare il dato ottenuto in una informazione di semplice comprensione per poter essere inserita nel database informatico.

I dati sviluppati ad oggi sono stati tradotti in informazioni utili al consumatore finale ed inserite nel database informatico Ittiobase (<http://90.147.123.23/ittiobase/>) che raccoglie nozioni di carattere generale, tra cui d'ora in poi anche di carattere nutrizionale, per ciascuna delle specie analizzate durante il progetto di ricerca.

Un ramo collaterale del progetto ha previsto anche uno studio preliminare dei campioni, già analizzati chimicamente e geneticamente, di alcune specie pelagiche come *Scomber scombrus*, *Thunnus alalunga*, *Thunnus thynnus*, *Auxis rochei* utilizzando gli isotopi stabili del carbonio e dell'azoto ($\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$). Lo studio preliminare ha avuto come scopo, evidenziare la fattibilità dell'utilizzo degli isotopi stabili combinati con i profili degli acidi grassi per la tracciabilità geografica dei campioni analizzati.

Infine durante il triennio vi è stato lo sviluppo e la messa a punto nel campo delle metodiche biomolecolari di tecniche *ad hoc* per indagare le sostituzioni di specie più frequenti; con particolare attenzione a tre grosse famiglie *Scombridae*, *Gadidae*-*Merlucciidae* e *Octopodidae*.

3. MATERIALI E METODI

3.1 PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Complessivamente sono stati raccolti 118 campioni congelati appartenenti a 13 specie ittiche diverse. I campioni utilizzati per questo studio sono stati raccolti in vari mercati italiani, ed attraverso l'identificazione morfologica si è proceduto ad identificarne la specie. L'identificazione morfologica di ciascuna specie è stata poi confermata con tecniche molecolari. Lo stato di congelamento non ha apportato nessun tipo di danno ai campioni, che sono così stati utilizzati sia per le analisi chimiche che genetiche. I campioni non avevano subito altro trattamento oltre al congelamento. Prima delle analisi molecolari i campioni sono stati identificati morfologicamente grazie all'ausilio della chiavi FAO utilizzando i punti di *repere*. Si è ritenuto opportuno compiere questo passaggio per confrontare la corrispondenza tra identificazione morfologica che tutt'oggi è riconosciuta legalmente, e quella molecolare (la metodica molecolare è stata accreditata nel 2016 presso il laboratorio di biologia molecolare dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie – CSI sezione di Adria).

Nella tabella 3.1 vengono indicate le specie campionate durante il progetto di ricerca.

Nome italiano	Nome latino	Nome italiano	Nome latino
Temolo	<i>Thymallus thymallus</i>	Sarago sparaglione	<i>Diplodus annularis</i>
Sgombro	<i>Scomber scombrus</i>	Triglia atlantica	<i>Pseudopeneus prayensis</i>
Nasello	<i>Merluccius merluccius</i>	Sardina	<i>Sardina pilchardus</i>
Gallinella o Cappone	<i>Trigla lucerna</i>	Alalunga	<i>Thunnus alalunga</i>
Agone	<i>Alosa fallax lacustris</i>	Pesce sciabola	<i>Lepidopus caudatus</i>
Tonno o Tonno rosso	<i>Thunnus thynnus</i>	Biso o Tombarello	<i>Auxis rochei</i>
Vairone	<i>Telestes muticellus</i>		

Tabella 3.1: specie campionate durante il progetto di ricerca

3.2 DENTIFICAZIONE MORFOLOGICA

Pesci interi, con la cute integra, non eviscerati e forniti di pinne e eventuali appendici cutanee, sono stati identificati applicando le chiavi di riconoscimento proposte dalla FAO e reperibili sul sito web (www.fao.org/fishery/species/search/en) che a sua volta rimanda a specifiche monografie riguardo quel gruppo tassonomico per esempio, per i pesci del Mar Mediterraneo la monografia di riferimento è stata: W. Fischer, M.L. Bauchot and M. Schneider (eds.) Fiches FAO d'identification pour les besoins de la pêche. (rev. 1). Méditerranée et mer Noire. Zone de pêche 37. Vol. II. Commission des Communautés Européennes and FAO, 1987, Rome.

Ogni campione dopo essere stato riconosciuto morfologicamente, è stato numerato, classificato e fotografato. Per ogni esemplare si è proceduto al prelievo di una porzione di tessuto muscolare che è stata fissata in etanolo assoluto. Tutti i campioni così preparati sono parte della banca di tessuti biologici del laboratorio e vengono conservati presso il laboratorio del CSI di Adria.

A titolo di esempio vengono mostrate le foto (figura 3.1 e figura 3.2) della classificazione di due specie che sono state oggetto di studio.

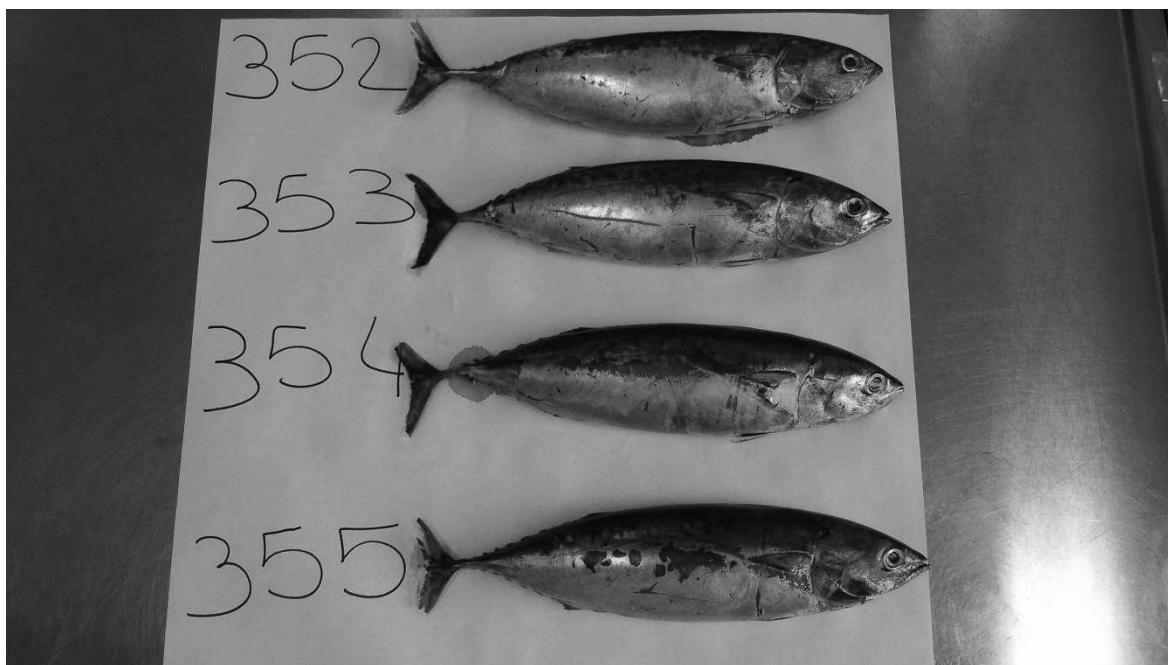


Figura 3.1: esemplari catalogati e fotografati di *Auxis rochei* (Biso o Tombarello)



Figura 3.2: esemplari catalogati e fotografati di *Diplodus annularis* (Sarago sparaglion)

3.3 ANALISI GENETICHE

Identificazione molecolare

Per l'identificazione certa dei campioni e per confermare il riconoscimento morfologico, ci si è basati sulla tecnica molecolare del *Barcoding* che, data la riconosciuta efficacia come tecnica per l'identificazione di specie^[47] è stata ritenuta il modo migliore per l'identificazione certa dei campioni a disposizione.

Estrazione del DNA

Per l'estrazione del DNA genomico totale sono stati prelevati 0,05 g di tessuto muscolare dalla carcassa. È stato utilizzato poi il kit di estrazione QIAamp[®] DNA mini kit (Qiagen). Questo kit si basa sulla separazione del DNA dal resto delle molecole presenti nel tessuto animale attraverso l'uso dell'etanolo che solubilizza il DNA dividendolo dalle altre molecole, e di colonnine contenenti una membrana di silice che lega il DNA sfruttando la sua parziale carica negativa e permettendo così, grazie all'uso dei buffer di lavaggio che contengono sali caotropici (sali di guanidio o sali di ioduro) e un pH adeguato, che

proteine, grassi, zuccheri e tutto ciò che può inquinare il DNA venga eliminato in quanto non si lega alla membrana.^[48]

La procedura per l'estrazione è basata sulle prescrizioni della ditta fornitrice.

Il tessuto deve essere incubato overnight a 56°C con 180 µL di buffer ATL e 20 µL di proteinasi K che disgrega i tessuti digerendo le proteine. Successivamente devono essere aggiunti 200 µL di buffer AL (buffer di lisi). I campioni così trattati devono essere incubati a 70°C per 10 minuti affinché la lisi dei tessuti sia completa. Una volta digeriti i tessuti si procede all'estrazione del DNA che viene separato dalle altre molecole grazie all'aggiunta di 200 µL di etanolo assoluto.

Il tutto poi viene trasferito in colonnina fornita dal kit. A questo punto il DNA si lega alla membrana e l'eluato contenente proteine, grassi e zuccheri viene fatto fluire in un apposito tubo di raccolta grazie alla centrifugazione a 10.000 rpm per 1 minuto. Eventuali contaminazioni da macromolecole residue vengono eliminate attraverso due lavaggi con 500 µL di Washing buffer diversi che permettono la purificazione del DNA legato.

Una volta completato il lavaggio, il DNA viene eluito con 50 µL di AE buffer.

Quantificazione del DNA

Si è ritenuto opportuno cercare di utilizzare una concentrazione standard di DNA per tutti i campioni analizzati. E' importante sottolineare che sia la qualità dell'estratto sia la quantità influiscono sulla riproducibilità delle analisi.

Pertanto dopo l'estrazione dei vari campioni, si è proceduto alla quantificazione di ciascuno di essi misurando la densità ottica (OD) con lo spettrofotometro NanoDrop (ThermoScientific) che consente una quantificazione ultrasensibile ed estremamente riproducibile del DNA. Questo metodo possiede numerosi vantaggi: minimo consumo di DNA e riduzione della variabilità. Per la quantificazione del *dsDNA* (*double strand DNA*) lo strumento analizza il campione ad una lunghezza d'onda di 260nm; il campione viene quantificato in ng/µL e l'intervallo considerato è compreso tra i 20-80 ng/µL. Per capire il grado di purezza del campione lo strumento utilizza nell'analisi il rapporto delle assorbanze 260nm/280nm, in quanto le proteine vengono rilevate ad una lunghezza d'onda di 280nm e sono la componente che in un campione abbassa il grado di purezza dell'estratto. Il valore riscontrato deve rientrare in un *range* tra 1,61-2,01. Se il valore è inferiore a 1,61 la purezza è ridotta, in quanto rivela un'elevata concentrazione proteica, al contrario se il valore riscontrato è superiore a 2,01, il campione ha un'elevata

concentrazione di RNA e quindi, anche in questa situazione, il grado di purezza del DNA diminuisce. Tutti i campioni analizzati sono rientrati nel range compreso tra i 20-80 ng/ μ L e con un grado di purezza medio di 1.85.

Amplificazione del gene Citocromo Ossidasi I

La tecnica di PCR (Polymerase Chain Reaction) viene utilizzata per ricostruire *in vitro* il fenomeno di replicazione del DNA, i reagenti utilizzati vengono riportati in tabella 3.2

Mix PCR per amplificazione del gene mitocondriale COI (Citocromo Ossidasi I)			
Reagente	Concentrazione iniziale	Concentrazione finale	Volume X1 (μL)
Acqua MGB			31,75
Buffer	10X	1X	5
MgCl ₂	50mM	2,5mM	2,5
dNTPs mix	10mM	1mM	5
Primer: COIfishF1	100 μ M	0,5 μ M	0,25
Primer: COIfishR1	100 μ M	0,5 μ M	0,25
Taq polimerase	5U/ μ L	0,025U/ μ L	0,25
VOLUME TOTALE MIX			45
VOLUME DI DNA			5
VOLUME TOTALE DI REAZIONE			50

Tabella 3.2: mix di PCR per l'amplificazione del gene Citocromo ossidasi subunità I.

Nel presente studio sono stati utilizzati i *primers* COIfishF1 e COIfishR1, presenti in letteratura ^[49] e riportati in tabella 3.3 che amplificano una regione di circa 650pb del gene codificante per il Citocromo Ossidasi I (COI o COX1).

Primer utilizzati per l'amplificazione del gene mitocondriale COI (Citocromo Ossidasi I)		
Nome dei primer	Sequenza	Tm
COIfishF1	5'-TCAACYAATCAYAAAGATATYGGCAC-3' (26)	59,3°C
COIfishR1	3'-ACTTCYGGGTGRCCRAARAATCA-5' (23)	60,6°C

Tabella 3.3: caratteristiche dei *primers* per l'amplificazione del gene Citocromo Ossidasi subunità I.

Una volta preparata la mix e aggiunto il DNA genomico totale estratto dai singoli esemplari, i campioni vengono inseriti nel termociclatore GeneAmp[®] PCR System 9700 thermocycler (AppliedBiosystem).

La reazione di PCR avviene in 35 cicli, ognuno dei quali caratterizzato dalle seguenti fasi indicate nella tabella 3.4

Profilo termico PCR per amplificazione del gene mitocondriale COI (Citocromo Ossidasi I)			
N° di cicli	Fase	Temperatura	Tempo
1	Attivazione polimerasi	94°C	30 secondi
35	Denaturazione	94°C	30 secondi
	Annealing	52°C	30 secondi
	Estensione	72°C	1 minuto
1	Estensione finale	72°C	10 minuti
1	Refrigerazione	4°C	infinito

Tabella 3.4: profilo termico utilizzato per l'amplificazione del gene Citocromo Ossidasi subunità I.

Sequenziamento dei prodotti di PCR

Una volta amplificato il tratto di interesse e verificata l'avvenuta amplificazione tramite una elettroforesi in gel di agarosio 1% colorato grazie al bromuro d'etidio a 4 Volt/cm (distanza anodo/catodo) per 35 minuti, i campioni sottoposti a reazione di PCR vengono inviati nel laboratorio di biologia molecolare dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie a Legnaro per il sequenziamento, cioè l'ottenimento della sequenza di basi nucleotidiche che compone il DNA che è stato amplificato precedentemente. Qui il prodotto di amplificazione ottenuto viene quantificato e purificato per poter essere sottoposto alla reazione di sequenziamento con il metodo Sanger. La purificazione si ottiene tramite l'uso del kit commerciale "ExoSap-IT" (USB) seguendo le indicazioni del fornitore. Nel caso di prodotti di PCR contenenti bande multiple e aspecifiche, si procede con l'estrazione della banda della lunghezza attesa tramite l'uso del kit "Qiaquick Gel Extraction" (Qiagen) e la sua successiva quantificazione. L'amplificato purificato viene quindi sottoposto a reazione di sequenziamento utilizzando entrambi i *primers* di amplificazione, ottenendo così due sequenze complementari, cioè il filamento *leading* (5'→3') e il filamento *lagging* (3'→5'), che sono i due filamenti che compongono la doppia elica di DNA. La preparazione della mix per la reazione di sequenziamento avviene utilizzando il kit "BigDye Terminatorv3.1 CycleSequencing" (AppliedBiosystems). La mix ottenuta viene sottoposta ad una reazione di PCR e il prodotto di amplificazione della reazione di sequenza viene successivamente purificato per la rimozione dei reagenti in eccesso. A seconda del numero di amplificati da sequenziare si utilizzano due diversi kit commerciali: "AutoSeq G-50 Dye Terminator Removal" (GE-Healthcare) nel caso di un

numero limitato di amplificati, “Performa[®]DTR Ultra 96-Well Plates” (EdgeBiosystem) nel caso di un numero elevato di amplificati da analizzare. I campioni così ottenuti vengono caricati nel sequenziatore (ABI Prism 3130xl Genetic Analyzer – AppliedBiosystems) per l’elettroforesi capillare. Le sequenze ottenute vengono analizzate con i software Sequencing Analysis 5.2 e SeqScape v.2.5 seguendo le specifiche del fornitore.

Analisi bioinformatiche delle sequenze ottenute

L’attribuzione di specie ai campioni è avvenuta grazie all’analisi di sequenza nucleotidica mediante 2 software online dedicati, GenBank[®] e BOLD. Il primo è un database che contiene tutte le sequenze nucleotidiche sequenziate in tutti i laboratori del mondo di qualsiasi specie di essere vivente, mentre BOLD è un database che raccoglie le sequenze dei geni preposti all’analisi di *Barcoding* (COI) di moltissime specie di animali, piante e funghi studiate in tutto il mondo.

BLAST

BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) è uno strumento bioinformatico che si basa su di un algoritmo che serve ad allineare sequenze di DNA, cDNA e proteine con altre presenti nei database di sequenze pubblici GenBank e BOLD. Generalmente è usato per allineamenti locali tra sequenze nucleotidiche o amminoacidiche ignote dette *query*, con altre della stessa natura.^[50]

L’algoritmo che sta alla base fornisce al termine dell’analisi una percentuale di identità alle sequenze identificate come le più simili alla *query* presenti nel database. Da questo si identifica a che specie appartiene l’organismo dal quale si ricava la sequenza *query*. Tuttavia questo meccanismo non è così automatico in tutti i casi: infatti nelle specie poco studiate e di cui non sono depositate un gran numero di sequenze sia per quanto riguarda GenBank[®] che per quanto riguarda BOLD, spesso non si riesce a definire con decisione la specie ma solo il genere o in alcuni casi la famiglia. La differenza sostanziale tra BOLD e GenBank[®] sta nell’attendibilità del risultato di ricerca ottenuto. Infatti le sequenze inserite in BOLD vengono certificate in base al riconoscimento morfologico mentre le sequenze inserite in GenBank[®] subiscono una semplice valutazione di qualità.

GenBank®

GenBank® è un database di sequenze nucleotidiche. Questo database fa parte dell'International Nucleotide Sequence Database Collaboration, che comprende il DNA DataBank of Japan (DDBJ), e l'European Molecular Biology Laboratory (EMBL). Queste tre organizzazioni hanno un continuo flusso di dati tra di loro da tutto il mondo permettendo a chi utilizza queste piattaforme di avere a disposizione dati aggiornati.

BOLD

BOLD (*Barcode of Life Data System*) è un database a libero accesso preposto al deposito, all'analisi e alla pubblicazione di risultati di analisi di *Barcoding*. Mettendo insieme dati molecolari, morfologici e di distribuzione delle varie specie colma una lacuna della bioinformatica^[51], creando un database dedicato e specifico diversamente da GenBank® in cui invece viene depositata qualsiasi tipo di sequenza.

MEGA

Le sequenze con identità confermate dai software BOLD e BLAST sono state utilizzate per creare ulteriori allineamenti genetici con il programma MEGA 6.^[52]

Questi allineamenti vengono conservati di riferimento per il laboratorio come sequenze certe e con possibilità di confronto con sequenze di campioni la cui identità sia incognita.

Il *software* MEGA 6 utilizzato per gli allineamenti è un programma che sfrutta l'algoritmo *ClustalW*^[53] una matrice di sostituzione IUB (secondo la quale ogni identità fornisce un punteggio pari a 1.9, mentre ogni *mismatch* fornisce un punteggio pari a 0, unitamente alle seguenti penalità a carico dei gap:

- a) Per allineamento a coppie:
 - penalità associata all'apertura di un gap: 50
 - penalità associata all'estensione di un gap: 6,66
- b) Per allineamento multiplo:
 - penalità associata all'apertura di un gap: 15
 - penalità associata all'estensione di un gap: 6,66

3.5 ANALISI PER DETERMINAZIONE DEL PROFILO IN ACIDI GRASSI

Determinazione della frazione lipidica

I campioni sono stati in una prima fase tagliati in piccoli pezzi e essiccati in stufa a 60 ° C, fino a peso costante. L'umidità è stata determinata in % w/w.

Successivamente si esegue, con il metodo Soxhlet, un'estrazione ponderale del grasso dal campione (circa 3g di campione essiccato) con etere etilico in un apparecchio distillatore (VELP SCIENTIFICA, Usmate, Milano). Per l'estrazione vengono utilizzati 50 ml di etere etilico. Il processo si compone di tre fasi: 30 minuti in immersione in solvente, 30 minuti con reflusso a ricadere, 10 minuti di recupero del solvente. Al termine, dopo raffreddamento a temperatura ambiente, si pesa l'estratto ottenuto.

Determinazione del profilo degli acidi grassi mediante GC-MS

Successivamente alla determinazione quantitativa della frazione lipidica si procede con la caratterizzazione degli acidi grassi presenti nel campione, ovvero un'analisi qualitativa.

Il contenuto lipidico estratto con metodo Soxhlet viene recuperato con 3 mL di esano e messo in una provetta. Viene poi aggiunto 1,5 mL di metanolo con idrossido di sodio 5% che consente la transesterificazione degli acidi grassi cioè idrolizza gli acidi grassi dalla molecola di glicerolo, causando quindi la rottura del legame estere tra la molecola di glicerolo e gli acidi grassi con formazione di un nuovo legame estere tra il gruppo metilico e gli acidi grassi. Il tutto viene agitato per qualche minuto e dopo che si è verificata la separazione di fase, si preleva quella superiore contenente gli acidi grassi metilati che viene trasferita in un'apposita vial per GC, per essere analizzata.

Lo strumento utilizzato è un Gascromatografo VARIAN 3900 con iniettore split-splitless e rivelatore spettrometro di massa VARIAN 2100 ad impatto elettronico che consente di effettuare l'analisi in tempo reale dei singoli picchi in uscita dalla colonna, permettendo una determinazione quali-quantitativa mediante il confronto dello spettro registrato con spettri memorizzati in libreria. Le condizioni sperimentali sono:

- colonna capillare Zebron ZB-WAX Phenomenex (60 m x 0,25 mm), fase stazionaria polare di polietilenglicole (0,25 µm), temperatura massima 200°C;
- iniettore automatico split-splitless, temperatura massima 260°C;
- gas vettore: elio, pressione di ingresso 10 psi;
- rivelatore spettrometro di massa a trappola ionica con sorgente ad impatto elettronico, temperatura massima 200°C.

Per la determinazione del profilo degli acidi grassi è stato impostato il metodo “WAX LIPIDI” con le seguenti condizioni sperimentali:

- temperatura iniettore 250°C, modalità split, rapporto splittaggio 1:20, quantità di campione iniettata in colonna 1 µl;
- temperatura iniziale 100°C mantenuta per 2 minuti;
- aumento della temperatura di 10°C al minuto fino a 200°C e poi isoterma per 108 minuti;
- solvent delay: 3 minuti;
- modalità di acquisizione: scan;
- durata totale della corsa 120 minuti.

Lo strumento fornisce un cromatogramma in cui sono presenti i picchi corrispondenti agli esteri metilici degli acidi grassi presenti nel campione. Attraverso l'area sottesa ai picchi è possibile eseguire la quantificazione degli acidi grassi, mentre l'identificazione avviene attraverso il confronto dello spettro di massa con gli spettri forniti dalla libreria NIST dello strumento.

Analisi statistica

Per l'elaborazione statistica dei dati è stato utilizzato SPSS® 15.0 per Windows®.

3.4 ANALISI DEGLI ISOTOPI STABILI

I campioni analizzati per questa analisi sono sempre porzioni di tessuto muscolare di pesce congelato. Le specie analizzate in questo studio preliminare sono specie appartenenti alla famiglia Scombridae ovvero *Thunnus alalunga* (Alalunga), *Thunnus thynnus* (Tonno rosso), *Scomber scombrus* (Sgombro) e *Auxis rochei* (Biso o Tombarello). I campioni hanno subito un primo processo di liofilizzazione e successivamente 0.2 mg di liofilizzato è stato utilizzato per l'analisi del $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ e del rapporto C/N.

I valori degli isotopi stabili ed il rapporto del C/N sono stati determinati attraverso l'utilizzo di uno spettrometro di massa per analisi isotopica (DELTAplus, ThermoFinnigan) accoppiato con un analizzatore CHN (Thermo Scientific Flash 2000). La precisione analitica delle varie misurazioni è stata dello 0,2%. Il saccarosio e l'acido glutammico IAEACH6 sono stati utilizzati come materiali di riferimento certificati o standard.

Il rapporto degli isotopi stabili è stato espresso come delta (δ), dove delta deriva dalla seguente formula:

$$\delta = [(R_{\text{campione}}/R_{\text{standard}}) - 1] \times 10^3$$

dove δ è il rapporto isotopico del campione rispetto allo standard (standard internazionale di Vienna Pee Dee Belemnite per C e azoto atmosferico per N). R_{campione} e R_{standard} sono la frazioni pesante di isotopi leggeri nel campione e nello standard, rispettivamente.

Uno viene sottratto dalla frazione $R_{\text{campione}}/R_{\text{standard}}$ in modo che i campioni con un rapporto inferiore di isotopi pesanti rispetto allo standard abbiano un valore negativo e quelli con elevati rapporti di isotopi pesanti rispetto allo standard abbiano un valore positivo. Questo numero viene poi moltiplicato per 1000 in modo che la notazione δ è espressa in unità di parti per mille (‰).

Il software di STATISTICA (ver 6.0, StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) è stato utilizzato per l'elaborazione statistica. Il grado di correlazione tra variabili è stato analizzato mediante correlazione di Pearson (r^2), se non diversamente indicato.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Studio della variabilità genetica dei campioni

I 118 campioni raccolti nella prima parte del progetto di ricerca ed appartenenti alle 13 specie indicate in tabella 3.1 sono stati analizzati attraverso la tecnica di *Barcoding* descritta al punto 3.3. Le sequenze si riferiscono tutte al gene target del Citocromo Ossidasi I (COI o COXI).

Al termine delle fasi di estrazione, d'amplificazione e di sequenziamento sono state raccolte 118 sequenze; a titolo di esempio viene indicata in figura 4.1, la sequenza di un campione di *Diplodus annularis* (Sarago sparaglione).

```
Diplodus annularis

Sequenza 1 di 10
Successivo

Origine:
Primer Forward: COIFISHF1 (5' TCAACYAATCAYAAAGATATYGGCAC 3')
Primer Reverse: COIFISHR1 (5' ACTTCYGGGTGRCCRAARAATCA 3')

Sequenza:
>222
CACCTATATCTTGATTTGGTGCCTGGGCCGGAATAGTAGGAAGTCCCTAAGCCTGCTCATTGAGCTGAACTAAGCC
AGCCTGGCGCTCCTTGGAGACGACCAGATTTATAATGTAATTGTTACAGCACATGCATTTGTAATAATTTCTTTATA
GTAATACCAATCATGATTGGAGGCTTTGGAACTGATTAATCCCCTTATGATCGGTGCCCGGATATAGCATTCCCCCG
AATAAATAATATGAGCTTCTGATTACTCCCCCATCGTTCTTCTCCTGCTAGCTTCTCCGGAGTTGAAGCTGGGGCTG
GGACCGGGTGAACAGTTTACCCGCTCTGGCAGGAAACCTTGCCACGCAGGTGCATCAGTTGACTTAACCATTTTCTCC
CTCCACCTAGCCGGGATCTCATCTATTCTTGGTGCTATTAACCTCATCACCACAATTATTAACATGAAACCTCCCGCTAT
TTCGCAATATCAAACACCGCTATTTGTATGAGCTGTCCTAATTACTGCCGTTCTACTTCTTCTATCTCTCCAGTCCTTG
CCGACGGCATTACAATACTCCTAACAGATCGAAACCTAAACACCACTTTCTTCGACCCAGCAGGAGGGGGAGACCCAATT
CTCTACCAACATCTATTT
```

Figura 4.1: sequenza in formato FASTA di un campione di

Diplodus annularis (Sarago sparaglione).

Di ogni sequenza ottenuta è stata verificata la corretta identità attraverso l'utilizzo dei database GenBank® (BLAST) e BOLD.

Vengono riportati due esempi in figura 4.2 e 4.3 con la conferma dell'identità per la sequenza, indicata in figura 4.1. In entrambi i casi l'identità di *Diplodus annularis* viene confermata con una similarità del 100% e in BLAST viene anche indicata una copertura di sequenza pari al 99%.

Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Diplodus annularis voucher DANN7 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	1210	1210	99%	0.0	100%	KJ012338.1
<input type="checkbox"/> Diplodus annularis voucher DiAn13C cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	1203	1203	99%	0.0	99%	KM538335.1
<input type="checkbox"/> Diplodus annularis voucher DiAn13J cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	1203	1203	99%	0.0	99%	KM538334.1
<input type="checkbox"/> Diplodus annularis voucher DiAn13G cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	1203	1203	99%	0.0	99%	KM538331.1
<input type="checkbox"/> Diplodus annularis voucher DiAn13B cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	1203	1203	99%	0.0	99%	KM538329.1
<input type="checkbox"/> Diplodus annularis voucher DiAn13A cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	1203	1203	99%	0.0	99%	KM538327.1
<input type="checkbox"/> Diplodus annularis voucher DANN1 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	1199	1199	98%	0.0	100%	KJ012339.1
<input type="checkbox"/> Diplodus annularis voucher DiAn13L cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	1197	1197	99%	0.0	99%	KM538336.1
<input type="checkbox"/> Diplodus annularis voucher DiAn13I cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	1197	1197	99%	0.0	99%	KM538333.1
<input type="checkbox"/> Diplodus annularis voucher DiAn13H cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	1197	1197	99%	0.0	99%	KM538332.1
<input type="checkbox"/> Diplodus annularis voucher DiAn13M cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	1197	1197	99%	0.0	99%	KM538330.1
<input type="checkbox"/> Diplodus annularis voucher DiAn13D cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	1197	1197	99%	0.0	99%	KM538328.1
<input type="checkbox"/> Diplodus annularis voucher DANN4 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	1188	1188	98%	0.0	99%	KJ012337.1

Figura 4.2: analisi della sequenza di *Diplodus annularis* tramite il database GenBank® (BLAST)

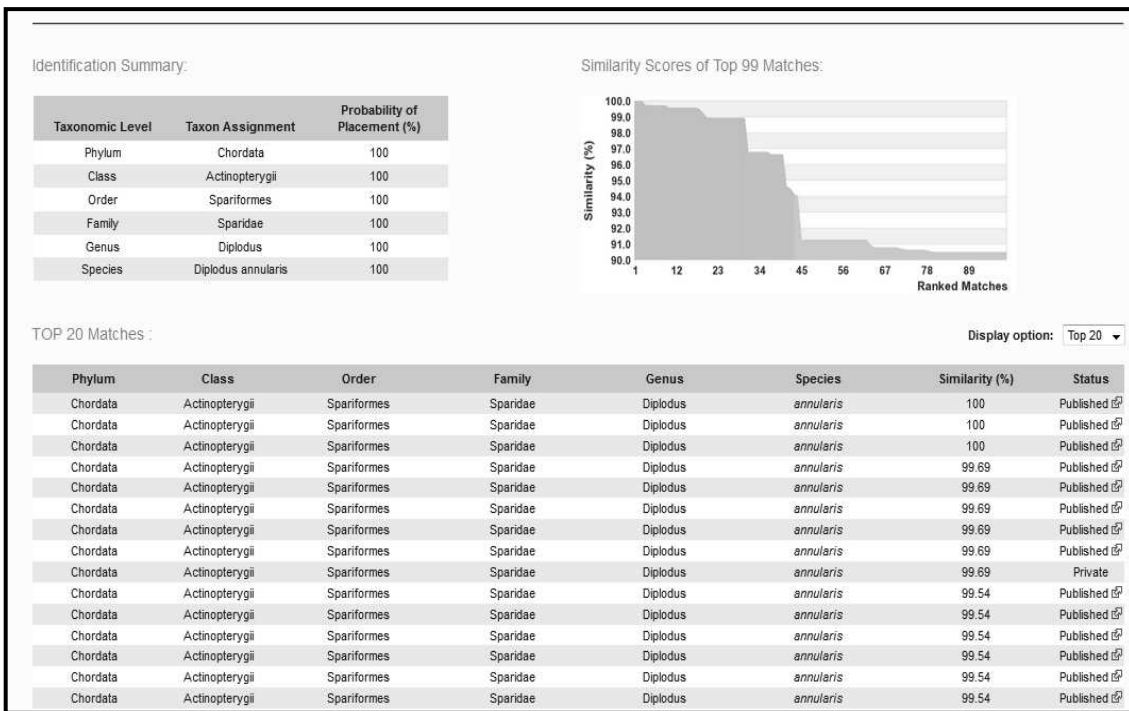


Figura 4.3: analisi della sequenza di *Diplodus annularis* tramite il database BOLD

Per tutti i campioni analizzati vi è stata una corretta identificazione genetica che ha confermato l'identificazione morfologica effettuata a monte. (Punto 3.2)

Sono stati creati successivamente degli allineamenti genetici attraverso il programma MEGA 6 per ogni specie (figura 4.4). In seguito alla creazione degli allineamenti si è ulteriormente controllato la bontà delle sequenze andando ad osservare che l'amplificazione di tutti i campioni fosse pulita e le sequenze ottenute non avessero errori o salti nucleotidici al loro interno. Le sequenze ritenute perciò ottimali sono state successivamente inserite nel database informatico Ittiobase.

Viene riportato in figura 4.4 un esempio di allineamento genetico ottenuto con il programma MEGA 6 della specie *Diplodus annularis* (Sarago sparaglione).

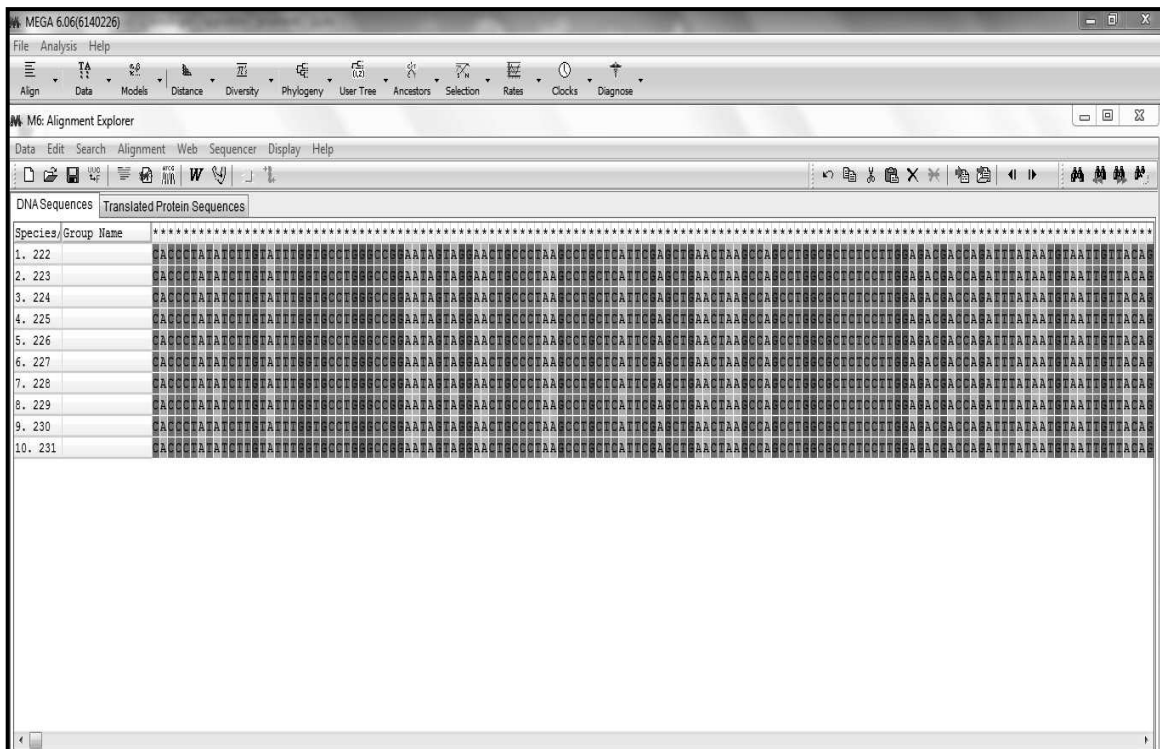


Figura 4.4: allineamento genetico ottenuto con il programma MEGA 6 della specie *Diplodus annularis* (Sarago sparaglione).

Infine per ogni specie analizzata grazie sempre al software MEGA 6 è stato possibile calcolare una variabilità genetica dei campioni analizzati in riferimento al gene target utilizzato nello studio; ovviamente perché il dato possa essere confermato dovranno essere in futuro aumentati il numero dei campioni analizzati per singola specie; ma già ad una prima visione d'insieme (figura 4.5) possiamo notare come la variabilità interspecifica possa variare notevolmente. Si osserva un *range* che varia dallo 0% della variabilità genetica del Tonno rosso (*Thunnus thynnus*) allo 0,9% della variabilità nella specie *Sardina pilchardus* (Sardina). L'assenza di variabilità del Tonno è stata anche documentata nel lavoro di Cadrin et al.^[54] che ipotizzano vi sia una relazione del tasso evolutivo più basso in talune specie rispetto ad altre anche in funzione dell'ambiente, della capacità migratoria e della riproduzione della specie. In figura 4.5 viene raffigurato il grafico della variabilità genetica nelle diverse specie analizzate durante il progetto.

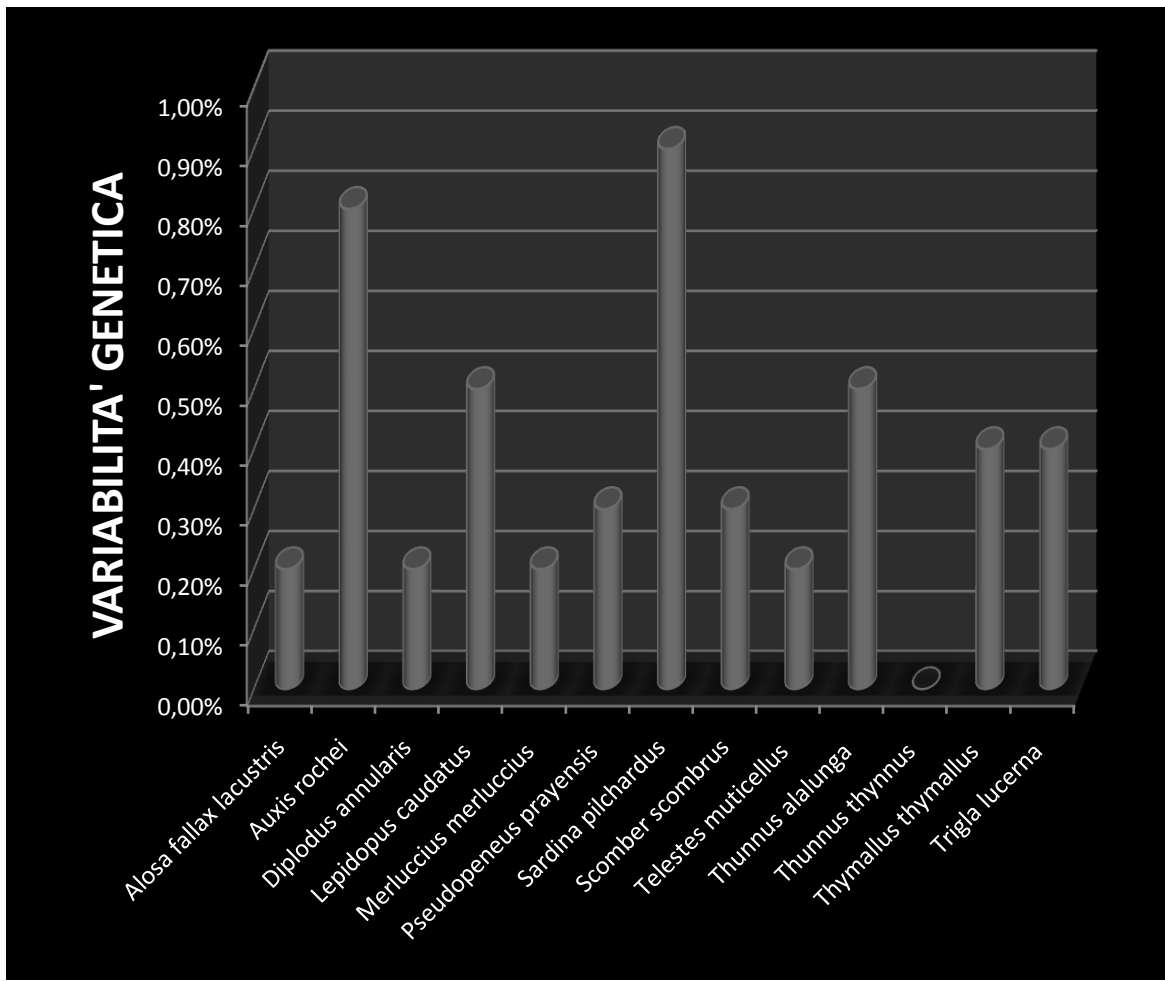


Figura 4.5: grafico della variabilità genetica nelle diverse specie analizzate durante il progetto di ricerca.

4.2 Studio dei profili lipidici delle specie ittiche

In combinazione con le analisi genetiche i campioni raccolti durante la prima parte del progetto sono stati analizzati mediante gascromatografia per la caratterizzazione della frazione lipidica isolata dal tessuto muscolare delle diverse specie. Vengono perciò riportati per ogni specie i diversi cromatogrammi, a titolo di esempio e per maggior chiarezza, viene riportata in figura 4.6 uno spettro di massa. L'identificazione dei singoli piccoli è avvenuta mediante confronto degli spettri di massa con quelli indicati nella libreria NIST dello strumento. Per un ulteriore chiarimento vengono riportate in tabella 4.1 le diverse denominazione degli acidi grassi studiati ed il tempo di ritenzione espresso in minuti.

NOME	TEMPO RITENZIONE (minuti)
C 14= MIRISTICO	15,56
C16= PALMITICO	19,72
C16:1= PALMITOLEICO	20,52
C18=STEARICO	26,80
C18:1=OLEICO	27,88
C18:1n7^[46,47] definito acido (Z)-11-octadecenoico	28,23
C18:2=LINOLEICO	30,40
C18:3= LINOLENICO	34,55
C20=ARACHICO	39,70
C20:1n9= GONDOICO	41,53
C20:5=EPA (EICOSAPENTAENOICO)	60,96
C22:6=DHA (DOCOSAPENTAENOICO)	111,37

Tabella 4.1: didascalia per gli acidi grassi: nome e tempo di ritenzione

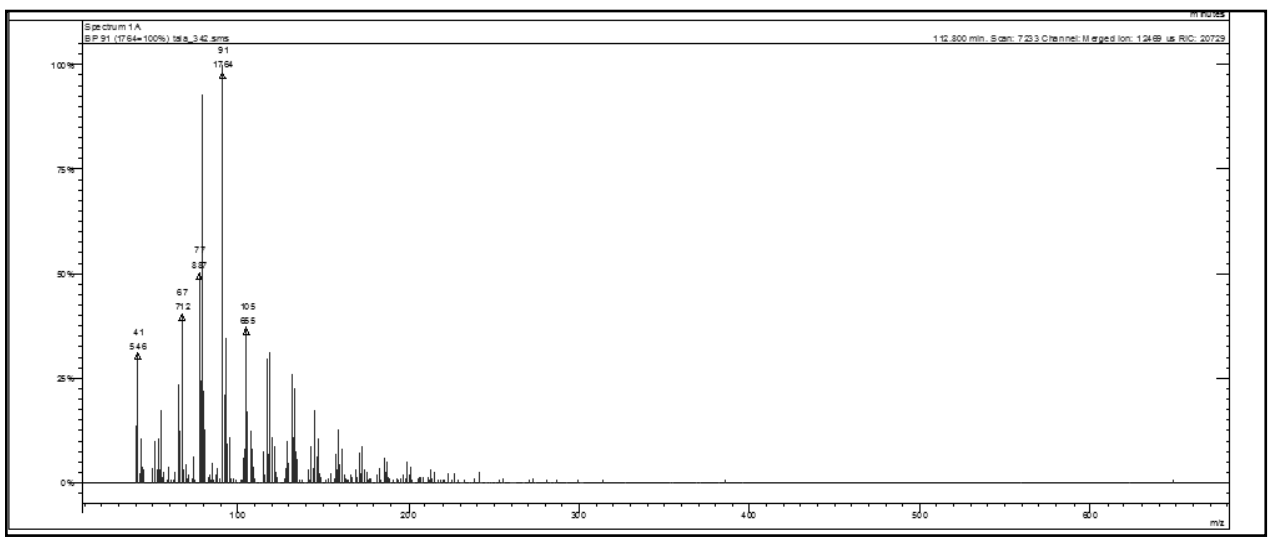
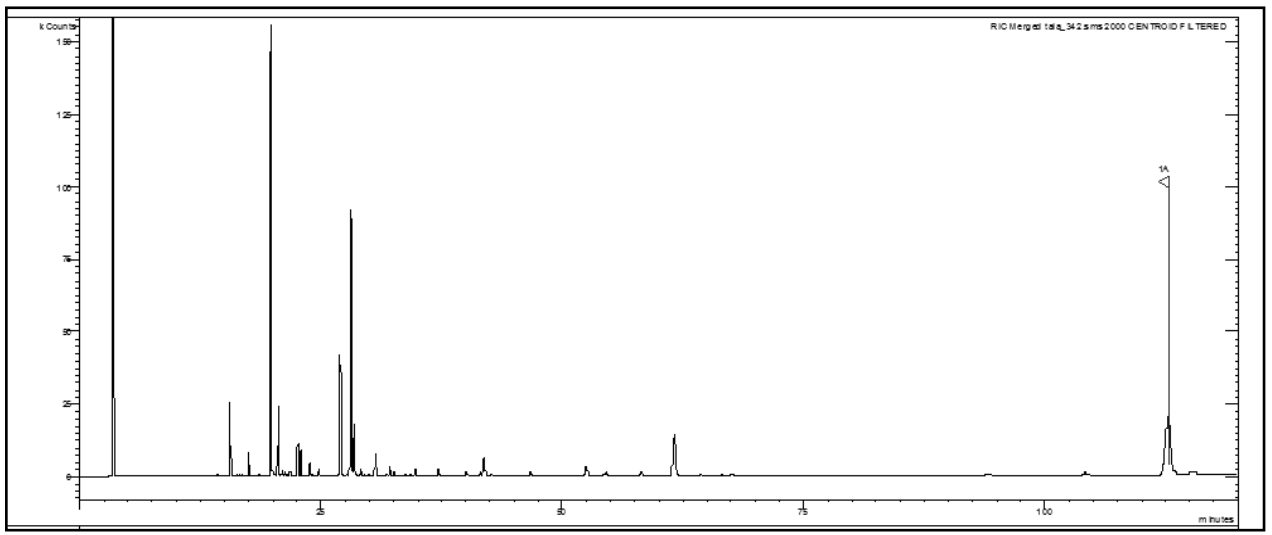


Figura 4.6: esempio di spettro di massa del picco relativo all'acido C22:6 (DHA)

Sgombro (*Scomber scombrus*)

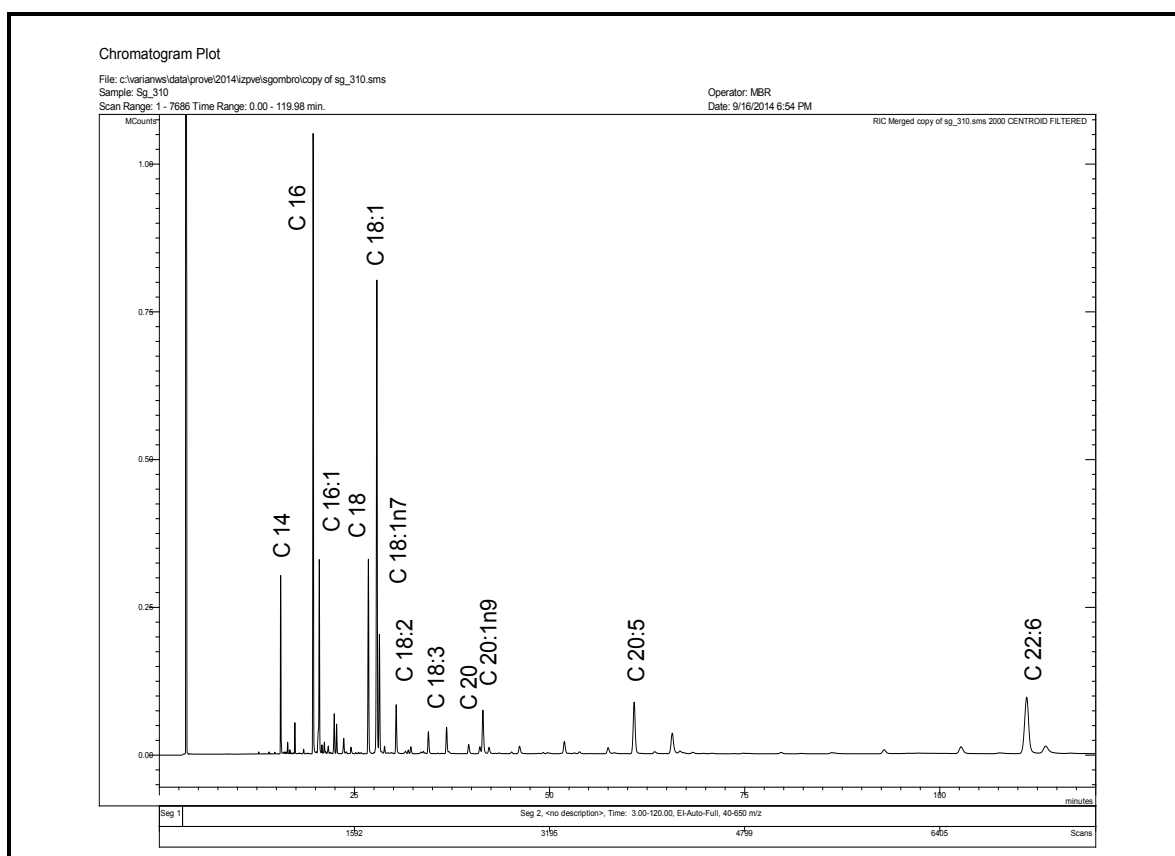


Figura 4.7: profilo lipidico ottenuto mediante GC-MS di Sgombro (*Scomber scombrus*)

La prima specie analizzata è lo Sgombro, come già evidenziato nel cromatogramma di figura 4.7 si evidenziano una buona concentrazione di acidi grassi insaturi rappresentati dall'acido oleico, EPA e DHA; acido miristico e palmitico sono i più rappresentati tra gli acidi grassi saturi. Per lo Sgombro l'informazione estrapolata dai dati ed utilizzata per Ittiobase è stata: la componente nutrizionale in riferimento agli acidi grassi (valore medio) è acidi grassi saturi: 33%; acidi grassi insaturi 67%; tra gli acidi grassi polinsaturi troviamo una percentuale pari al 24% di omega-3 e 3% di omega-6

In tabella 4.2 vengono riportati i valori medi (%) degli acidi grassi sia saturi che insaturi presenti in *Scomber scombrus*.

ACIDO GRASSO	VALORE MEDIO (%)
Miristico	5,63
Palmitico	19,85
Palmitoleico	9,27
Stearico	6,59
Oleico	22,41
acido (Z)-11-octadecenoico	5,80
Linoleico	2,59
Linolenico	1,54
Arachico	0,60
Gondoico	2,75
EPA	7,08
DHA	15,89
% saturi	33
% insaturi	67,33

Tabella 4.2: ripartizione percentuale degli acidi grassi identificati nell'estratto lipidico ottenuto mediante Soxhlet da *Scomber scombrus*. Valori espressi in %. (CV% \leq 2)

Alalunga (*Thunnus alalunga*)

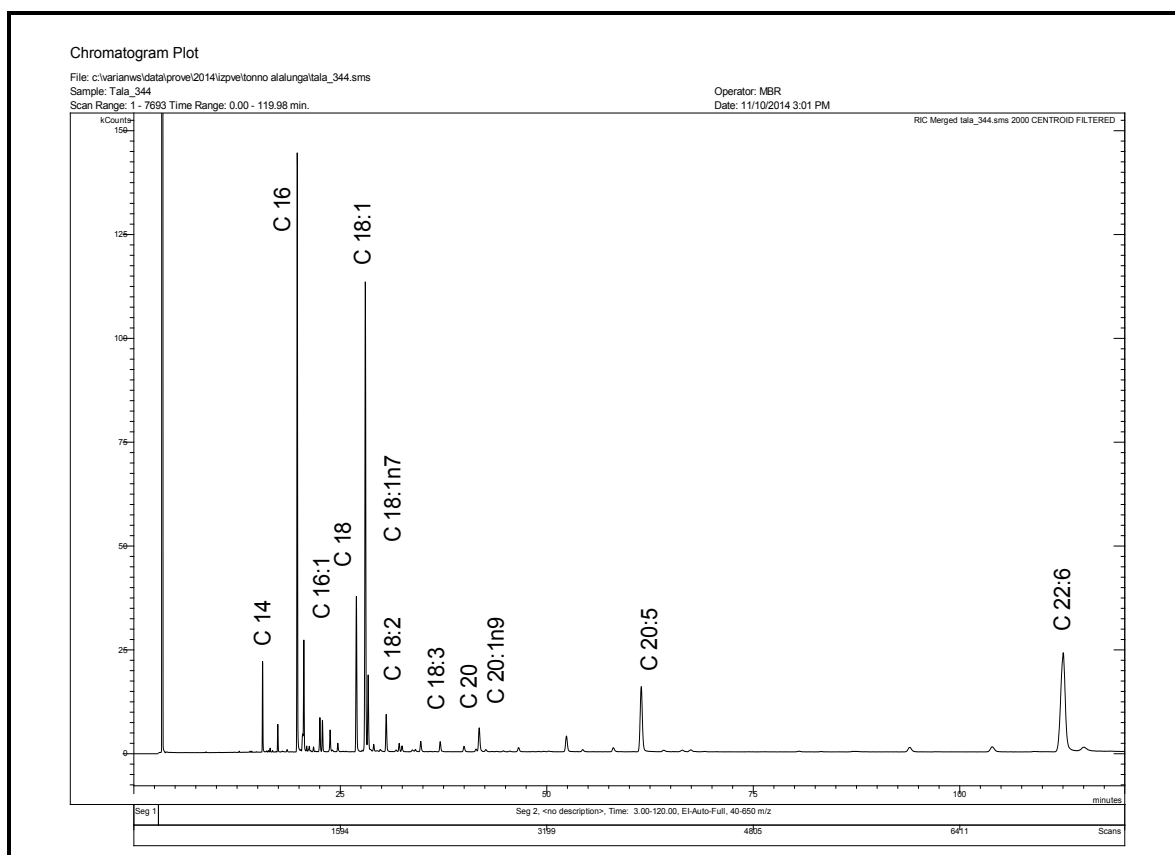


Figura 4.8: profilo lipidico ottenuto mediante GC-MS di Alalunga (*Thunnus alalunga*)

Dall'analisi dell'Alalunga (cromatogramma di figura 4.8) si evidenzia una buona concentrazione di acidi grassi insaturi in particolare si evidenzia l'alto contenuto di DHA; mentre acido miristico, acido palmitico e acido stearico sono i più rappresentati tra gli acidi grassi saturi. Per l'Alalunga l'informazione inserita in Ittiobase è stata: la componente nutrizionale in riferimento agli acidi grassi (valore medio) è acidi grassi saturi: 37%; acidi grassi insaturi 63%; tra gli acidi grassi polinsaturi troviamo una percentuale pari al 27% di omega-3 e 2% di omega-6

In tabella 4.3 vengono riportati i valori medi (%) degli acidi grassi sia saturi che insaturi presenti in *Thunnus alalunga*.

ACIDO GRASSO	VALORE MEDIO (%)
Miristico	3,22
Palmitico	24,04
Palmitoleico	4,65
Stearico	8,85
Oleico	23,30
acido (Z)-11-octadecenoico	3,95
Linoleico	1,75
Linolenico	0,61
Arachico	0,48
Gondoico	2,38
EPA	6,99
DHA	19,79
% saturi	37
% insaturi	63,42

Tabella 4.3: ripartizione percentuale degli acidi grassi identificati nell'estratto lipidico ottenuto mediante Soxhlet da *Thunnus alalunga*. Valori espressi in %. (CV% \leq 2)

Agone (*Alosa fallax lacustris*)

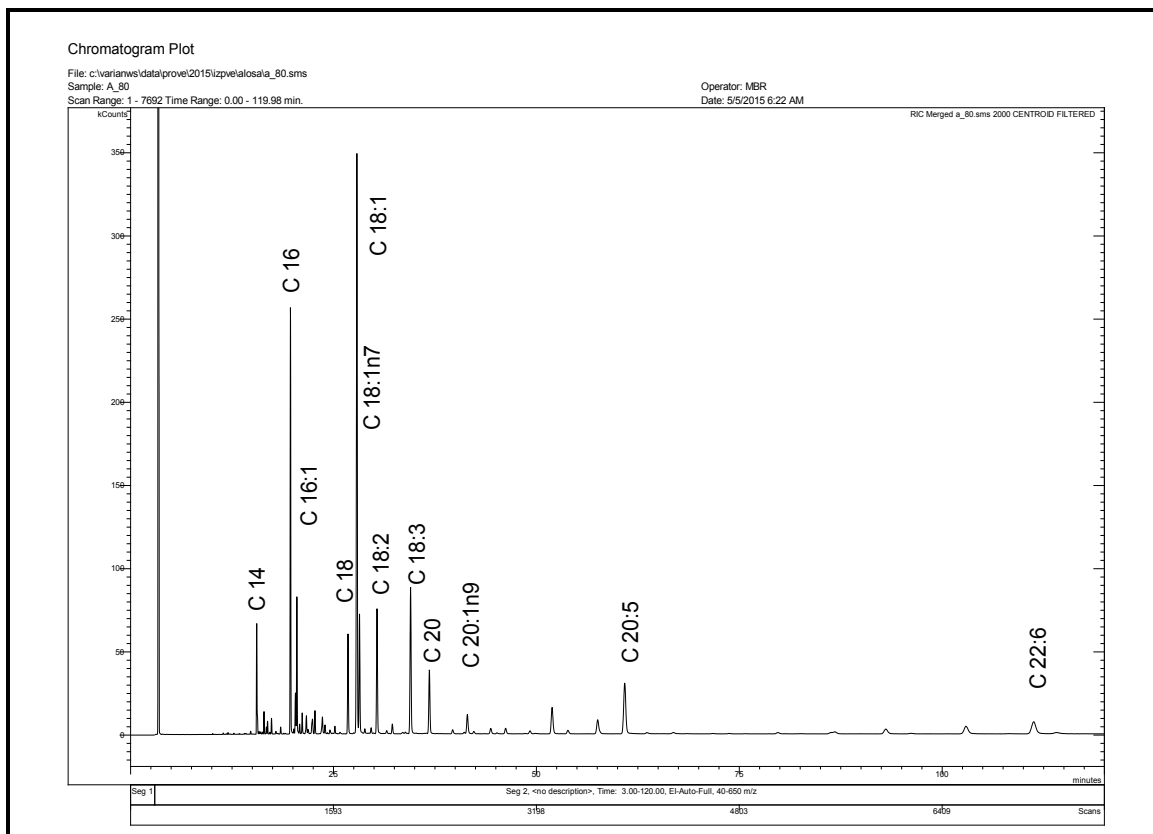


Figura 4.9: profilo lipidico ottenuto mediante GC-MS di Agone (*Alosa fallax lacustris*)

Tra i campioni analizzati vi erano specie non solo marine ma anche d'acqua dolce tra cui l'Agone. Il cromatogramma di figura 4.9 evidenzia una buona concentrazione di acidi grassi insaturi rispetto agli acidi grassi saturi, da notare (vedi tabella 4.4) che essendo un pesce d'acqua dolce ci si sarebbe aspettato un valore di acidi grassi insaturi lievemente inferiore rispetto alle altre specie come lo Sgombro o l'Alalunga; al contrario gli acidi grassi insaturi sono piuttosto alti a dimostrazione come le specie di lago debbano essere valorizzate maggiormente all'interno della dieta umana. Per l'Agone l'informazione estrapolata dai dati ed utilizzata per Ittiobase è stata: la componente nutrizionale in riferimento agli acidi grassi (valore medio) è: acidi grassi saturi: 26%; acidi grassi insaturi 74%; tra gli acidi grassi polinsaturi troviamo una percentuale pari al 19% di omega-3 e 8% di omega-6. In tabella 4.4 vengono riportati i valori medi (%) degli acidi grassi sia saturi che insaturi presenti in *Alosa fallax lacustris*.

ACIDO GRASSO	VALORE MEDIO (%)
Miristico	4,19
Palmitico	16,47
Palmitoleico	5,53
Stearico	4,83
Oleico	33,94
acido (Z)-11-octadecenoico	6,08
Linoleico	7,54
Linolenico	8,99
Arachico	0,32
Gondoico	1,86
EPA	7,08
DHA	3,16
% saturi	25
% insaturi	74,20

Tabella 4.4: ripartizione percentuale degli acidi grassi identificati nell'estratto lipidico ottenuto mediante Soxhlet da *Alosa fallax lacustris*. Valori espressi in %. (CV% \leq 2)

Biso o Tombarello (*Auxis rochei*)

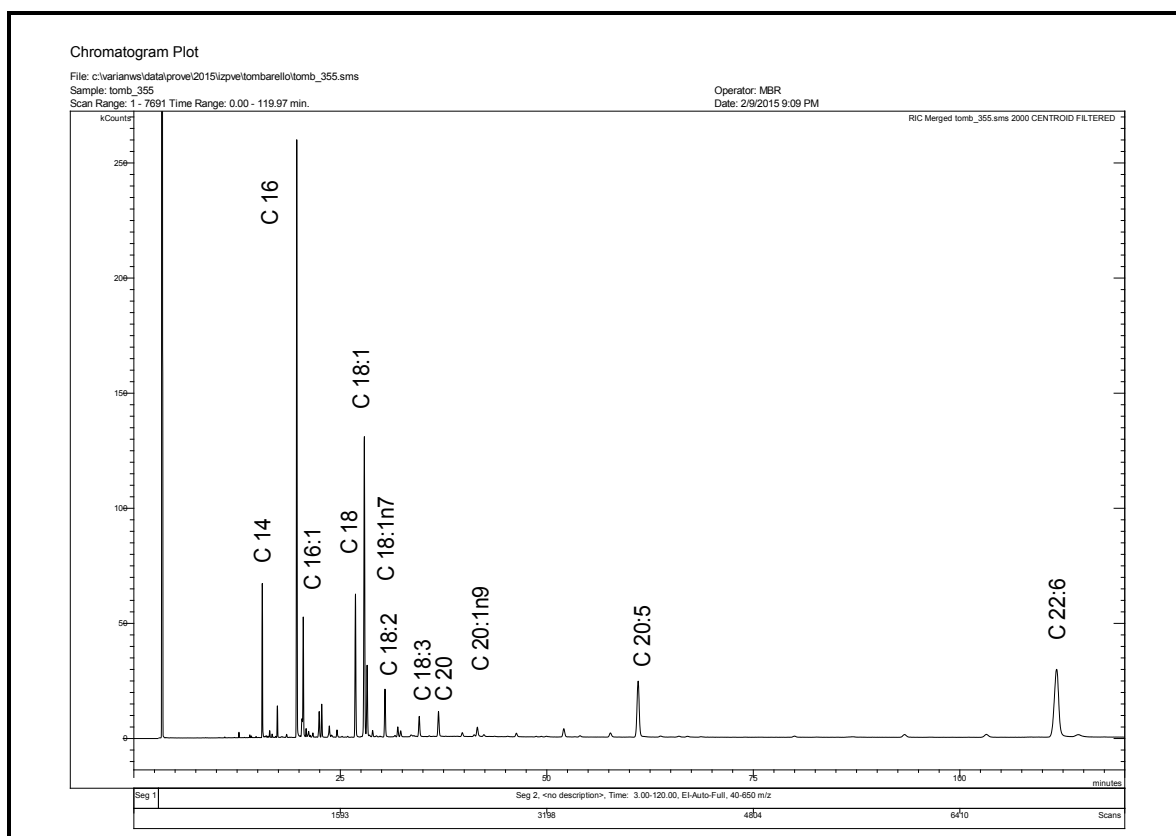


Figura 4.10: profilo lipidico ottenuto mediante GC-MS di Tombarello (*Auxis rochei*)

Il Biso o Tombarello è una specie pelagica come l'Alalunga o il Tonno, queste specie sono state inserite nel progetto di ricerca in quanto hanno un alto valore commerciale e da qui l'interesse di valutarne anche la componente nutrizionale. Il cromatogramma di figura 4.10 evidenzia una media concentrazione di acidi grassi insaturi, alto il contenuto totale di omega-3, inoltre sorprende l'elevato contenuto di acido palmitico riscontrato nelle carni. Per il Tombarello in Ittiobase è stata inserita la seguente dicitura: la componente nutrizionale in riferimento agli acidi grassi (valore medio) è: acidi grassi saturi: 38%; acidi grassi insaturi 62%; tra gli acidi grassi polinsaturi troviamo una percentuale pari al 30% di omega-3 e 3% di omega-6. In tabella 4.5 vengono riportati i valori medi (%) degli acidi grassi sia saturi che insaturi presenti in *Auxis rochei*.

ACIDO GRASSO	VALORE MEDIO (%)
Miristico	5,77
Palmitico	25,52
Palmitoleico	5,69
Stearico	6,58
Oleico	18,14
acido (Z)-11-octadecenoico	4,23
Linoleico	3,01
Linolenico	1,62
Arachico	0,31
Gondoico	0,92
EPA	9,17
DHA	19,05
% saturi	38
% insaturi	61,83

Tabella 4.5: ripartizione percentuale degli acidi grassi identificati nell'estratto lipidico ottenuto mediante Soxhlet da *Auxis rochei*. Valori espressi in %. (CV% ≤ 2)

Nasello (*Merluccius merluccius*)

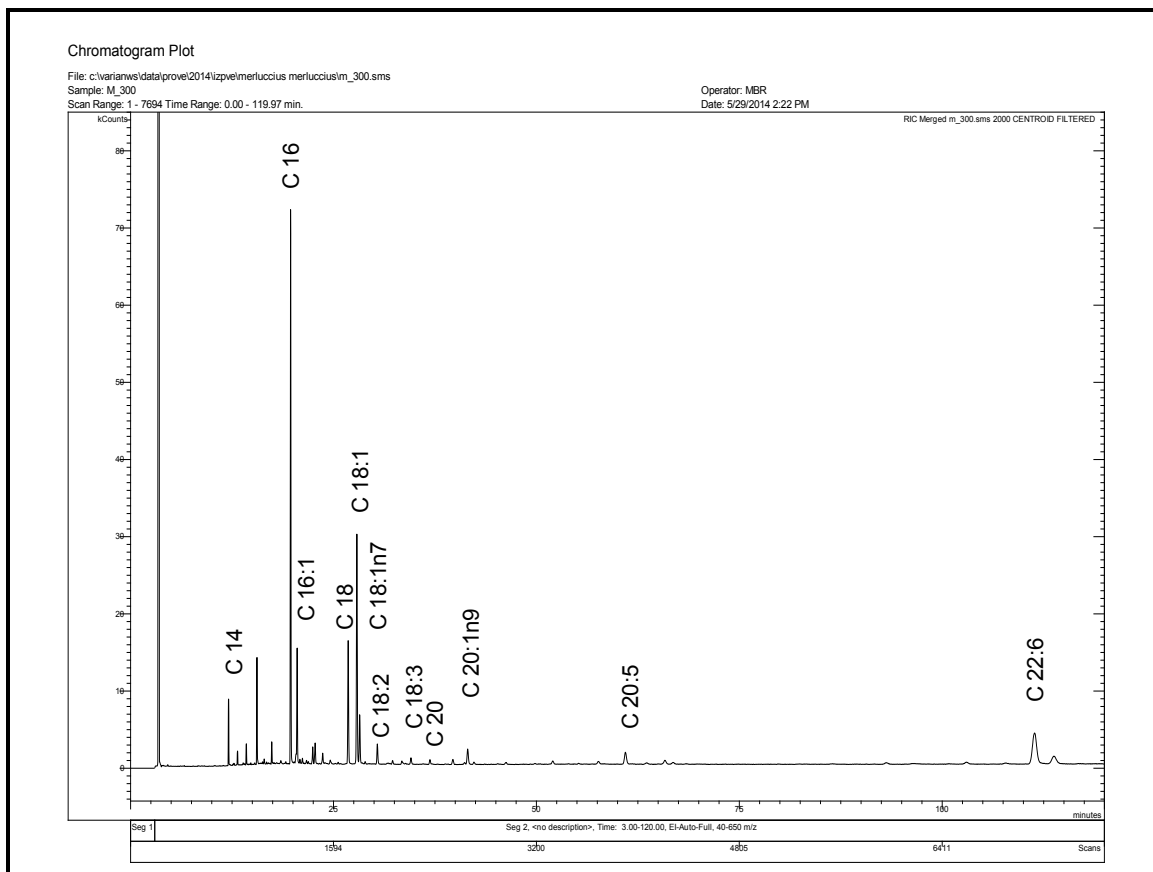


Figura 4.11: profilo lipidico ottenuto mediante GC-MS di Nasello (*Merluccius merluccius*)

Il Nasello è un pesce d'acqua salata, predatore notturno, di giorno passa il tempo sul fondo; si pesca nel mar Mediterraneo, nel sud del mar Nero e nell'Oceano Atlantico orientale tra l'Islanda e la Mauritania. Le sue carni sono molto apprezzate visto l'elevata digeribilità, motivo per cui è stato inserito nello studio. Osservando il profilo lipidico si evidenzia una discreta presenza di acidi grassi insaturi, mentre tra gli acidi grassi saturi un elevato apporto è dato dall'acido palmitico. In Ittiobase, per il Nasello è stata descritta la seguente nota: la componente nutrizionale in riferimento agli acidi grassi (valore medio) è: acidi grassi saturi: 45%; acidi grassi insaturi 55%; tra gli acidi grassi polinsaturi troviamo una percentuale pari al 20% di omega-3 e 2% di omega-6. In tabella 4.6 vengono riportati i valori medi (%) degli acidi grassi sia saturi che insaturi presenti in *Merluccius merluccius*.

ACIDO GRASSO	VALORE MEDIO (%)
Miristico	5,82
Palmitico	28,30
Palmitoleico	8,51
Stearico	9,16
Oleico	17,51
acido (Z)-11-octadecenoico	4,49
Linoleico	1,81
Linolenico	0,65
Arachico	0,66
Gondoico	2,05
EPA	4,50
DHA	16,54
% saturi	43,94
% insaturi	56,06

Tabella 4.6: ripartizione percentuale degli acidi grassi identificati nell'estratto lipidico ottenuto mediante Soxhlet da *Merluccius merluccius*. Valori espressi in %. (CV% \leq 2)

Sarago sparaglione (*Diplodus annularis*)

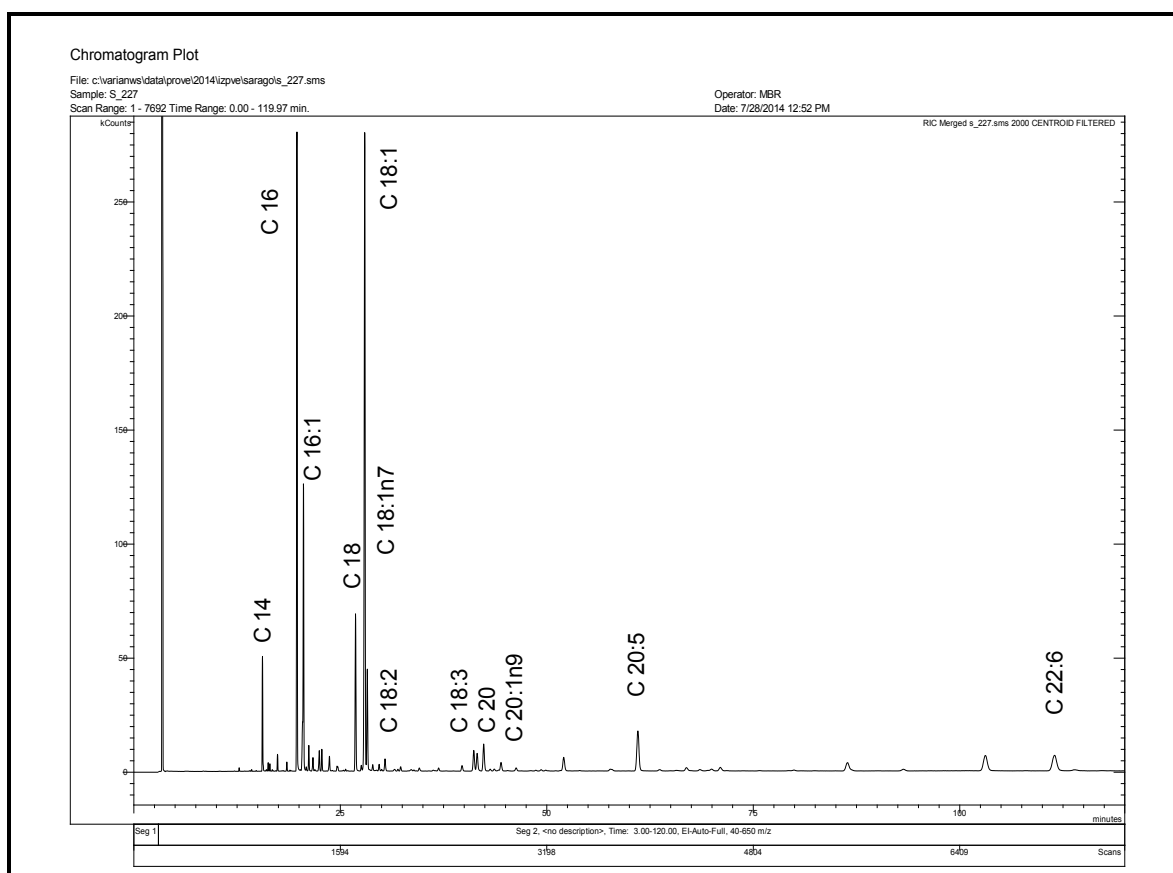


Figura 4.12: profilo lipidico ottenuto mediante GC-MS di

Sarago sparaglione (*Diplodus annularis*)

Un'altra specie analizzata è il Sarago sparaglione, pesce di mare che viene catturato con tecniche di pesca sportiva che contemplano l'uso di esche naturali e le reti da posta. Non ha un gran valore commerciale, a causa delle carni scarsamente saporite, anche se è l'ingrediente principe di alcune zuppe di pesce (come il cacciucco livornese) e quindi interessante sotto il profilo nutrizionale. Dall'analisi della componente lipidica si osserva la presenza di acidi grassi saturi come l'acido oleico, l'acido palmitico e l'acido stearico. Buon apporto di DHA riscontrato nelle carni, basso il contenuto invece di acido linolenico. In Ittiobase, per il Sarago sparaglione è stata inserita la seguente formula: la componente nutrizionale in riferimento agli acidi grassi (valore medio) è: acidi grassi saturi: 37%; acidi grassi insaturi 63%; tra gli acidi grassi polinsaturi troviamo una percentuale pari al 13% di omega-3 e 1% di omega-6. In tabella 4.7 vengono riportati i valori medi (%) degli acidi grassi sia saturi che insaturi presenti in *Diplodus annularis*.

ACIDO GRASSO	VALORE MEDIO (%)
Miristico	4,72
Palmitico	24,33
Palmitoleico	12,45
Stearico	7,06
Oleico	30,24
acido (Z)-11-octadecenoico	4,96
Linoleico	1,10
Linolenico	0,47
Arachico	0,46
Gondoico	2,08
EPA	5,72
DHA	6,42
% saturi	36,56
% insaturi	63,44

Tabella 4.7: ripartizione percentuale degli acidi grassi identificati nell'estratto lipidico ottenuto mediante Soxhlet da *Diplodus annularis*. Valori espressi in %. (CV% ≤ 2)

Pesce Sciabola (*Lepidopus caudatus*)

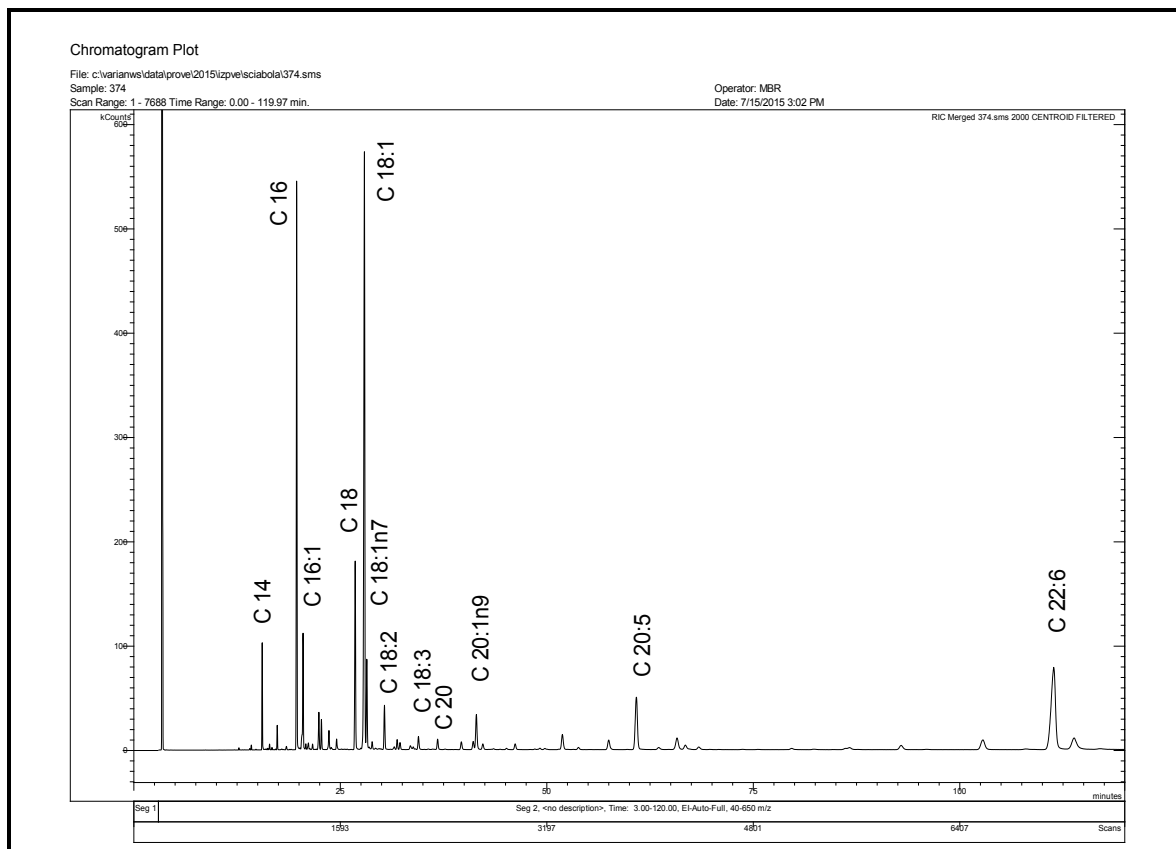


Figura 4.13: profilo lipidico ottenuto mediante GC-MS di
Pesce sciabola (*Lepidopus caudatus*)

Il Pesce sciabola ha una carne molto soda, con sapore delicato. È classificato come pesce magro, particolarmente digeribile. Dall'analisi del cromatogramma, figura 4.13, si osserva una marcata presenza di acidi grassi insaturi come EPA e DHA, mentre in minor percentuale si riscontrano gli acidi grassi saturi, spicca su tutti l'acido oleico. La seguente frase, riportata nel database è: la componente nutrizionale in riferimento agli acidi grassi (valore medio) è: acidi grassi saturi: 32%; acidi grassi insaturi 68%; tra gli acidi grassi polinsaturi troviamo una percentuale pari al 24% di omega-3 e 2% di omega-6.

In tabella 4.8 vengono riportati i valori medi (%) degli acidi grassi sia saturi che insaturi presenti in *Lepidopus caudatus*.

ACIDO GRASSO	VALORE MEDIO (%)
Miristico	3,35
Palmitico	19,94
Palmitoleico	4,17
Stearico	7,85
Oleico	30,54
acido (Z)-11-octadecenoico	4,36
Linoleico	2,14
Linolenico	0,78
Arachico	0,51
Gondoico	3,16
EPA	5,90
DHA	17,30
% saturi	32
% insaturi	68,35

Tabella 4.8: ripartizione percentuale degli acidi grassi identificati nell'estratto lipidico ottenuto mediante Soxhlet da *Lepidopus caudatus*. Valori espressi in %. (CV% \leq 2)

Temolo (*Thymallus thymallus*)

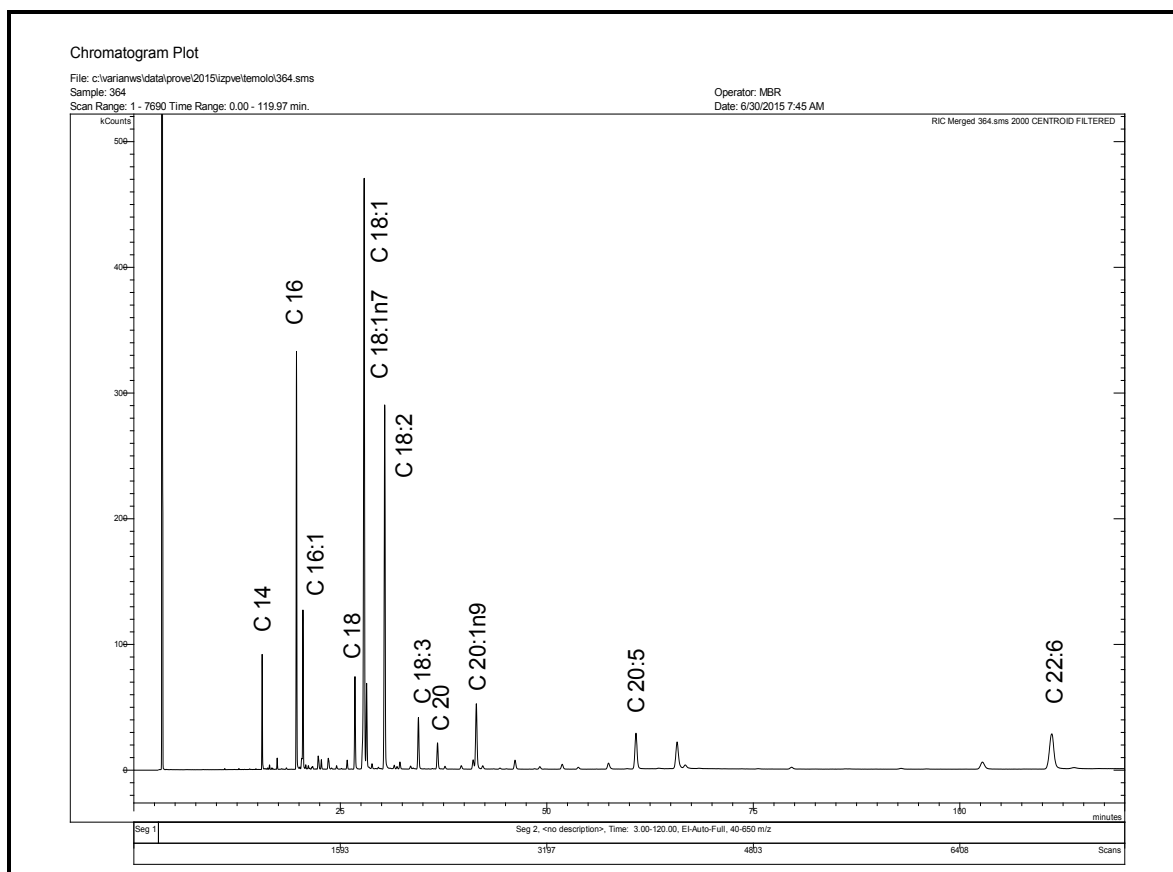


Figura 4.14: profilo lipidico ottenuto mediante GC-MS di Temolo (*Thymallus thymallus*)

Il Temolo, insieme all'Agone ed al Vairone è un pesce d'acqua dolce, viene principalmente commercializzato fresco; le carni, bianche e sode, molto apprezzate, hanno un caratteristico aroma che ricorda la pianta di timo ("thymus") da cui ne deriva il nome. Dall'analisi del profilo lipidico si apprezza un'alta percentuale di acidi grassi insaturi come EPA e DHA, ma soprattutto un ottimo rapporto di omega-6 dato dalla presenza di acido linoleico. La frase, riportata nel database è: la componente nutrizionale in riferimento agli acidi grassi (valore medio) è: acidi grassi saturi: 22%; acidi grassi insaturi 78%; tra gli acidi grassi polinsaturi troviamo una percentuale pari al 15% di omega-3 e 17% di omega-6. In tabella 4.9 vengono riportati i valori medi (%) degli acidi grassi sia saturi che insaturi presenti in *Thymallus thymallus*.

ACIDO GRASSO	VALORE MEDIO (%)
Miristico	3,81
Palmitico	14,24
Palmitoleico	6,15
Stearico	3,65
Oleico	29,79
acido (Z)-11-octadecenoico	4,14
Linoleico	17,77
Linolenico	2,69
Arachico	0,21
Gondoico	5,05
EPA	4,45
DHA	8,06
% saturi	22
% insaturi	78,09

Tabella 4.9: ripartizione percentuale degli acidi grassi identificati nell'estratto lipidico ottenuto mediante Soxhlet da *Thymallus thymallus*. Valori espressi in %. (CV% ≤ 2)

Tonno o Tonno rosso (*Thunnus thynnus*)

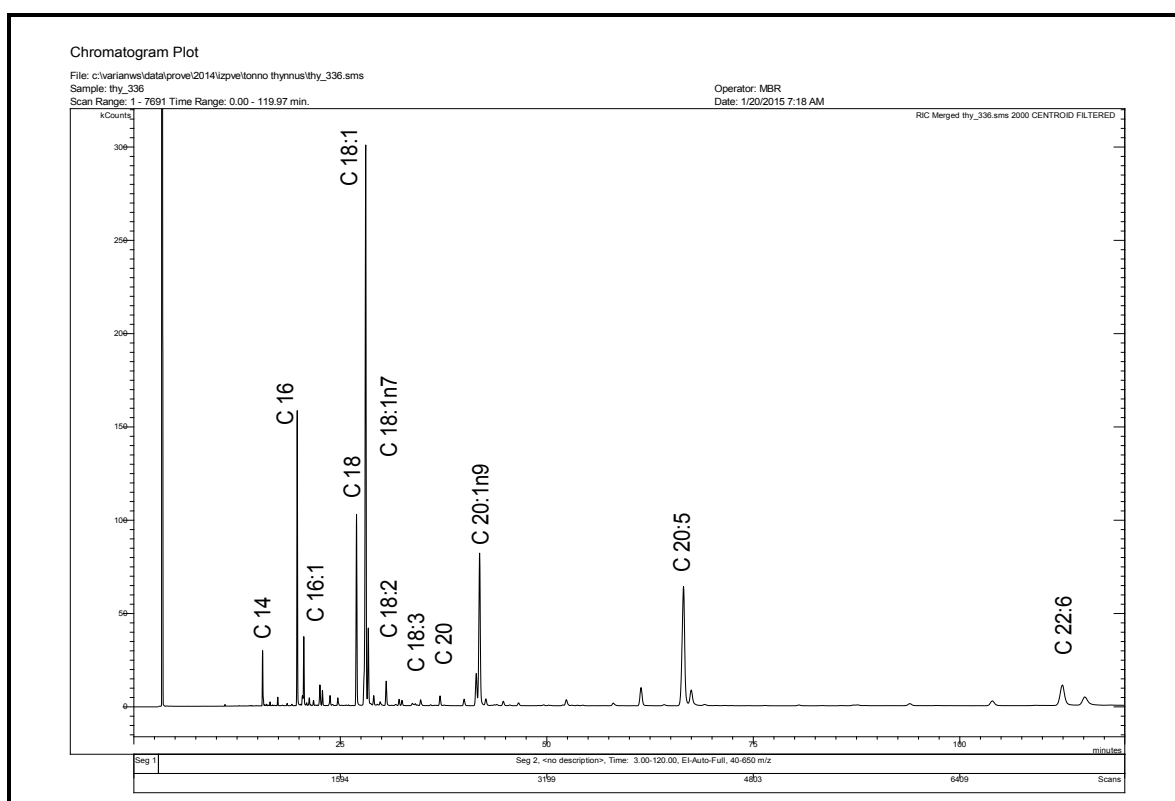


Figura 4.15: profilo lipidico ottenuto mediante GC-MS di
Tonno o Tonno rosso (*Thunnus thynnus*)

Il Tonno o Tonno rosso, insieme al Tonno a pinne gialle e all'Alalunga sono tra le specie con un elevato valore commerciale, tra questi il Tonno è sicuramente la specie più conosciuta ed apprezzata, in Italia come all'estero. All'analisi visiva le carni appaiono grasse e di colore rosso scuro. Dal profilo lipidico, figura 4.15, si osserva un alto contenuto di acidi grassi saturi come oleico, stearico e palmitico. Buono il contenuto di DHA, già descritto anche in altri lavori ^[54], anche se inferiore all'Alalunga che appartiene sempre alla famiglia *Scombridae*. La frase, inserita in Ittiobase è: la componente nutrizionale in riferimento agli acidi grassi (valore medio) è: acidi grassi saturi: 34%; acidi grassi insaturi 66%; tra gli acidi grassi polinsaturi troviamo una percentuale pari al 17% di omega-3 e 1% di omega-6. In tabella 4.10 vengono riportati i valori medi (%) degli acidi grassi sia saturi che insaturi presenti in *Thunnus thynnus*.

ACIDO GRASSO	VALORE MEDIO (%)
Miristico	2,08
Palmitico	19,35
Palmitoleico	4,92
Stearico	11,55
Oleico	34,50
acido (Z)-11-octadecenoico	5,63
Linoleico	2,08
Linolenico	0,70
Arachico	0,63
Gondoico	3,21
EPA	4,42
DHA	10,94
% saturi	34
% insaturi	66,39

Tabella 4.10. Ripartizione percentuale degli acidi grassi identificati nell'estratto lipidico ottenuto mediante Soxhlet da *Thunnus thynnus*. Valori espressi in %. (CV% \leq 2)

Triglia atlantica (*Pseudopenus prayensis*)

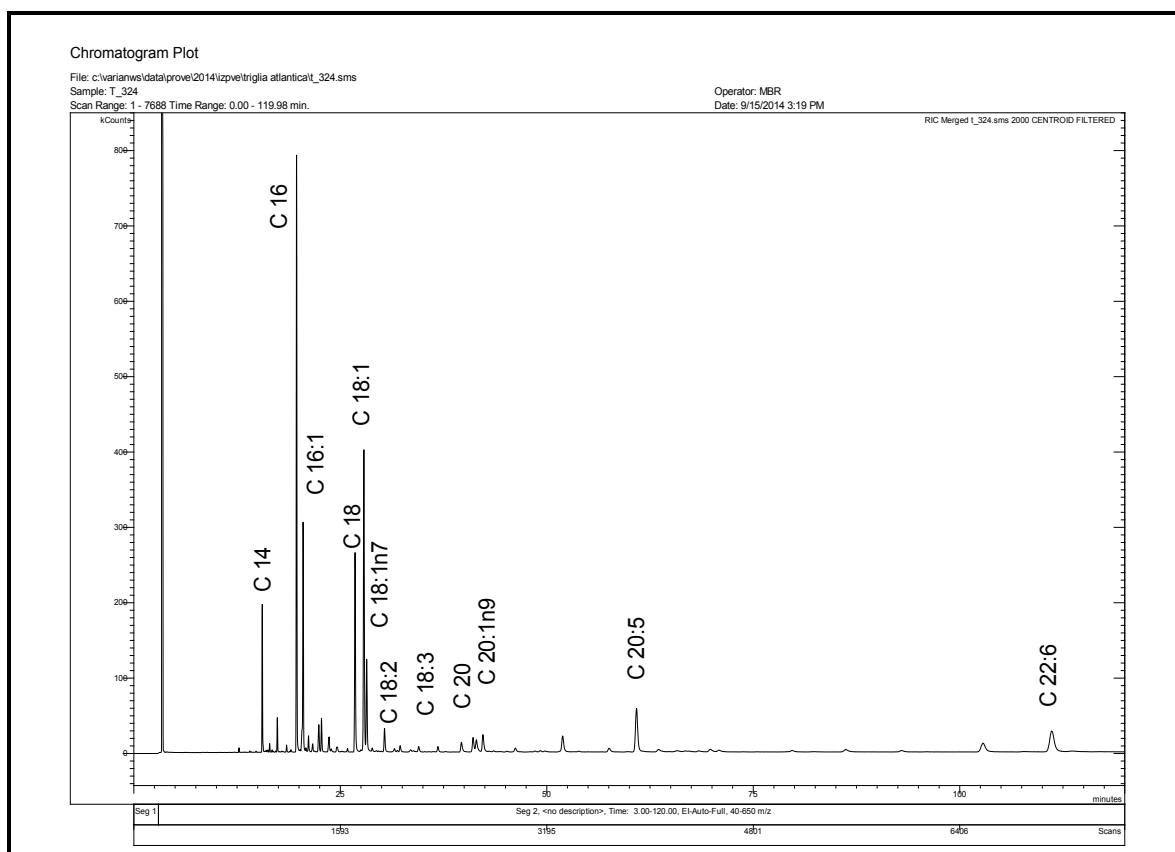


Figura 4.16: profilo lipidico ottenuto mediante GC-MS di
Triglia atlantica (*Pseudopenus prayensis*)

La Triglia atlantica, è una specie che vive nella fascia tropicale e temperata di tutti gli oceani, dove tendenzialmente popola acque poco profonde (zona epipelagica, aree costiere), nonostante sia meno pregiata della Triglia di scoglio (Mar Mediterraneo), questa specie è diffusissima in tutti i mercati locali italiani e le sue carni sono molto apprezzate dai consumatori. Dalla tabella 4.11 si osserva un'alta percentuale di acidi grassi saturi come oleico e palmitico. Bassa invece la percentuale di omega-3(DHA ed EPA) e di omega-6 come acido linolenico. Nonostante sia perciò molto venduta, il suo profilo nutrizionale non è dei migliori tra le specie analizzate. La frase, inserita in Ittiobase è la seguente: la componente nutrizionale in riferimento agli acidi grassi (valore medio) è: acidi grassi saturi: 52%; acidi grassi insaturi 48%; tra gli acidi grassi polinsaturi troviamo una percentuale pari al 8% di omega-3 e 2% di omega-6. In tabella 4.11 vengono riportati i valori medi (%) degli acidi grassi sia saturi che insaturi presenti in *Pseudopenus prayensis*.

ACIDO GRASSO	VALORE MEDIO (%)
Miristico	7,34
Palmitico	29,14
Palmitoleico	10,73
Stearico	14,25
Oleico	20,22
acido (Z)-11-octadecenoico	6,08
Linoleico	1,72
Linolenico	0,47
Arachico	1,18
Gondoico	1,70
EPA	2,89
DHA	4,28
% saturi	52
% insaturi	48,10

Tabella 4.11: ripartizione percentuale degli acidi grassi identificati nell'estratto lipidico ottenuto mediante Soxhlet da *Pseudopenaeus prayensis*. Valori espressi in %. (CV% \leq 2)

Vairone (*Telestes muticellus*)

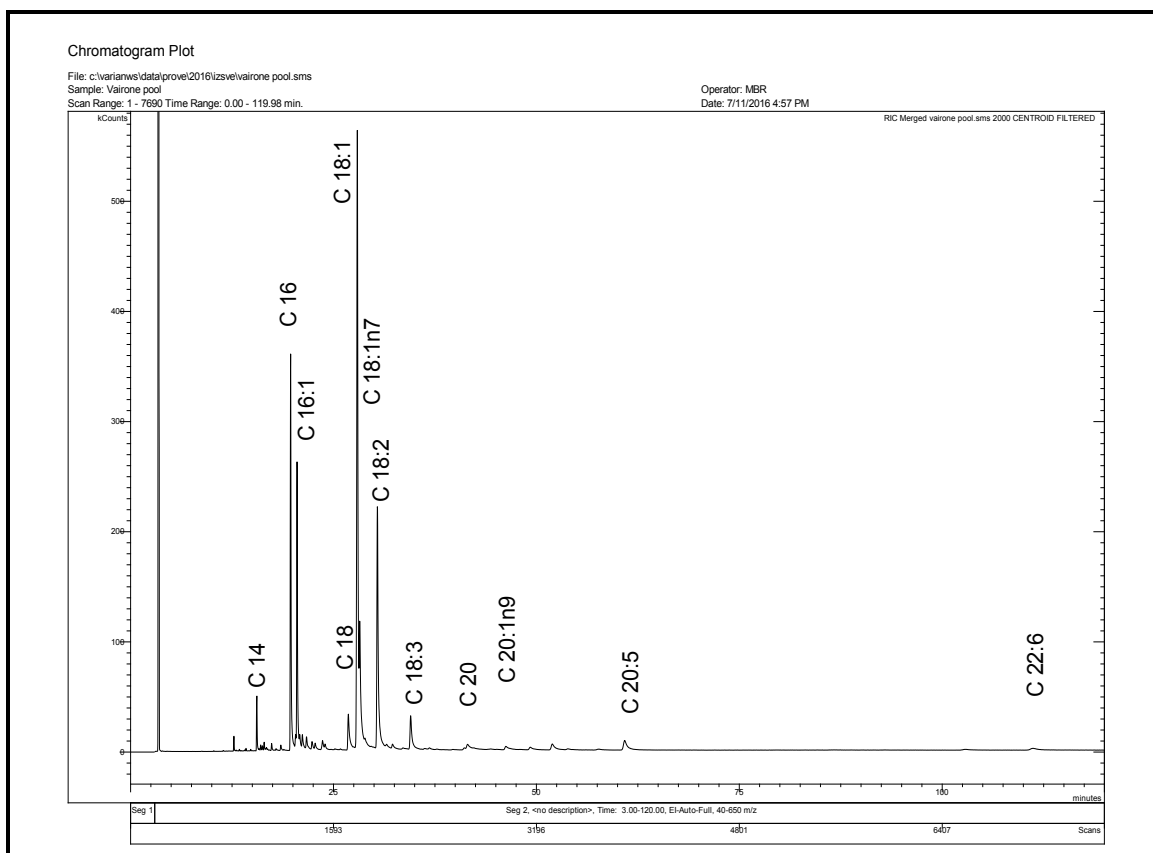


Figura 4.17: profilo lipidico ottenuto mediante GC-MS di Vairone (*Telestes muticellus*)

Tra i campioni analizzati la terza ed ultima specie d'acqua dolce oltre all'Agone ed al Temolo è proprio il Vairone. A differenza però delle altre due specie, il Vairone ha un apporto minore di omega-3 ed omega-6 come indicato in tabella 4.12. Ciò è dovuto molto probabilmente alla taglia ridotta degli esemplari analizzati, che non ha permesso un'analisi in singolo di tutti gli esemplari ma bensì l'analisi di pool di animali. Buono il contenuto di acido oleico in questa specie. Per il Vairone l'informazione estrapolata dai dati ed utilizzata per Ittiobase è stata: la componente nutrizionale in riferimento agli acidi grassi (valore medio) è: acidi grassi saturi: 24%; acidi grassi insaturi 76%; tra gli acidi grassi polinsaturi troviamo una percentuale pari al 10% di omega-3 e 12% di omega-6.

In tabella 4.12 vengono riportati i valori medi (%) degli acidi grassi sia saturi che insaturi presenti in *Telestes muticellus*.

ACIDO GRASSO	VALORE MEDIO (%)
Miristico	2,19
Palmitico	16,51
Palmitoleico	13,05
Stearico	3,54
Oleico	32,39
acido (Z)-11-octadecenoico	10,08
Linoleico	14,52
Linolenico	4,37
Arachico	0
Gondoico	0,33
EPA	2,70
DHA	0,31
% saturi	24
% insaturi	77,76

Tabella 4.12: ripartizione percentuale degli acidi grassi identificati nell'estratto lipidico ottenuto mediante Soxhlet da *Telestes muticellus*. Valori espressi in %. (CV% ≤ 2)

Gallinella o Cappone (*Trigla lucerna*)

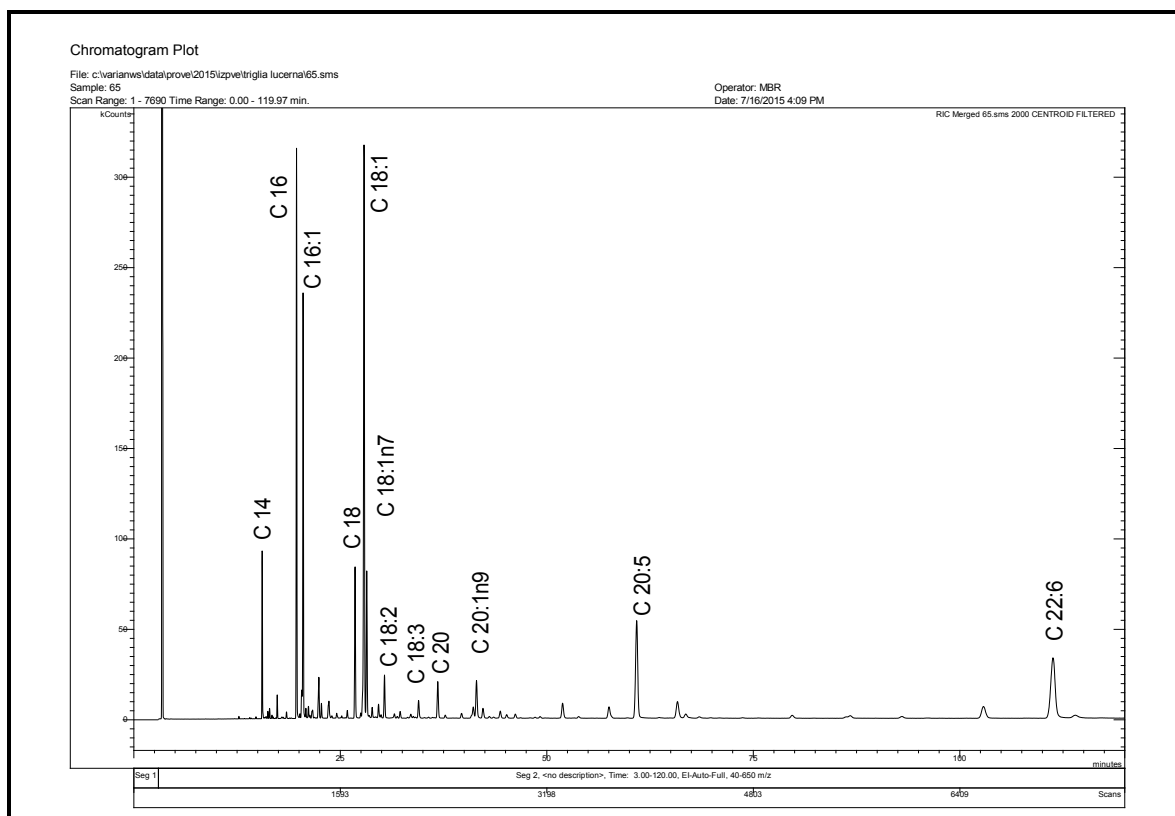


Figura 4.18: profilo lipidico ottenuto mediante GC-MS di
Gallinella o Cappone (*Trigla lucerna*)

Per la Gallinella o Cappone l'analisi della componente lipidica, figura 4.18, è stata eseguita solo su tre esemplari, poiché il reperimento di questa specie è stato limitato e difficoltoso. Buona presenza nelle carni di tutti i soggetti di acidi grassi insaturi (EPA e DHA) e buona la presenza di acido oleico tra gli acidi grassi saturi. Per Ittiobase la dicitura è: la componente nutrizionale in riferimento agli acidi grassi (valore medio) è: acidi grassi saturi: 30%; acidi grassi insaturi 70%; tra gli acidi grassi polinsaturi troviamo una percentuale pari al 22% di omega-3 e 1,5% di omega-6. In tabella 4.13 vengono riportati i valori medi (%) degli acidi grassi sia saturi che insaturi presenti in *Trigla lucerna*.

ACIDO GRASSO	VALORE MEDIO (%)
Miristico	4,57
Palmitico	19,06
Palmitoleico	12,31
Stearico	6,40
Oleico	26,40
acido (Z)-11-octadecenoico	5,68
Linoleico	1,50
Linolenico	0,73
Arachico	0,30
Gondoico	1,71
EPA	9,56
DHA	11,77
% saturi	30
% insaturi	69,67

Tabella 4.13: ripartizione percentuale degli acidi grassi identificati nell'estratto lipidico ottenuto mediante Soxhlet da *Trigla lucerna*. Valori espressi in %. (CV% ≤ 2)

Sardina (*Sardina pilchardus*)

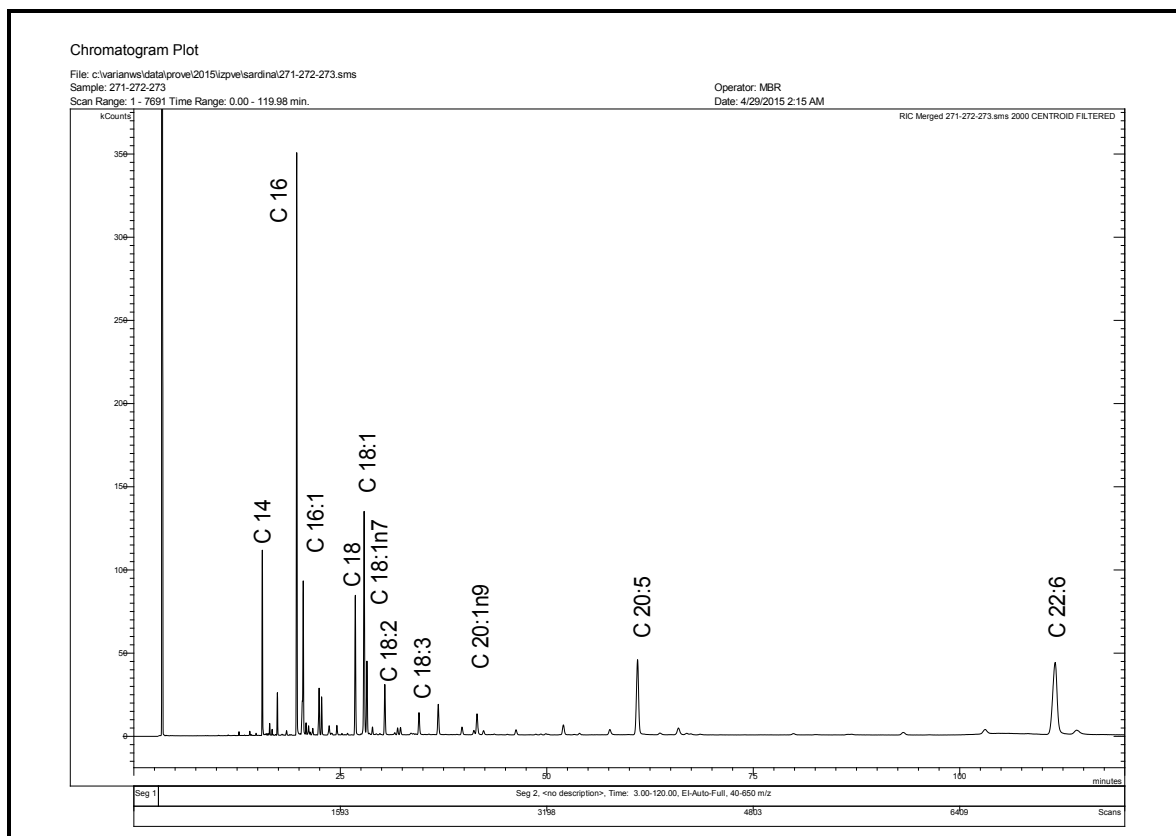


Figura 4.19: profilo lipidico ottenuto mediante GC-MS di Sardina (*Sardina pilchardus*)

Per quanto riguarda la Sardina, che insieme all’Alice o Acciuga rappresentano le specie denominate comunemente “pesce azzurro”, i valori riscontrati dall’analisi della componente lipidica confermano il ricco contenuto di omega-3 soprattutto una percentuale elevata del 22% di DHA, come mostrato in tabella 4.14. Le analisi svolte si allineano ai risultati già evidenziati in molti altri lavori ^[56,57,58]. Per Ittiobase la frase sul profilo nutrizionale è: la componente nutrizionale in riferimento agli acidi grassi (valore medio) è: acidi grassi saturi: 38%; acidi grassi insaturi 62%; tra gli acidi grassi polinsaturi troviamo una percentuale pari al 33% di omega-3 e 3% di omega-6. In tabella 4.14 vengono riportati i valori medi (%) degli acidi grassi sia saturi che insaturi presenti in *Sardina pilchardus*.

ACIDO GRASSO	VALORE MEDIO (%)
Miristico	6,95
Palmitico	23,20
Palmitoleico	6,71
Stearico	6,98
Oleico	12,99
acido (Z)-11-octadecenoico	4,16
Linoleico	3,04
Linolenico	1,50
Arachico	0,73
Gondoico	1,74
EPA	9,90
DHA	22,08
% saturi	38
% insaturi	62,14

Tabella 4.14: ripartizione percentuale degli acidi grassi identificati nell’estratto lipidico ottenuto mediante Soxhlet da *Sardina pilchardus*. Valori espressi in %. (CV% ≤ 2)

Tutti i dati raccolti dai profili lipidici sono stati analizzati statisticamente con SPSS® 15.0 per Windows®. Dall'applicazione di Analisi delle Componenti Principali (PCA) per i dati analitici (figura 4.19) si può osservare come le varie specie formano cluster ben definiti in base ai dati delle varie componenti lipidiche. In particolare Sardina, Sgombro e Temolo hanno cluster compatti e ben definiti, al contrario di Tonno rosso ed Alalunga che sono spazialmente più distribuiti. Ciò può essere spiegato per due motivi, il primo motivo riguarda la taglia di pesca che era piuttosto omogenea per Sardina, Sgombro e Temolo mentre gli esemplari di Alalunga e di Tonno rosso differivano fra di loro per taglia ed età dell'animale. Un secondo motivo può essere l'areale di pesca in quanto Sardina e Sgombro sono stati pescati nell'Adriatico settentrionale mentre gli esemplari di Tonno rosso sono stati pescati sia nel mar Ionio e sia nel mar Tirreno.

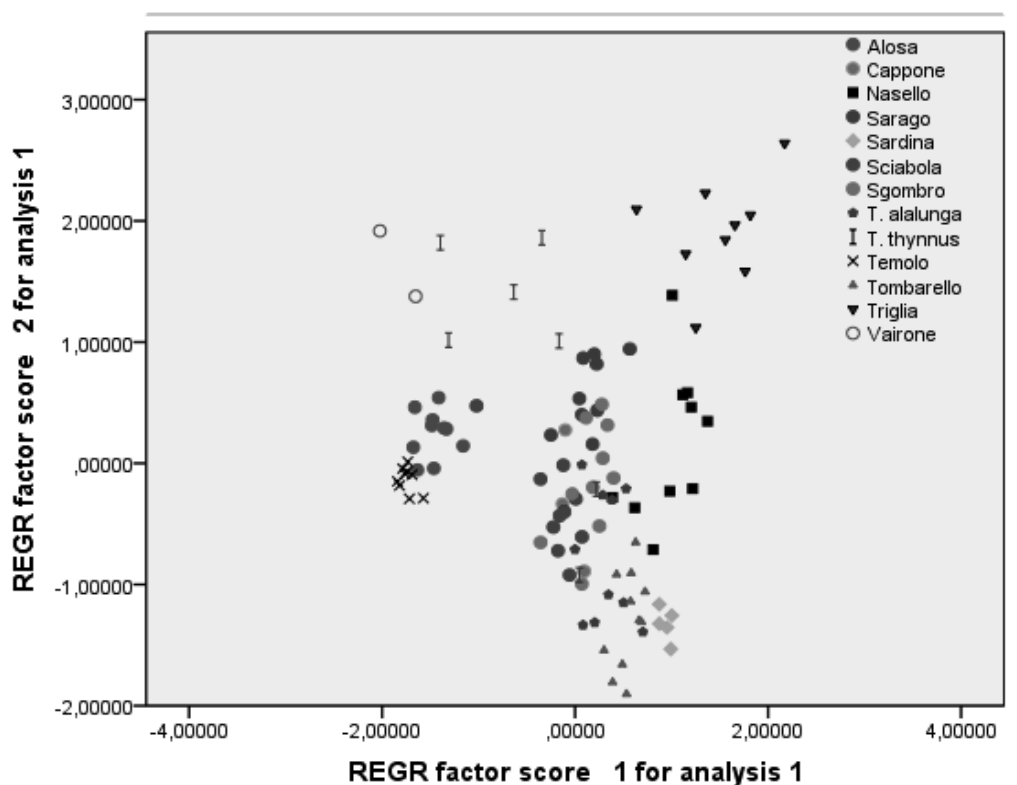


Figura 4.20: analisi delle Componenti Principali (PCA) delle specie analizzate in questo studio.

Fatty acid %± sd	Scomber scombrus n=9	Thunnusalalunga n=10	Thunnus thynnus n=9	Auxis rochei n=10
C16	19.67±4.59	24.04±2.27	20.89±2.93	25.41±1.92
C18	6.62±1.30	8.85±1.33	10.26±4.00	6.54±0.86
MUFA				
C16:1	9.31±1.47	4.65±1.00	5.62±2.05	5.69±0.57
C18:1n7	22.40±1.68	23.30±3.56	36.00±6.70	18.09±1.74
PUFA				
C18:2	2.62±0.39	1.75±0.17	1.70±0.55	3.00±0.10
C18:3	1.54±0.43	0.61±0.15	0.54±0.33	1.61±0.13
C20:5	7.12±1.24	6.99±0.93	2.97±2.11	9.27±1.30
C22:6	15.89±2.86	19.79±4.48	7.43±3.93	19.09±3.19
DHA/EPA	2.23	2.83	2.50	2.05

Tabella 4.15: confronto delle componenti lipidiche tra specie appartenenti alla famiglia Scombridae.

Osservando i dati raccolti è stato fatto inoltre una valutazione delle specie appartenenti alla famiglia Scombridae (figura 4.15) andando a mettere a confronto le diverse componenti lipidiche. E' già possibile capire che grazie alle diversità riscontrate sia possibile distinguere il Tonno rosso dall'Alalunga, caratterizzazione che con la sola tecnica del *Barcoding* non era possibile. Caratterizzante e diverso tra le due specie la percentuale di DHA ed EPA tra gli acidi grassi polinsaturi, mentre tra gli acidi grassi monoinsaturi diverso è l'apporto di C18:1n7 ovvero acido (Z)-11-octadecenoico. Lo Sgombro risulta essere molto ricco di EPA, insieme al Tombarello sono ricchi di acido linoleico. Lo Sgombro ed il Tombarello mostrano una componente lipidica confrontabile e quasi simile, a differenza dell'acido palmitico molto più abbondante nel secondo rispetto al primo.

4.3 Utilizzo preliminare degli isotopi stabili per la tracciabilità dei campioni

Specie		$\delta^{13}\text{C}(\text{‰})$	$\delta^{15}\text{N}(\text{‰})$	C/N (mole/mole)
Scomber scombrus n=9	Av.	-21,591	12,543	3,4
	Std. Dev.	0,605	0,234	0,7
Auxis rochei n=10	Av.	-20,2	8,296	2,8
	Std. Dev.	1,036	1,698	0,7
Thunnusalalunga n=10	Av.	-19,152	8,163	2,4
	Std. Dev.	0,718	0,854	0,4
Thunnusthynnus n=9	Av.	-18,725	10,089	2,3
	Std. Dev.	1,184	1,662	0,5

Tabella 4.16: confronto dei valori degli isotopi stabili tra specie appartenenti alla famiglia Scombridae

Il $\delta^{13}\text{C}$ presente nei campioni (figura 4.16) mostra una bassa differenza tra le diverse specie analizzate, con valori negativi in un *range* compreso tra $-19,15 \pm 0,71 \text{‰}$ per *Thunnus alalunga* e $-21,59 \pm 0,60 \text{‰}$ per *Scomber scombrus*.

I valori isotopici del carbonio sono preferenzialmente impiegati per fornire informazioni circa l'origine del carbonio presente negli alimenti (un arricchimento di questo isotopo viene stimata a circa 1‰), mentre i valori isotopici dell'azoto sono generalmente utilizzati per prevedere il livello trofico di un organismo.^[59] D'altra parte il $\delta^{15}\text{N}$ ha mostrato maggiore variabilità dei valori ottenuti rispetto al $\delta^{13}\text{C}$, indicando un alto livello trofico per *Scomber scombrus* rispetto alle altre specie analizzate. I valori di $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ per *Scomber scombrus* ($-17,5 \text{‰}$, $13,3 \text{‰}$, rispettivamente) sono paragonabili a quelle determinati in campioni pescati nel mare Adriatico nel corso del 2010 e riportati da Fortibuoni et al.^[60]

Analogamente, Logan et al.^[61] hanno riportato dati sul $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ ($-19,0 \pm 0,3 \text{‰}$, $12,5 \pm 0,7 \text{‰}$, rispettivamente) per *Scomber scombrus* campionato nel Golfo del Maine nel 2004 e nel 2008. Per le altre specie analizzate i dati collimano abbastanza con valori riportati per

Thunnus thynnus^[61,62] e per *Thunnus alalunga*^[63,64] nel Nord Atlantico e nel Mar Mediterraneo in altri lavori, mentre per *Auxis rochei* solo alcuni dati isotopici sono stati determinati per le larve.^[65]

Gli isotopi stabili, in questo studio preliminare, mostrano una variazione del $\delta^{13}\text{C}$ in campioni analizzati con circa ~ 3 unità di $\Delta\delta$. Questa variabilità è legata alla diversa dieta dei pesci, in cui si è osservato un livello più alto di isotopi pesanti nel predatore rispetto a quelli riscontrati nella sua preda.^[66, 67]

I valori più elevati di $\delta^{13}\text{C}$ che sono stati riscontrati per *Scomber scombrus* dipendono dalla maggiore quantità di lipidi presenti nei tessuti dei diversi esemplari, come confermato dal rapporto di C / N. Considerando che per il rapporto C / N > 3.4 generalmente è necessaria una correzione lipidica^[68] calcoliamo i valori meno negativi per *Scomber scombrus* (-20,96 ‰) rispetto a quelli analizzati. Anche se, l'isotopo stabile del carbonio è preferenzialmente impiegato per fornire indizi circa l'origine del carbonio nei prodotti alimentari, il $\delta^{13}\text{C}$ presente nei nostri campioni suggerisce un aumento del 1 ‰ da diversi livelli trofici. Comunque è interessante notare che i dati dei valori di $\delta^{13}\text{C}$ non confermano la posizione più alta a livello trofico per *Thunnus thynnus* come suggerito da Estrada et al.^[54] nel loro lavoro, ma suggerisce che uno slittamento dei valori di $\delta^{13}\text{C}$ riscontrato nel tessuto muscolare per *Thunnus thynnus* possa essere in relazione alla stagionalità e ad una diversa dieta degli animali stessi, con valori che possono variare da -17 ‰ a -18‰ (Nasello) e -20 ‰ a - 21 ‰ (Aringhe pescate in Atlantico). Deve essere preso in considerazione che i campioni analizzati sono stati pescati da maggio a luglio, nella fase di digiuno quando i tonni hanno ridotto l'alimentazione per il periodo della deposizione delle uova, quindi viene a spiegarsi il possibile frazionamento del $\delta^{13}\text{C}$. Inoltre, la stagione primaverile corrisponde al periodo di selezione per *Engraulis encrasicolus* (Alice o acciuga) nel mare Mediterraneo, si ipotizza perciò che i tessuti muscolari del tonno probabilmente riflettano il contenuto di carbonio di questo piccolo pesce che diventa la preda preferita nell'alimentazione di questi animali pelagici.^[69]

Una simile variazione temporale del $\delta^{13}\text{C}$ è stata osservata nei campioni per la specie *Thunnus alalunga*, in cui una variabilità stagionale nella dieta ed inter-annuale potrebbe contribuire a definire i diversi valori degli isotopici stabili di carbonio e azoto, come riportato anche da Goñi et al.^[64]

Mentre i valori più elevati di $\delta^{15}\text{N}$ di *Scomber scombrus* rispetto alle altre specie analizzate potrebbero riflettere la diversa dieta e il loro habitat di alimentazione. Questi campioni sono stati pescati a nord del mare Adriatico, che è un'area ad elevata produttività in un

bacino semichiuso ed interessato da diversi deflussi fluviale (in particolare del fiume Po) che influenzano in modo significativo la produttività ed il dinamismo trofico del nord Adriatico.^[70]

Dati simili sono stati riportati da Fortibuoni et al.^[60] per le stesse aree geografiche.

Ulteriori indagini saranno necessarie al fine di migliorare le conoscenze scientifiche in questo campo e per una loro applicabilità per studi di tracciabilità alimentare; innanzitutto analizzando un più alto numero di campioni di queste specie di diverse dimensioni e con diverse provenienze geografiche, al fine di creare un database con valori di riferimento affidabili per specie e per areale utilizzando questi parametri.

4.4 ITTIODATABASE: una risorsa informatica creata per la tutela della salute del consumatore



Figura 4.21: logo del database informatico sulle specie ittiche.

Ittiobase è un database informatico in continuo ampliamento, che raccoglie varie informazioni riguardanti le specie ittiche di interesse commerciale. Dalla collaborazione con il Dipartimento di Scienze Chimiche e Farmaceutiche dell'Università di Ferrara è stato possibile inserire nuove informazioni di carattere nutrizionale per le varie specie, analizzate durante il progetto di ricerca. Sono state create delle schede tecniche facilmente consultabili e di semplice comprensione in cui sono presenti informazioni di carattere generale come la nomenclatura, le zone di distribuzione, le caratteristiche nutrizionali e i problemi collegati alla sicurezza alimentare e alle frodi.

Nel dettaglio ora verranno indicate le varie componenti che caratterizzano questa interfaccia web, la quale è presente sul sito dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

(<http://www.izsvenezie.it/temi/tecnologia-innovazione/identificazione-di-specie-ittiche/>)

Accedendo al database la schermata iniziale che appare è di semplice utilizzo (figura 4.22)




Figura 4.22: schermata iniziale Ittiobase

In questa prima parte è possibile sia effettuare una ricerca manuale inserendo famiglia/genere/specie di cui si vuole avere informazioni, è possibile inserire una o più informazioni contemporaneamente, il menù a tendina guiderà nella ricerca corretta della specie desiderata. In alternativa può essere eseguita anche una ricerca libera, inserendo il nome latino o il nome italiano della specie d'interesse. Avviando la ricerca potranno essere fornite più possibilità di scelta oppure verrà indicata una singola e precisa specie. Accendendo alla specie di interesse la schermata che appare è la scheda tecnica della specie stessa (figura 4.23) in questo caso la specie selezionata è *Diplodus annularis* (Sarago sparaglione).

Per ordine:	Seleziona...	<input type="button" value="Specie con sequenza"/> <input type="button" value="Specie con IEF"/>	Cerca per parole chiave:	
Per famiglia:	Seleziona...		es.: nome italiano, nome latino ecc...	
Per genere:	Seleziona...		<input type="text"/>	<input type="button" value="Cerca"/>
Per specie:	Seleziona...		<input checked="" type="checkbox"/> includi corrispondenze parziali	


Classificazione tassonomica	Nomi Comuni	Tracciati IEF	Sequenze	Distribuzione	Caratteristiche commerciali	Sicurezza e Frode
-----------------------------	-------------	---------------	----------	---------------	-----------------------------	-------------------



Diplodus annularis
(Linnaeus 1758)

Ordine: Perciformes
Famiglia: Sparidae
Genere: Diplodus
Alfa3: ANN

Sinonimi:
Lunghezza massima: 24 cm

 Sarago Sparagione

specie inserita del Decreto MIPAAF con denominazione obbligatoria.




Figura 4.23: scheda tecnica di *Diplodus annularis* (Sarago sparaglione)

Nella scheda tecnica vengono fornite diverse informazioni, ogni specie è identificata anche tramite materiale fotografico. Nella prima e seconda “etichetta” della scheda tecnica si hanno le voci “Classificazione tassonomica” e “Nomi comuni” che riguardano gli aspetti tassonomici di ogni specie e che derivano dalla collaborazione con medici veterinari e tassonomi. La terza e la quarta “etichetta” rappresentano la componente laboratoristica con “Tracciati IEF” e “Sequenze”. Per tracciati IEF sono stati inseriti i risultati ottenuti tramite l’isoelettrofocalizzazione (IEF) di numerose specie ittiche. L’IEF sfrutta il diverso punto isoelettrico delle proteine muscolari dei diversi pesci, ossia il punto specifico in cui le cariche elettriche presenti nella sua superficie proteica si equivalgono (focalizzazione della proteina). Si generano così bande specifiche di ciascuna specie, tracciati differenti per ogni campione comparabili con quelli inseriti in altre banche dati. Ittiobase, nella sua banca dati isoelettroforetica comprende attualmente i tracciati standard di 76 specie comunemente commercializzate in Italia. Le sequenze ottenute tutte con il metodo descritto al capitolo “3.3-Analisi genetiche”, sono state inserite nel database attraverso un programma informatico sviluppato presso IZSVE denominato *Ittioclient*. Le sequenze vengono caricate come formato FASTA e possono essere direttamente utilizzate dall’utente per allineamenti genetici e confronto con campioni incogniti. Attualmente sono state inserite le sequenze di 47 specie diverse per un complessivo circa di 470 sequenze. La ricerca della specie con le sequenze o con i tracciati IEF può essere effettuata anche direttamente dalla schermata iniziale con appositi tasti a ricerca rapida. Il database risponde alla necessità di avere a disposizione sequenze “certe” di riferimento per tutti i laboratori che effettuano analisi di

identificazione di specie ittiche. Per sequenze “certe” si intende sequenze derivanti da campioni di pesci interi freschi o congelati, identificati morfologicamente mediante chiavi dicotomiche FAO da personale altamente specializzato. Inoltre, i campioni sono georeferenziati almeno a livello di macroaree FAO. La figura 4.24 mostra la schermata con le sequenze della specie *Diplodus annularis* (Sarago sparaglione).

Classificazione tassonomica | **Nomi Comuni** | **Tracciati IEF** | **Sequenze** | **Distribuzione** | **Caratteristiche commerciali** | **Sicurezza e Frode**

Diplodus annularis

Sequenza 5 di 10
[Precedente](#) [Successivo](#)

Origine:
Primer Forward: COIFISHF1 (5' TCAACYAATCAYAAAGATATYGGCAC 3')
Primer Reverse: COIFISHR1 (5' ACTTCYGGGTGCCRAARAATCA 3')

Sequenza:
 >226
 CACCCTATATCTTGATTTGGTGCCTGGGCCGGAATAGTAGGAACTGCCCTAAGCCTGCTCATTGAGCTGAACCTAAGCC
 AGCCTGGCGCTCTCCTGGAGACGACCAGATTATAATGTAATTGTACAGCACATGCATTTGTAATAATTTCTTTATA
 GTAATACCAATCATGATTGGAGGCTTTGGAACTGATTAATCCCCTTATGATCGGTGCCCGGATATAGCATTCCCCCG
 AATAAATAATAGAGCTTCTGATTACTCCCCCATCGTTCTTCTCTGCTAGCTTCTCCGGAGTTGAAGCTGGGGCTG
 GGACCGGGTGAACAGTTTACCCGCTCTGGCAGGAACTTGCCACGCAGGTGCATCAGTTGACTTAACATTTTCTCC
 CTCCACCTAGCGGGATCTCATCTATTCTTGGTGCTAATACTCATCACCAATTAATAACATGAAACCTCCCGCTAT
 TTCGCAATATCAAACCCGCTATTTGTATGAGCTGCTTAATTAAGTCCGCTTCTACTTCTTCTATCTTCCAGTCCCTG
 CCGCAGGCATTACAATACTCCTAACAGATCGAAACCTAAACACCACTTTCTTCGACCCAGCAGGAGGGGGAGACCAATT

Figura 4.24: sequenza di *Diplodus annularis*(Sarago sparaglione)

Ittiobase fornisce anche indicazioni sulle aree di pesca di ogni specie ittica, attraverso una mappa dettagliata con le diverse aree FAO, tali informazioni sono presenti nell’etichetta “Distribuzione” (figura 4.25).

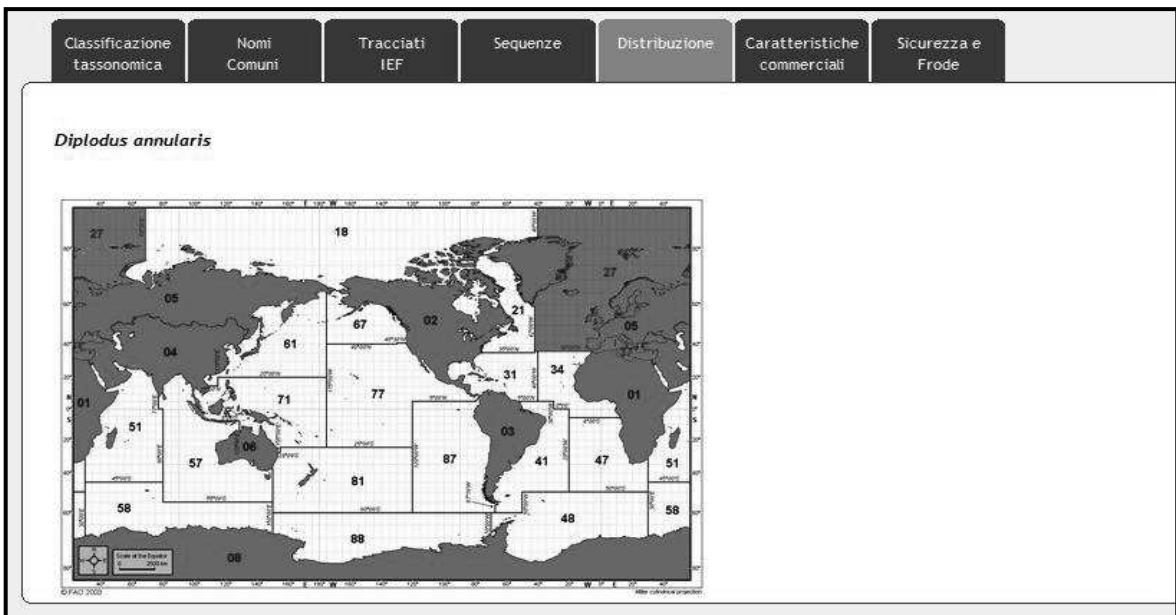


Figura 4.25: distribuzione aree di pesca di *Diplodus annularis* (Sarago sparaglione)

Nella sesta etichetta denominata “Caratteristiche commerciali” vengono fornite informazioni di varie tipologie tra cui la componente nutrizionale in riferimento agli acidi grassi espressa come valore medio di acidi grassi saturi e acidi grassi insaturi, con una specifica degli acidi grassi polinsaturi omega-3 ed omega-6 presente per ciascuna specie. (figura 4.26) Vengono anche riportate le tipologie commerciali di vendita della specie (es. fresco, congelato etc.) e la taglia minima di pesca.

Classificazione tassonomica	Nomi Comuni	Tracciati IEF	Sequenze	Distribuzione	Caratteristiche commerciali	Sicurezza e Frode
<p><i>Diplodus annularis</i></p> <p>Caratteristiche delle carni: Carni magre, bianche, sode, meno apprezzate degli altri <i>Diplodus</i>.</p> <p>La componente nutrizionale in riferimento agli acidi grassi (valore medio) è di:</p> <ul style="list-style-type: none"> -acidi grassi saturi: 37% -acidi grassi insaturi: 63% <p>Tra gli acidi grassi polinsaturi troviamo una percentuale pari al 13% di Omega 3 e 1% di Omega 6</p> <p>Taglia minima di pesca: 12 cm (Reg. CE n. 1967/2006)</p> <p>Tipologie commerciali: viene commercializzata fresca, congelata.</p>						

Figura 4.26: componente nutrizionale di *Diplodus annularis* (Sarago sparaglione)

Infine come ultima etichetta denominata “Sicurezza e Frode” vengono inserite per ogni specie le possibili frodi di sostituzione che può subire quella specifica specie e in determinate specie ittiche vengono anche indicate possibili note di sicurezza alimentare come ad esempio parassitosi o eventuali allergeni. (figura 4.27)

Classificazione tassonomica	Nomi Comuni	Tracciati IEF	Sequenze	Distribuzione	Caratteristiche commerciali	Sicurezza e Frode
<p><i>Diplodus annularis</i></p> <p>Frode di sostituzione:</p> <p>sostituzione con altri pesci del genere <i>Diplodus</i>, di maggior pregio.</p> <p>Se presente in forma intera, caratteristica differenziale rispetto ad altri <i>Diplodus</i> è il colore giallastro delle pinne e la macchia nera che ricopre ad anello il peduncolo caudale, da cui il nome di questa specie.</p> <p>Note di sicurezza alimentare:</p> <p>per la robustezza della cute e la forma compressa sui lati, il sarago sparaglione ha una buona durata a temperatura di refrigerazione.</p>						

Figura 4.27: frode di sostituzione di *Diplodus annularis* (Sarago sparaglione)

4.5 Sviluppo nel campo delle metodiche biomolecolari di tecniche ad hoc per indagare le sostituzioni di specie.

Analisi HRMA e genere *Thunnus*

L'utilizzo di metodiche biomolecolari può risolvere il problema legato all'identificazione di specie in prodotti lavorati e trasformati; il DNA consente una discriminazione specifica tra specie e resiste agli stress termici durante la trasformazione dei cibi. Lo sviluppo di questa parte della ricerca, che ha portato anche ad un lavoro di tesi^[71], è stato la messa a punto e l'utilizzo di un metodo di analisi sfruttando l'*High Resolution Melt Analysis* (HRMA) per l'identificazione di specie ittiche a sostegno della lotta alle frodi commerciali per sostituzione di specie; tale metodica è stata applicata ad un gruppo di pesci particolarmente soggetto a frode, ovvero il genere *Thunnus* (figura 4.28). Lo sviluppo di un metodo identificativo di specie ittiche mediante *High Resolution Melt Analysis*, una tecnica biomolecolare per la rivelazione di mutazioni, polimorfismi e differenze epigenetiche in campioni anche geneticamente molto simili, è stato scelto in quanto è una metodica di semplice applicazione in campo routinario, affidabile, economica, veloce e che può essere svolta in qualsiasi laboratorio dotato di strumentazione per analisi in PCR *Real-time*. Il lavoro, è stato incentrato sulla discriminazione delle otto diverse specie che compongono il genere *Thunnus*, ovvero *Thunnus alalunga*, *Thunnus albacares* (comunemente detto tonno pinna gialla), *Thunnus atlanticus*, *Thunnus maccoyii*, *Thunnus obesus*, *Thunnus orientalis*, *Thunnus thynnus* (conosciuto come tonno rosso) e *Thunnus tonggol*, con particolare riguardo per le due specie con maggior valore commerciale sul mercato nazionale, *Thunnus thynnus* e *Thunnus albacares*. Tramite lo studio *in silico* è stato possibile disegnare quattro coppie di *primers* denominate rispettivamente DIS, THY, ALOR e ATTO. In particolare si è potuto effettuare una “indagine primaria” mediante l'utilizzo della coppia di *primers* DIS, la quale possiede la capacità di dividere le otto specie appartenenti al genere *Thunnus* in due gruppi distinti: *T. thynnus*, *T. obesus* e *T. maccoyii* che appartengono al primo gruppo; *T. albacares*, *T. tonggol*, *T. atlanticus*, *T. alalunga* e *T. orientalis* per il secondo gruppo. Successivamente è stata eseguita una “indagine secondaria” mediante l'utilizzo delle coppie di *primers* THY, ALOR e ATTO. La coppia di *primers* THY riesce ad individuare con esattezza nel primo gruppo precedentemente analizzato, solamente la specie di *Thunnus thynnus*. Le coppie di *primers* ALOR e ATTO hanno la capacità di discriminare rispettivamente *T. alalunga* – *T. orientalis* e *T. atlanticus* – *T. tonggol*, nel secondo gruppo riuscendo così ad individuare indirettamente ma con

esattezza *T. albacares*. Bisogna comunque precisare che le simulazioni realizzate “*in silico*” presentano delle limitazioni dovute alle inevitabili semplificazioni adottate nel modello fisico-matematico utilizzato per il calcolo virtuale del risultato. Una problematica sorta durante questo lavoro è stata l’impossibilità di reperire campioni per tutte le specie che compongono il genere *Thunnus*, in quanto esse possiedono zone di cattura assai diversificate e alcune specie non arrivano sui mercati italiani. Le prove effettuate dimostrano come le coppie di *primers* abbiano risposto in maniera leggermente diversa rispetto ai risultati attesi. In particolare la coppia di *primers* DIS non ha prodotto una netta divisione in due gruppi delle diverse specie. Al contrario le due specie che hanno formato un *cluster* sono state *Thunnus thynnus* e *Thunnus albacares*. Anche la coppia di *primers* THY non ha dato i risultati attesi *in silico* in quanto vi sono amplificazioni aspecifiche che dimostrano la mancata esclusività di questa coppia di *primers* nel riconoscere la specie *Thunnus thynnus*. Da ricordare però che, con l’utilizzo della coppia di *primers* DIS, esiste la possibilità di separare *Thunnus thynnus* da *Thunnus alalunga* ma non da *Thunnus albacares*. Associando a questa analisi “primaria” l’utilizzo della coppia di *primers* THY si avrà quindi la possibilità di distinguere *Thunnus thynnus* da *Thunnus albacares*, permettendo indirettamente di individuare in maniera specifica *Thunnus thynnus* e *Thunnus albacares*. La coppia di *primers* ALOR ha fornito i risultati attesi *in silico*, infatti gli unici campioni che hanno subito amplificazione sono stati quelli appartenenti alla specie *Thunnus alalunga*. La coppia di *primers* ATTO è stata testata solo *in silico*. In conclusione, questo lavoro ha fornito uno strumento utile in ambito diagnostico per l’identificazione certa di *Thunnus thynnus*, *Thunnus albacares* e *Thunnus alalunga*, nonché le basi per lo sviluppo di un metodo per la discriminazione più precisa di tutte le specie appartenenti al genere *Thunnus*. Lo schema riportato in figura 4.29 riassume il lavoro fatto ed i risultati ottenuti.

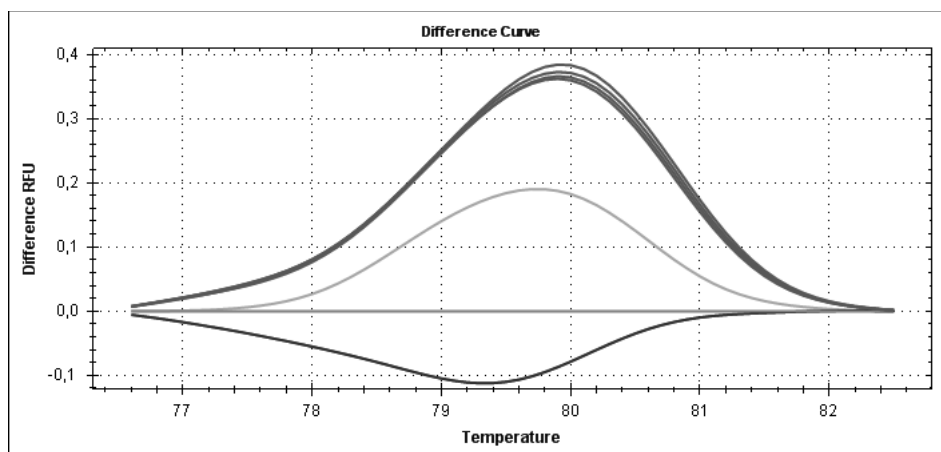


Figura 4.28: curve di *Melting* ottenute dalla Real-Time PCR (HRMA) e genere *Thunnus*

- in VERDE le curve di *Melting* di *Thunnus alalunga*
- in ARANCIO la curva di *Melting* di *Thunnus sp.*
- in ROSA la curva di *Melting* di *Thunnus thynnus*
- in BLU la curva di *Melting* di *Thunnus albacore*

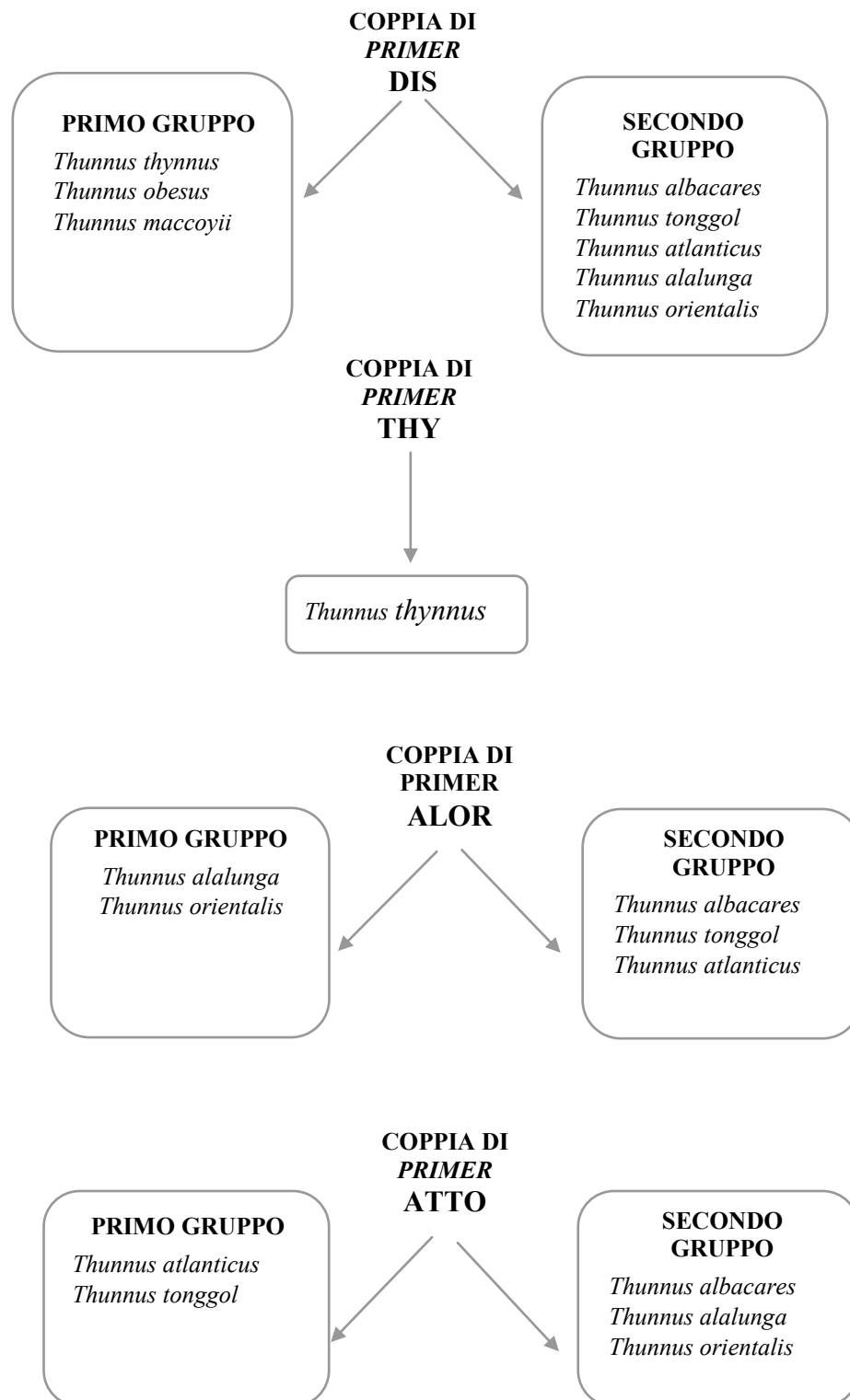


Figura 4.29: schema riassuntivo delle divisioni di specie del genere *Thunnus* effettuate da ogni coppia di *primers* in analisi.

PCR *Real-time* ed identificazione di *Octopus vulgaris* (Polpo)

Una seconda tecnica sviluppata ad hoc per l'identificazione di specie e che ha permesso la stesura di una tesi ^[72], è una metodica rapida ed affidabile per l'identificazione di *Octopus vulgaris* (Polpo) rispetto alle altre specie appartenenti al genere *Octopus* e *Amphioctopus* di minor valore commerciale con le quali il polpo è spesso sostituito. La metodica di riconoscimento è stata sviluppata attraverso la tecnica PCR *Real-Time*, in quanto richiede tempistiche più brevi, rispetto al tradizionale *Barcoding*. La metodica consiste nella discriminazione attraverso lo studio delle curve di amplificazione tra *Octopus vulgaris* e le altre specie di cefalopodi con i quali questo può essere sostituito. Per la messa a punto della metodica si è valutato fin da subito di utilizzare il gene mitocondriale COI come sequenza genica sulla quale costruire i *primers*. È stata fatta questa scelta in quanto la sequenza di questo gene è depositata nei database pubblici per quasi tutte le specie analizzate. Come riscontrato da Debenedetti et al.^[73] uno dei problemi incontrati durante l'identificazione dei campioni utilizzati come standard per la messa a punto della metodica è stata l'identificazione della specie *Octopus membranaceus* per la quale non erano mai state depositate sequenze per l'identificazione di specie attraverso il *Barcoding*. Grazie all'identificazione morfologica di alcuni esemplari di *Octopus membranaceus* e all'identificazione molecolare attraverso il gene CytB (Citocromo B), è stato possibile ricavare le sequenze del gene Citocromo Ossidasi I (COI) e depositarle in GenBank[®].

Da questo problema riscontrato durante lo svolgimento della messa a punto emerge la necessità di mantenere i database aggiornati, riempiendo i gap ancora presenti per alcune specie meno studiate.

Tutte le sequenze del gene COI delle specie prese in esame sono state allineate tra di loro e studiate al fine di trovare una zona su cui disegnare dei *primers* adatti a distinguere tra le varie specie considerate.

Inizialmente l'obiettivo era quello di sviluppare una metodica *High Resolution Melting Analysis* (HRMA) che consiste nello studio dell'andamento delle curve di melting in alta risoluzione dopo l'amplificazione dei campioni con metodica PCR *Real-Time* e l'uso di intercalante fluorescente adatto al tipo di analisi finale. Il forte polimorfismo inter e intra specifico non ha permesso tuttavia la distinzione attraverso lo studio dell'andamento delle curve di *melting*. Lo studio delle curve di amplificazione ha però dimostrato che la metodica permette di distinguere *Octopus vulgaris* da tutte le altre specie di cefalopodi testate. Infatti tutti i campioni identificati attraverso il *Barcoding*, appartenenti alla specie *Octopus vulgaris*, formano un cluster di curve che ha come Ct medio 20 e come Ct

massimo (cut-off) 30. Grazie a ciò quindi è possibile capire, nel breve tempo di una reazione di PCR *Real-Time* se il campione sottoposto all'analisi è o meno *Octopus vulgaris*. Un altro dei problemi riscontrato con il *Barcoding* è stato l'impossibilità di sequenziare 2 campioni dei 77 analizzati. Questo problema è probabilmente dovuto alla degradazione del DNA dei campioni a causa di processi di cottura o di abbassamento del pH del prodotto attraverso l'aggiunta di ingredienti acidificanti. Tali campioni sono stati estratti più volte in condizioni differenti, riducendo il tempo di lisi e mantenendo il tessuto in etanolo per 30 minuti per eliminare eventuali grassi presenti che fungono da inibitori della reazione di amplificazione. Nonostante questi accorgimenti i campioni si sono rivelati non amplificabili. Tuttavia nella prova in PCR *Real-Time* sono stati amplificati con Ct superiori a 30. Questo probabilmente è dovuto al fatto che l'amplificato, essendo molto piccolo (120pb), ha meno probabilità di essere danneggiato di un frammento più lungo come quello del gene COI amplificato in PCR *end-point* che misura circa 650pb. Il problema riscontrato nei due campioni non amplificabili potrebbe essere superato attraverso il *PyroSequencing* che permette il sequenziamento di amplificati molto più piccoli rispetto al metodo Sanger. Dunque attraverso il sequenziamento dell'amplicone ottenuto con i *primers* *Vulgarix* utilizzati in PCR *Real-Time* in questo lavoro, potrebbe essere possibile superare problemi derivanti dalla difficoltà di amplificare sequenze molto lunghe da estratti molto degradati.

In seguito alla messa a punto della metodica e utilizzando i campioni identificati tramite *Barcoding*, si è voluta fare un'indagine di territorio per valutare la percentuale di frodi sui prodotti preparati e trasformati contenenti cefalopodi della famiglia *Octopodidae*.

I prodotti analizzati sono stati prelevati nei supermercati di quattro province (Venezia, Rovigo, Trento e Ferrara) e analizzati attraverso la metodica messa a punto e attraverso il *Barcoding*. Il *Barcoding* è stato utilizzato come metodica di confronto per valutare l'attendibilità dell'analisi fatta con PCR *Real-time*. I test statistici effettuati per il confronto e la valutazione della concordanza tra il Gold standard e la metodica di riconoscimento messa a punto in questo lavoro hanno rilevato l'attendibilità della prova in esame. L'utilizzo quindi della soglia proposta (il Ct di Cut-off pari a 30) per l'interpretazione dei risultati ottenuti in PCR *Real-Time* può essere applicato anche ai prodotti che hanno subito processi tecnologici e non esclusivamente ai prodotti freschi impiegati per la messa a punto del metodo.

Inoltre le prove effettuate per l'analisi dei fattori di rischio frode hanno rilevato che le variabili correlate alla frode commerciale di *Octopus vulgaris* sono la specie dichiarata e

l'area di pesca. In modo particolare l'aumento del rischio è associato ai prodotti dichiarati *O. vulgaris* e ai prodotti in cui l'area di pesca non è dichiarata. Da queste analisi statistiche è emerso anche che l'errore di etichettatura associato alla specie dichiarata supera in proporzione la frode su *Octopus vulgaris*. Questo dato conferma quanto osservato anche nel lavoro di Espiñeira et al.^[74]

Come riportato nell'articolo 8 del Regolamento (CE) N. 2065/2001 “le informazioni richieste per quanto riguarda la denominazione commerciale, il metodo di produzione e la zona di cattura devono essere disponibili ad ogni stadio di commercializzazione della specie interessata. Queste informazioni e la denominazione scientifica della specie di cui si tratta sono fornite mediante l'etichettatura o l'imballaggio del prodotto oppure mediante un qualsiasi documento commerciale di accompagnamento della merce, compresa la fattura”.

Considerati i dati di questo lavoro, 25 dei 77 prodotti analizzati non riportavano l'area di pesca. Inoltre sono state svolte tutte le prove riguardanti la fase analitica o preclinica ossia la prova di sensibilità analitica, specificità analitica, ripetibilità intra-laboratorio. Per quanto riguarda la fase diagnostica o clinica sono stati testati i campioni acquistati nei supermercati, considerati come campioni di campo, ed è stato condotto il test statistico del calcolo del parametro Kappa di Cohen e il test di McNemar per la valutazione dell'accuratezza diagnostica della sensibilità e specificità della prova posta in esame rispetto al *Barcoding*. La metodica messa a punto si è rivelata robusta in quanto nelle quattro prove di specificità fatte in giorni e con campioni diversi il risultato è stato riproducibile. Una volta messa a punto la metodica e verificata la robustezza, è stato possibile valutare statisticamente che la prova ha il 100% di specificità e l'80% di sensibilità rispetto ai risultati ottenuti con l'analisi *Barcoding* utilizzata come Gold standard.

I limiti principali di questa metodica consistono nel fatto che è possibile discriminare una sola specie dalle altre presenti nel mercato. Per fornire un rapporto di prova dettagliato è necessario dunque ricorrere al *Barcoding* nel caso in cui il campione in esame abbia un valore di Ct superiore a 30. Inoltre è stato visto che quattro campioni identificati come *Octopus vulgaris* dal *Barcoding* avevano Ct superiore a 30. Questa evenienza non rappresenta un problema in quanto i campioni con Ct maggiore di 30 vengono sempre sequenziati.

L'analisi di mercato ha rivelato un'alta percentuale di frode per quanto riguarda *Octopus vulgaris*. Su 77 prodotti analizzati infatti 41 dichiaravano di contenere *Octopus vulgaris* o Polpo. Le analisi hanno rivelato che 21 di questi (27,3%) in realtà contenevano altre specie

in modo particolare *Octopus cyanea*. I prodotti in cui è più probabile trovare una frode di sostituzione sono i prodotti trasformati. Dei 41 prodotti dichiarati *Octopus vulgaris* infatti 26 erano trasformati e 15 preparati. Nei trasformati la frode è pari a 65,4% e nei prodotti preparati 26,7%. Questo potrebbe essere dovuto al fatto che i prodotti trasformati in questo caso sono spesso venduti a pezzi o come carpacci. È perciò impossibile, se non con tecniche molecolari, rilevare la specie contenuta nel prodotto. Il *Barcoding* inoltre ha permesso di rilevare la presenza di una forte percentuale di *mislabeled* ossia di errore di etichettatura dei prodotti.

Su 36 prodotti con dichiarata in etichetta una specie diversa da *Octopus vulgaris*, quindi di minor pregio e di costo inferiore, 13 contenevano una specie diversa da quella dichiarata (36,2%). Questo dato è stato osservato solo grazie all'analisi del gene COI che continua ad essere il metodo più attendibile per l'identificazione di specie. I risultati ottenuti dall'analisi di mercato vengono riportati in figura 4.30 ed in tabella 4.17

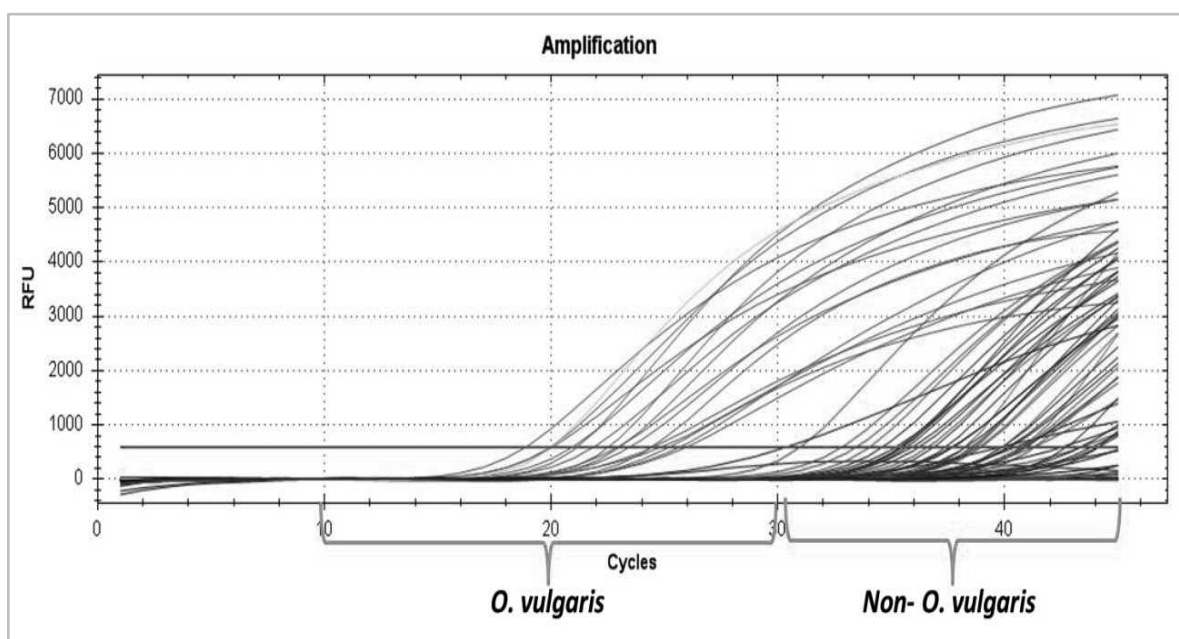


Figura 4.30: Analisi dei prodotti acquistati nei supermercati:

- in rosso i campioni frodati
- in verde i campioni di *O.vulgaris*
- in blu i campioni appartenenti ad altre specie di Octopodidae
- in verde chiaro il campione positivo di riferimento

		Barcoding												
		<i>O. vulgaris</i>	<i>O. cyanea</i>	<i>O. maya</i>	<i>O. membranaceus</i>	<i>O. punctatus</i>	<i>C. indicus</i>	<i>A. aegina</i>	<i>A. marginatus</i>	<i>C. minor</i>	<i>C. tawainicus</i>	<i>D. gigas</i>	Non- <i>O. vulgaris</i>	totale
Dichiarato	<i>O. vulgaris</i>	20	12	2			1		1	2		1	2	41
	<i>O. cyanea</i>		16					1						17
	<i>O. dolfusi</i>				1			1						2
	<i>O. maya</i>	1		4										5
	<i>O. membranaceus</i>		1				1	1	1		3			7
	<i>O. punctatus</i>		1			2								3
	<i>C. indicus</i>										1			1
	<i>A. aegina</i>							1						1
	totale	21	30	6	1	2	2	4	2	2	4	1	2	77

Legenda

- Campioni etichettati correttamente
- Frodi di sostituzione che comportano danno economico
- Errori di etichettatura

Tabella 4.17: confronto tra specie dichiarata in etichetta e risultato dell'analisi di *Barcoding*

rtPCR ed identificazione di specie ittiche in prodotti trasformati ed in miscele.

I prodotti oggetto di studio in questo lavoro ^[75] sono prevalentemente composti da specie di merluzzo appartenenti alle famiglie *Gadidae* e *Merlucciidae*. In particolare, alcune delle specie appartenenti a queste famiglie sono considerate di grande pregio grazie alle loro proprietà organolettiche e di consistenza delle carni. L'esempio più rilevante è rappresentato dalla specie della famiglia *Gadidae*, *Gadus morhua* (Merluzzo nordico), utilizzato nella preparazione di prodotti tipici della cucina italiana come il baccalà e lo stoccafisso.^[76]

Lo studio condotto è volto allo sviluppo di metodi basati sull'uso della PCR *Real-Time* (rtPCR) al fine di identificare rapidamente ed efficacemente le due famiglie target e la specie *G. morhua* in prodotti i cui processi di lavorazione abbiano portato alla perdita dell'integrità anatomica, rendendo quindi impossibile un riconoscimento a livello morfologico della specie. Per fare ciò è stato pensato l'utilizzo di due set di *primers*, uno specifico per *Merlucciidae* e uno per *Gadidae*, con la possibilità di disegnare una sonda specifica per *G. morhua*.

L'approccio sperimentale ha previsto una ricerca bibliografica per capire le strategie adottate fino ad oggi per affrontare il problema. A riguardo sono stati pubblicati molti lavori che prevedono l'utilizzo di PCR seguita da RFLP, uno dei quali propone una coppia

di *primers* specifica per la famiglia *Merlucciidae* (MERFPD1/GADRPD1) basato sull'amplificazione della regione di controllo(HV)dell'mtDNA.^[77]

Per valutare l'applicabilità del lavoro svolto nell'articolo, come prima cosa è stato effettuato uno studio *in silico* in cui, grazie al programma MEGA 6^[52], sono state create le sequenze consenso per ciascuna specie appartenente al target, a loro volta allineate in un unico file. Per verificare la specificità dei *primers* per questa famiglia, sono stati creati allineamenti anche per i *Gadidae*. I *primers* sono stati quindi allineati con i consensi delle due famiglie ed è stato scoperto che il *primer reverse* non presentava specificità esclusivamente per il target. Per questo motivo, questo *primer* è stato modificato per renderlo maggiormente specifico. Ne è risultata la creazione del *reverse* ROSS-REV.

La specificità del *primer* è stata verificata creando allineamenti contenenti un grande numero di sequenze di specie ittiche non appartenenti alle famiglie oggetto di studio.

I *primers* sono stati testati in PCR *Real-Time* su campioni noti di *Merlucciidae*, *Gadidae* e "altre specie o non target" ed hanno mostrato una buona specificità per la famiglia *Merlucciidae*, tuttavia sono avvenute amplificazioni anche per due campioni noti non target, *Thunnus albacares* e *Salmo salar*. Nonostante ciò, considerato che la curva di *Melting* del campione di *Thunnus albacares* risulta facilmente distinguibile da quelle specifiche e che il colore delle carni dei due falsi positivi li rende candidati estremamente improbi per una frode, la presenza delle due amplificazioni è stata considerata poco rilevante ai fini della valutazione della specificità.

I *primers* sono stati quindi testati su miscele appositamente create in laboratorio al fine di verificare quale fosse la minima concentrazione rilevabile di *Merlucciidae* in un mix di pesce. Le prove hanno mostrato la capacità del metodo di rilevare il target fino a concentrazioni pari al 5%. La stessa prova è stata condotta sulle medesime preparazioni dopo averle sottoposte a trattamento termico di cottura, il quale non ha provocato variazioni di sensibilità.

Per quanto riguarda invece la messa a punto della metodica per identificare la famiglia *Gadidae*, la ricerca bibliografica ha suggerito di prendere in considerazione il gene CytB (Citocromo B) presente nell'mtDNA. Come fatto per lo studio *in silico* dei *Merlucciidae*, sono state create le sequenze consenso di tutte le specie *Gadidae* in esame ed allineate assieme a quelle dei *Merlucciidae*. Lo studio *in silico* condotto è stato eseguito valutando diversi geni come citocromo ossidasi I (COI), 16S e la regione di controllo (HV). Quest'ultima è stata ritenuta più utile allo scopo e, visionando gli allineamenti creati precedentemente per questa porzione genica durante lo sviluppo della metodica per

Merlucciidae, sono state trovate regioni sufficientemente conservate all'interno della famiglia *Gadidae* sulle quali è stato possibile disegnare un set di *primers* specifico (Forfb-new2/fb_rev). Inoltre, all'interno della sequenza amplificata dai *primers* è stata cercata una regione variabile a livello intraspecifico, sulla quale è stata disegnata una sonda (SPLID) specifica per l'amplificazione di *G. morhua*. Anche in questo caso è stata valutata la capacità discriminatoria degli oligonucleotidi creati mediante l'analisi di allineamenti contenenti un grande numero di specie ittiche target e non.

I *primers* Forfb-new2/fb_rev sono stati utilizzati per analizzare tutti i campioni di *Gadidae*, *Merlucciidae* ed "altre specie". Si può affermare che la metodica è specifica per *Gadidae*, in quanto è possibile riconoscere e distinguere facilmente le amplificazioni di *Merlucciidae* e "altre specie" da quelle target. La metodica è stata testata anche su miscele appositamente create ed è risultata efficace a tutte le concentrazioni, mostrando curva di amplificazione specifica anche nella miscela costituita da 1% di *Gadidae* e 99% di *Merlucciidae*. Le curve di amplificazione di alcune prove effettuate per la famiglia *Gadidae* e *Merlucciidae* vengono indicate in figura 4.31 ed in figura 4.32.

La metodica messa a punto per l'identificazione di *Gadus morhua* con Forfb-new2/fb_rev e la sonda SPLID è stata testata su tutti i campioni *Gadidae* oggetto delle analisi, ed ha mostrato specificità esclusiva per la specie target. Questa metodica è stata testata anche su miscele appositamente create costituite da diverse percentuali di *G. morhua* e altre specie ittiche, mostrando specificità per il target fino alla concentrazione più bassa, rappresentata da 1% *G. morhua* in 99% di aspecifici.

Per dare robustezza al metodo è stata condotta un'indagine di mercato su 50 campioni comprendenti filetti, burger e macinati panati, medaglioni di macinato con spezie, preparazione della gastronomia quali baccalà. I risultati hanno mostrato l'inefficacia della metodica *Barcoding* in alcuni casi particolari, come ad esempio i prodotti sottoposti a forti trattamenti termici, problema non riscontrato utilizzando le tre metodiche messe a punto. Questo è dovuto al fatto che i target selezionati per il disegno dei *primers* sono di dimensioni sufficientemente piccole da essere efficaci anche in prodotti estremamente degradati, fornendo così strumenti utili ed efficaci per l'identificazione di specie ittiche in prodotti trasformati. Un altro punto di forza messo in luce da questa indagine di mercato è stata la capacità di identificare correttamente la co-presenza delle due famiglie, cosa impossibile mediante *Barcoding*. In conclusione, i risultati ottenuti dimostrano che le metodiche biomolecolari proposte possono essere un ulteriore contributo per la diagnostica di laboratorio con metodi rapidi, robusti ed efficaci per l'identificazione di *Gadidae*,

Merlucciidae e *Gadus morhua* in prodotti freschi, preparati e trasformati, nonché in miscele a base di questi pesci.

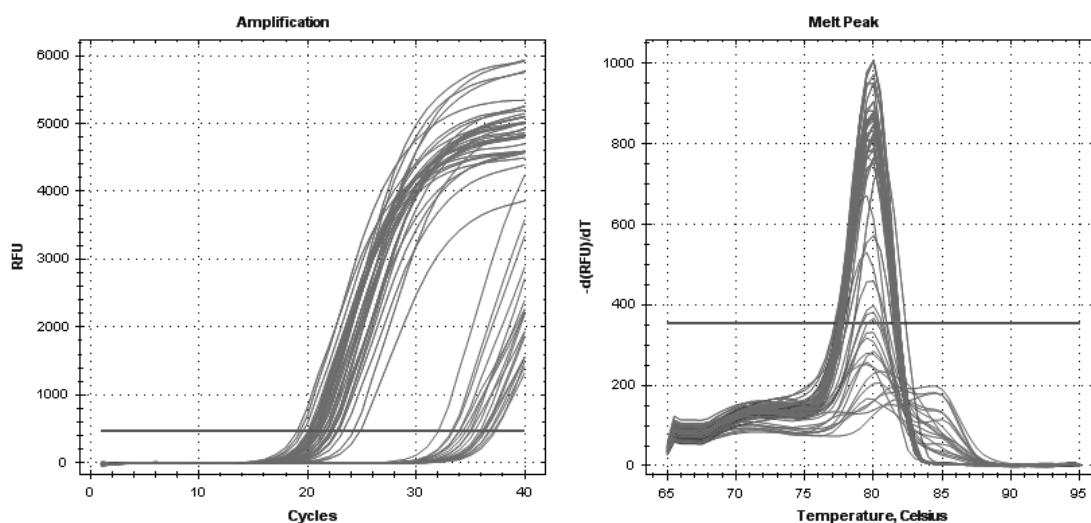


Figura 4.31: curve di amplificazione e derivate delle curve di denaturazione per i campioni *Gadidae* (rosso) e aspecifici (azzurro).

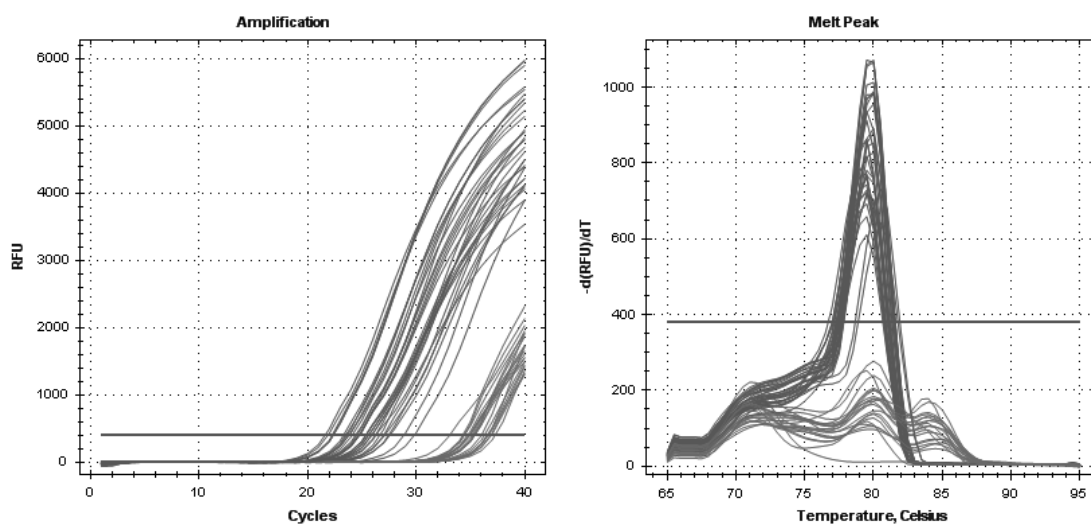


Figura 4.32: curve di amplificazione e derivate delle curve di denaturazione per i campioni *Merlucciidae* (verde) e aspecifici (azzurro).

5. CONCLUSIONI

Acido eicosapentaenoico e acido docosaesaenoico o semplicemente EPA e DHA: sono i nomi scientifici dei due principali acidi grassi polinsaturi appartenenti agli omega-3, che insieme ad altri acidi grassi insaturi sono stati studiati in questo lavoro per i loro effetti benefici. Entrambi sono essenziali perché, come altri acidi grassi insaturi, servono come componenti delle membrane delle cellule e come precursori di molte sostanze che regolano le funzioni dell'organismo agendo sul sistema cardiovascolare, renale ed immunitario.

Uno dei maggiori alimenti di origine animale a contenere omega-3 è il pesce.

Da queste informazioni è iniziato questo progetto di ricerca che ha portato alla valutazione dei profili lipidici di diverse specie ittiche, presenti nei nostri mercati nazionali. Si è però deciso di allargare lo studio con una maggiore caratterizzazione del prodotto andando a combinare le analisi genetiche con le analisi chimiche sulle singole specie ittiche.

La prima parte del progetto ha visto il campionamento di numerosi esemplari appartenenti a diverse specie ittiche, la loro identificazione morfologica ed una successiva classificazione numerica e fotografica.

Sono iniziate le analisi genetiche con la tecnica di *Barcoding* per ciascun esemplare campionato. L'identità (genere e specie) per ciascun campione, riscontrata attraverso le analisi biomolecolari, ha confermato i risultati preliminari dell'identificazione morfologica. Sulle sequenze ottenute è stato fatto uno studio di variabilità genetica andando ad osservare come questa potesse essere presente in un gene altamente conservato come il citocromo ossidasi I. In effetti si è riscontrata una discreta variabilità delle diverse specie, la specie con maggiore variabilità è stata la Sardina, a seguire il Tombarello ed il Pesce sciabola. Con assenza di variabilità è il Tonno rosso, ma ciò conferma i dati presenti anche in altri lavori ^[54]; questa assenza di variabilità porta alla difficoltà della tecnica di *Barcoding* di andare a identificare correttamente le specie del genere *Thunnus*.

Gli stessi campioni analizzati geneticamente sono stati sottoposti ad analisi gascromatografica per lo studio della componente lipidica. I risultati sono stati molto interessanti, in molte specie come Sardina, Tonno Alalunga, Sgombro e Tombarello il DHA ha un range tra il 19% ed il 22% confermando i risultati di altri studi di inserire queste categorie di pesce nella dieta per un corretto apporto di omega-3. Dato altrettanto interessante e non atteso è stato l'alto contenuto (range tra il 2% ed il 8%) dell'acido linolenico, precursore di EPA e DHA, nelle specie d'acqua dolce come Temolo, Vairone

ed Agone; ciò suggerisce una maggiore valorizzazione di queste specie ittiche all'interno della dieta attraverso un incremento di informazioni nei confronti del consumatore finale.

Infine sono stati analizzati tutti i dati ottenuti tramite GC-MS delle varie specie ittiche e si è proceduto con la determinazione della PCA. Nell'analisi delle componenti principali si osserva in generale la formazione di cluster ben definiti e caratterizzanti per ciascuna specie, per alcune specie come Temolo, Sgombro e Sardina i cluster sono ben definiti e compatti, per altre specie come Tonno rosso il cluster diventa più ampiamente distribuito; ciò può essere legato alla presenza di diversi areali di pesca ed alla taglia diversamente omogenea per alcune specie.

I campioni appartenenti alla famiglia *Scombridae* (Sgombro, Tonno rosso, Alalunga e Biso) sono stati analizzati anche per uno studio preliminare sugli isotopi stabili del carbonio e dell'azoto. L'obiettivo è stato di studiare come la combinazione tra profili degli acidi grassi e misurazioni isotopiche potessero essere un nuovo strumento per la tracciabilità e caratterizzazione di queste specie. Il *Barcoding* non riesce ad essere discriminante per il genere *Thunnus* mentre l'applicazione combinata degli isotopi stabili di carbonio ed azoto e dei profili degli acidi grassi, può superare il gap delle analisi genetiche. Infatti, l'approccio analitico integrato tra gli isotopi e acidi grassi, in questo lavoro ha mostrato una buona discriminazione delle specie e una separazione geografica spaziale nei due più grandi predatori *Thunnus alalunga* e *Thunnus thynnus*.

Tutte le informazioni derivate dalle diverse analisi: le sequenze genetiche di ciascun esemplare e la componente lipidica di ogni specie sono state inserite nel database informatico ITTIOWBASE. Queste informazioni sono rivolte ad un pubblico ampio di consumatori, l'informazione è libera e di facile accesso ad ognuno; ciò permette di estendere i risultati scientifici di questo studio direttamente in un'applicazione pratica e versatile che può essere utilizzata come strumento sia da personale qualificato e sia dal consumatore finale.

Infine nel corso della ricerca, un ramo collaterale è stato lo sviluppo e la messa a punto nel campo delle metodiche biomolecolari di tecniche *ad hoc* per indagare le sostituzioni di specie più frequenti; con particolare attenzione a tre grosse famiglie *Scombridae*, *Gadidae-Merlucciidae* e *Octopodidae*. Tecniche di HRMA ed di PCR *Real-time* hanno avuto successo per una corretta identificazione di prodotti ittici freschi, trasformati e di miscele nei diversi ambiti con risvolti pratici attraverso indagini di mercato che hanno portato in taluni casi a scoprire delle non conformità nell'etichettatura dei prodotti o addirittura delle sostituzioni di specie.

6. BIBLIOGRAFIA

[1] D.M. del 8 settembre 1999, n.350. Regolamento recante norme per l'individuazione dei prodotti tradizionali di cui all'articolo 8, comma 1, del decreto legislativo 30 aprile 1998, n. 173.

[2] ISMEA (2015). Tendenze – Ittico; Report n.4/2015 - Ottobre 2015

[3] ISMEA (2016). I consumi domestici delle famiglie italiane tra gennaio-settembre 2016; Report n.4/2016 – novembre 2016.

[4] Regolamento (CE) 853/2004, Allegato 1, che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale. G.U.C.E n. L139/55 del 30.4.2004

[5] Regolamento (CE) 104/2000. Relativo all'organizzazione comune dei mercati nel settore dei prodotti della pesca e dell'acquacoltura. G.U.C.E n. L17/22 del 21.1.2000

[6] Regolamento (CE) 2065/2001. Per quanto concerne l'informazione dei consumatori nel settore dei prodotti della pesca e dell'acquacoltura. G.U.C.E. n. L278 del 23.10.2001

[7] Regolamento (CE) 178/2002. Che stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare. G.U.C.E n. L31/1 del 1.02.2002

[8] Regolamento (UE) N. 1169/2011 del Parlamento europeo e del consiglio del 25 ottobre 2011 relativo alla fornitura di informazioni sugli alimenti ai consumatori, che modifica i regolamenti (CE) n. 1924/2006 e (CE) n. 1925/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio.

[9] Regolamento (UE) 1379/2013. Relativo all'organizzazione comune dei mercati nel settore dei prodotti della pesca e dell'acquacoltura, recante modifica ai regolamenti (CE) n.

1184/2006 e (CE) n. 1224/2009 del Consiglio e che abroga il regolamento (CE) n. 104/2000 del Consiglio

[10] Bradberry, J. C., & Hilleman, D. E. (2013). Overview of Omega-3 Fatty Acid Therapies. *Pharmacy and Therapeutics*, 38(11), 681–691.

[11] Sushchik, N. N., Gladyshev, M. I., Makhutova, O. N., Kalachova, G. S., Kravchuk, E. S., & Ivanova, E. A. (2004). Associating particulate essential fatty acids of the ω 3 family with phytoplankton species composition in a Siberian reservoir. *Freshwater Biology*, 49(9), 1206-1219.

[12] Pushparaj, B., Buccioni, A., Paperi, R., Piccardi, R., Ena, A., Carlozzi, P., & Sili, C. (2008). Fatty acid composition of Antarctic cyanobacteria. *Phycologia*, 47(4), 430-434.

[13] Priyadarshani, I., & Rath, B. (2012). Commercial and industrial applications of micro algae—A review. *J algal biomass utln*, 3(4), 89-100.

[14] Schättin A, de Bruin ED. (2016)Combining Exergame Training with Omega-3Fatty Acid Supplementation: Protocol for a Randomized Controlled Study Assessing the Effect on Neuronal Structure/Function in the Elderly Brain.*Front Aging Neurosci*. 29;8:283.

[15] Pu H, Jiang X, Wei Z, Hong D, Hassan S, Zhang W, Shi Y, Chen L, Chen J, et al.(2016) Repetitive and prolonged omega-3fatty acid treatment after traumatic brain injury enhances long-term tissue restoration and cognitive recovery. *Cell Transplant*. doi: 10.3727/096368916X693842

[16] Elaine W-T. Chong, Andreas J. Kreis, Tien Y. Wong, Julie A. Simpson, Robyn H. Guymer (2008)Dietary ω -3 Fatty Acid and Fish Intake in the Primary Prevention of Age-Related Macular Degeneration A Systematic Review and Meta-analysis. *Arch Ophthalmol*.;126(6):826-833. doi:10.1001/archophth.126.6.826

- [17] Dang R, Zhou X, Tang M, Xu P, Gong X, Liu Y, Jiao H, Jiang P. (2017) Fish oil supplementation attenuates neuroinflammation and alleviates depressive-like behavior in rats submitted to repeated lipopolysaccharide. *Eur J Nutr.* doi: 10.1007/s00394-016-1373-z.
- [18] Beermann C, Neumann S, Fußbroich D, Zielen S, Schubert R. (2016) Combinations of distinct long-chain polyunsaturated fatty acid species for improved dietary treatment against allergic bronchial asthma. *Nutrition.*;32(11-12):1165-70. doi: 10.1016/j.nut.2016.04.004
- [19] Barden A, O'Callaghan N, Burke V, Mas E, Beilin LJ, Fenech M, Irish AB, Watts GF, Puddey IB, Huang RC, Mori TA. (2016) n-3 Fatty Acid Supplementation and Leukocyte Telomere Length in Patients with Chronic Kidney Disease. *Nutrients.*;8(3):175. doi: 10.3390/nu8030175.
- [20] Liang P, Henning SM, Schokrpur S, Wu L, Doan N, Said J, Grogan T, Elashoff D, Cohen P, Aronson WJ. (2016) Effect of Dietary Omega-3 Fatty Acids on Tumor-Associated Macrophages and Prostate Cancer Progression. *Prostate.*;76(14):1293-302. doi: 10.1002/pros.23218.
- [21] Alvarez-Curto E, Milligan G. (2016) Metabolism meets immunity: The role of free fatty acid receptors in the immune system. *Biochem Pharmacol.*;114:3-13. doi: 10.1016/j.bcp.2016.03.017. Review.
- [22] Artemis P, Simopoulos MD. (2002) Omega-3 fatty acids in wild plants, nuts and seeds. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, vol. 11, Suppl 2,163–73, doi: 10.1046/j.1440-6047.11.s.6.5.x.
- [23] Tajuddin N, Shaikh A, Hassan A. (2016) Prescription omega-3 fatty acid products: considerations for patients with diabetes mellitus. *Diabetes Metab Syndr Obes.*;9:109-18. doi: 10.2147/DMSO.S97036. Review.
- [24] *NIH Medline Plus*, Medline Plus Herbs and Supplements: Omega-3 fatty acids, fish oil, alpha-linolenic acid.

- [25] Peet M, Brind J, Ramchand CN, Shah S, Vankar GK. (2001) Two double-blind placebo-controlled pilot studies of eicosapentaenoic acid in the treatment of schizophrenia. *Schizophrenia Research*, vol. 49 (3) 243–51, doi:10.1016/S0920-9964(00)00083-9.
- [26] Song C, Zhao S. (2007) Omega-3 fatty acid eicosapentaenoic acid. A new treatment for psychiatric and neurodegenerative diseases: a review of clinical investigations. *Expert Opin Investig Drugs*, vol. 16 (10), 1627–38, doi:10.1517/13543784.16.10.1627
- [27] Hardman WE. (2004) (n-3)Fatty Acids and Cancer Therapy, *J. Nutr*, vol. 134(12),3427S-3430S. PMID 15570049. Review.
- [28] Fernandez E, Chatenoud L, La Vecchia C, Negri E, Franceschi S.(1999) Fishconsumption and cancer risk. *Am J Clin Nutr.*;70(1):85-90. PMID:10393143
- [29] J. A. Conquer, M. C. Tierney e J. Zecevic. (2000)Fatty acid analysis of blood plasma of patients with Alzheimer's disease, other types of dementia, and cognitive impairment. *Lipids*, 35 (12), 1305–1312.
- [30] M. Belkouch, M. Hachem e A. Elgot. (2016).The pleiotropic effects of omega-3 docosahexaenoic acid on the hallmarks of Alzheimer's disease. *J. Nutr Biochem.*, vol. 38(1), 1–11doi:10.1016/j.jnutbio.2016.03.002
- [31] Balci Yuce H, Akbulut N, Ocakli S, Kayir O, Elmastas M. (2017) The effect of commercial conjugated linoleic acid products on experimental periodontitis and diabetes mellitus in Wistar rats. *Acta Odontol Scand.*;75(1), 21-29. doi: 10.1080/00016357.2016.1244355.
- [32] Morise A., Sérougne C., Gripois D., Blouquit M.F., Lutton C., Hermier D. (2004) Effects of dietary alpha linolenic acid on cholesterol metabolism in male and female hamsters of the LPN strain. *J Nutr Biochem*, vol.15(1) 51-61, PMID14711461.
- [33] Rassias G., Kestin M., Nestel P.J. (1991) Linoleic acid lowers LDL cholesterol without a proportionate displacement of saturated fatty acid. *European Journal of Clinical Nutrition*, vol. 45(6), 315-20, PMID1915205.

- [34] Semeraro A. M. (2011). Frodi alimentari: aspetti tecnici e giuridici. *Rassegna di Diritto, Legislazione e Medicina Legale Veterinaria (Corso di Perfezionamento in Diritto e legislazione veterinaria. ANNO X – N. 2 APRILE/GIUGNO 2011) V. 10, N. 2 (2011)*
ISSN: 0300-3485 DOI: <http://dx.doi.org/10.13130//3190>
- [35] Pagliarone C. N. (2012). Aspetti tecnici e legislativi delle frodi alimentari
- [36] Tesi: Biondaro S., Cardazzo B., Zampieron C., (2013). Applicazione della Real-Time PCR per l'identificazione di specie carnee in alimenti.
- [37] Hellberg, R. S. R. and Morrissey, M. T. (2011) Advances in DNA-based techniques for the detection of seafood species substitution on the commercial market. *Journal of laboratory automation* 16, 308–321
- [38] Rasmussen, R. S. and Morrissey, M. T. (2008) DNA-Based Methods for the Identification of Commercial Fish and Seafood Species. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 7, 280–295
- [39] Rehbein, H. (1990) Electrophoretic techniques for species identification of fishery products. *Z Lebensm Unters Forsch* 191, 1–10
- [40] Gallardo, J. M., Sotelo, C. G., Pineiro, C. and Perez-Martin, R. I. (1995) Use of Capillary Zone Electrophoresis for Fish Species Identification. Differentiation of Flatfish Species. *J. Agric. Food Chem.* 43, 1238–1244
- [41] Asensio, L., González, I., Rodríguez, M. A., Hernández, P. E., García, T. and Martín, R. (2004) PCR-ELISA for the semiquantitative detection of Nile perch (*Lates niloticus*) in sterilized fish muscle mixtures. *Journal of agricultural and food chemistry* 52, 4419–4422
- [42] Ward, R. D., Hanner, R., & Hebert, P. D. (2009). The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. *Journal of fish biology*, 74(2), 329-356.

- [43] Dawnay, N., Ogden, R., McEwing, R., Carvalho, G. R. & Thorpe, R. S. (2007). Validation of the barcoding gene COI for use in forensic genetic species identification. *Forensic Science International* 173, 1–6
- [44] Galimberti, A., De Mattia, F., Losa, A., Bruni, I., Federici, S., Casiraghi, M. & Labra, M. (2013). DNA barcoding as a new tool for food traceability. *Food Research International*, 50(1), 55-63
- [45] Alexander DD, Miller PE, Van Elswyk ME, Kuratko CN, Bylsma LC. (2017) A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials and Prospective Cohort Studies of Eicosapentaenoic and Docosahexaenoic Long-Chain Omega-3 Fatty Acids and Coronary Heart Disease Risk. *Mayo Clin Proc.* 92(1), 15-29. doi: 10.1016/j.mayocp.2016.10.018.
- [46] Chmielewska A, Dziechciarz P, Gieruszczak-Białek D, Horvath A, Pieścik-Lech M, Ruszczyński M, Skórka A, Szajewska H. (2016) Effects of prenatal and/or postnatal supplementation with iron, PUFA or folic acid on neurodevelopment: update. *Br J Nutr.* 22,1-6 PMID:26797290
- [47] Hajibabaei M., Singer G. A. C., Hebert P. D. N., Hickey D. A. (2007). DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends in Genetics.* 23(4), 167-72
- [48] Cady N. C., Stelick S., Batt C. A. (2003). Nucleic acid purification using microfabricated silicon structures. *Biosensors and Bioelectronics* 19,59-66
- [49] Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3(5), 294-299
- [50] Gertz, E. M., Yu, Y.-K., Agarwala, R., Schäffer, A. A., & Altschul, S. F. (2006). Composition-based statistics and translated nucleotide searches: Improving the TBLASTN module of BLAST. *BMC Biology*, 4, 41. <http://doi.org/10.1186/1741-7007-4-41>
- [51] Ratnasingham S., Hebert P. D. N. (2007). BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology Notes* 7, 355–364

- [52] Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A. and Kumar, S. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, 30, 2725–2729
- [53] Algoritmo ClustalW: <http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/clustalw/>
- [54] Steven Cadrin, Lisa A. Kerr and Stefano Mariani. Stock Identification Methods *2nd Edition* (2013) ISBN: 9780123970039.
- [55] Sprague M1, Dick JR, Medina A, Tocher DR, Bell JG, Mourente G. (2012) Lipid and fatty acid composition, and persistent organic pollutant levels in tissues of migrating Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*, L.) broodstock. *Environ. Pollut.* 171, 61-71.
doi:10.1016/j.envpol.2012.07.021.
- [56] Bae JH1, Lim SY. (2012) Chemical composition, antiproliferative and antioxidant properties of lipid classes in ordinary and dark muscles from chub mackerel (*Scomber japonicus*). *Food Chem Toxicol.* 50(3-4), 823-8. doi: 10.1016/j.fct.2011.12.038.
- [57] De Leonardis A1, Macciola V. (2004) A study on the lipid fraction of Adriatic sardine filets (*Sardina pilchardus*). *Nahrung.* 48(3), 209-12.
- [58] Pacetti D1, Balzano M, Colella S, Santojanni A, Frega NG. (2013) Effect of spawning on furan fatty acid profile of edible muscle and organ tissues from sardine (*Sardina pilchardus*) and anchovy (*Engraulis encrasicolus*). *J Agric Food Chem.* 61(16), 3969-77. doi: 10.1021/jf400555u.
- [59] Darnaude, A. M. (2005) Fish ecology and terrestrial carbon use incoastal areas: Implications for marine fish production. *J. Anim. Ecol.* 74, 864–876.
- [60] Fortibuoni T, Noventa S, Rampazzo F, Gion C, Formalewicz M, Berto D, Raicevich S. (2013) Evidence of butyltin biomagnification along the Northern Adriatic food-web

(Mediterranean Sea) elucidated by stable isotope ratios. *Environ Sci Technol.* 47(7), 3370-7. doi: 10.1021/es304875b.

[61] Logan, J. M., Rodríguez-Marín, E., Goni, N., Barreiro, S., Arrizabalaga, H., Golet, W., & Lutcavage, M. (2011). Diet of young Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) in eastern and western Atlantic foraging grounds. *Marine Biology*, 158(1), 73-85.

[62] Madigan DJ, Litvin SY, Popp BN, Carlisle AB, Farwell CJ, Block BA. (2012) Tissue turnover rates and isotopic trophic discrimination factors in the endothermic teleost, pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*). *PLoS One.* 7(11) e49220. doi:10.1371/journal.pone.0049220.

[63] Estrada, J.A., Lutcavage, M. & Thorrold, S.R. (2005) Diet and trophic position of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) inferred from stable carbon and nitrogen isotope analysis. *Marine Biology* 147 (37). doi:10.1007/s00227-004-1541-1

[64] Goñi N, Arrizabalaga H (2010) Seasonal and interannual variability of fat content of juvenile albacore (*Thunnus alalunga*) and bluefin (*Thunnus thynnus*) tuna during their feeding migration to the Bay of Biscay. *Prog Oceanogr* 86, 115–123

[65] Laiz-Carrión, R., Quintanilla, J. M., Torres, A. P., Alemany, F., & García, A. (2013). Hydrographic patterns conditioning variable trophic pathways and early life dynamics of bullet tuna *Auxis rochei* larvae in the Balearic Sea. *Marine Ecology Progress Series*, 475, 203-212.

[66] DeNiro MJ, Epstein S. (1978) Influence of the diet on the distribution of the carbon isotopes in animals. *Geochim Cosmochim Acta* 42, 495–506.

[67] Peterson BJ, Fry B. (1987) Stable isotopes in ecosystems studies. *Annu Rev EcolSyst* 18, 293–320.

[68] Logan, J. M., Jardine, T. D., Miller, T. J., Bunn, S. E., Cunjak, R. A., & Lutcavage, M. E. (2008). Lipid corrections in carbon and nitrogen stable isotope analyses: comparison of chemical extraction and modelling methods. *Journal of Animal Ecology*, 77(4), 838-846.

[69] López-López, L., Preciado, I., Villamor, B., Velasco, F., Iglesias, M., Nogueira, E., & Olaso, I. (2012). Is juvenile anchovy a feeding resource for the demersal community in the Bay of Biscay? On the availability of pelagic prey to demersal predators. *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil*, 69(8), 1394-1402.

[70] Pettine, M., Mastroianni, D., Camusso, M., Guzzi, L., & Martinotti, W. (1997). Distribution of As, Cr and V species in the Po-Adriatic mixing area,(Italy). *Marine Chemistry*, 58(3), 335-349.

[71] Tesi: Sartore B., Tosi F., Arcangeli G., Brandolini V. Messa a punto di un metodo per l'identificazione di specie ittiche appartenenti al genere *Thunnus* mediante *High Resolution Melt Analysis* (HRMA)

[72] Tesi: Tiozzo S., Fasolato L., Civettini M., Tosi F., Cardazzo B. Frodi alimentari: sviluppo di una metodica di PCR Real-Time per il riconoscimento rapido di *Octopus vulgaris*.

[73] Debenedetti F., Dalmaso A., Bottero M. T., Gilli M., Gili S., Tepedino V., Civera T. (2014). Utilizzo del DNA Barcoding per il controllo di specie del genere *Octopus*. XXIV Convegno Nazionale dell'Associazione Italiana Veterinari Igienisti

[74] Espiñeira M., Vieites J. M., Santaclara F. J. (2010). Species authentication of octopus, cuttlefish, bobtail and bottle squids (families Octopodidae, Sepiidae and Sepiolidae) by FINS methodology in seafoods. *Food Chemistry* 121, 527–532

[75] Tesi: Biolcati F., Tosi F., Arcangeli G., Civettini M., Brandolini V. Sviluppo di metodiche Real-time per l'identificazione di specie ittiche in prodotti trasformati ed in miscele.

[76] Decreto Ministero delle Politiche Agricole, Alimentari e Forestali (Mipaaf) del 27.03.2002. Relativo all'etichettatura dei prodotti ittici e sistema di controllo G.U.C.E. n.84 del 10.04.2002

[77] Quinteiro, J., Vidal, R., Izquierdo, M., Sotelo, C. G., Chapela, M. J., Pérez-Martín, R. I., Rehbein, H., Hold, G. L., Russell, V. J. and Pryde, S. E. et al. (2001) Identification of Hake species (Merluccius Genus) using sequencing and PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA control region sequences. *Journal of agricultural and food chemistry* 49, 5108–5114

INDICE DELLE FIGURE

Figura 1.1: struttura molecolare dell'acido α -linolenico (ALA)

Figura 1.2: struttura molecolare dell'acido eicosapentaenoico (EPA)

Figura 1.3: struttura molecolare dell'acido docosaesaenoico (DHA)

Figura 1.4: struttura molecolare dell'acido linoleico

Figura 3.1: esemplari catalogati e fotografati di *Auxis rochei* (Biso o Tombarello)

Figura 3.2: esemplari catalogati e fotografati di *Diplodus annularis* (Sarago sparaglione)

Figura 4.1: sequenza in formato FASTA di un campione di *Diplodus annularis* (Sarago sparaglione).

Figura 4.2: analisi della sequenza di *Diplodus annularis* tramite il database GenBank[®] (BLAST)

Figura 4.3: analisi della sequenza di *Diplodus annularis* tramite il database BOLD

Figura 4.4: allineamento genetico ottenuto con il programma MEGA 6 della specie *Diplodus annularis* (Sarago sparaglione).

Figura 4.5: grafico della variabilità genetica nelle diverse specie analizzate durante il progetto

Figura 4.6: esempio di spettro di massa del picco relativo all'acido C22:6 (DHA)

Figura 4.7: profilo lipidico ottenuto mediante GC-MS di Sgombro (*Scomber scombrus*)

Figura 4.8: profilo lipidico ottenuto mediante GC-MS di Alalunga (*Thunnus alalunga*)

Figura 4.9: profilo lipidico ottenuto mediante GC-MS di Agone (*Alosa fallax lacustris*)

Figura 4.10: profilo lipidico ottenuto mediante GC-MS di Tombarello(*Auxisrochei*)

- Figura 4.11:** profilo lipidico ottenuto mediante GC-MS di Nasello (*Merluccius merluccius*)
- Figura 4.12:** profilo lipidico ottenuto mediante GC-MS di Sarago sparaglione (*Diplodus annularis*)
- Figura 4.13:** profilo lipidico ottenuto mediante GC-MS di Pesce sciabola (*Lepidopus caudatus*)
- Figura 4.14:** profilo lipidico ottenuto mediante GC-MS di Temolo (*Thymallus thymallus*)
- Figura 4.15:** profilo lipidico ottenuto mediante GC-MS di Tonno o Tonno rosso (*Thunnus thynnus*)
- Figura 4.16:** profilo lipidico ottenuto mediante GC-MS di Triglia atlantica (*Pseudopeneus prayensis*)
- Figura 4.17:** profilo lipidico ottenuto mediante GC-MS di Vairone (*Telestes muticellus*)
- Figura 4.18:** profilo lipidico ottenuto mediante GC-MS di Gallinella o Cappone (*Trigla lucerna*)
- Figura 4.19:** profilo lipidico ottenuto mediante GC-MS di Sardina (*Sardina pilchardus*)
- Figura 4.20:** analisi delle Componenti Principali (PCA) delle specie analizzate in questo studio
- Figura 4.21:** logo del database informatico sulle specie ittiche
- Figura 4.22:** schermata iniziale Ittiobase
- Figura 4.23:** scheda tecnica di *Diplodus annularis* (Sarago sparaglione)
- Figura 4.24:** sequenza di *Diplodus annularis* (Sarago sparaglione)
- Figura 4.25:** distribuzione aree di pesca di *Diplodus annularis* (Sarago sparaglione)

Figura 4.26: componente nutrizionale di *Diplodus annularis* (Sarago sparaglione)

Figura 4.27: frode di sostituzione di *Diplodus annularis* (Sarago sparaglione)

Figura 4.28: curve di *Melting* ottenute dalla Real-Time PCR (HRMA) e genere *Thunnus*

Figura 4.29: schema riassuntivo delle divisioni di specie del genere *Thunnus* effettuate da ogni coppia di *primers* in analisi.

Figura 4.30: analisi dei prodotti acquistati nei supermercati: in rosso i campioni frodati, in verde i campioni di *O.vulgaris*, in blu i campioni appartenenti ad altre specie di *Octopodidae* e in verde chiaro il campione positivo di riferimento

Figura 4.31: curve di amplificazione e derivate delle curve di denaturazione per i campioni *Gadidae* (rosso) e aspecifici (azzurro).

Figura 4.32: curve di amplificazione e derivate delle curve di denaturazione per i campioni *Merlucciidae* (verde) e aspecifici (azzurro).

INDICE DELLE TABELLE

Tabella 1.1: dati del mercato mondiale dei prodotti ittici (mln di ton.inpeso vivo).

Tabella 1.2: dinamica degli acquisti domestici nazionali di prodotti agroalimentari, variazioni e quote %* (Fonte: Ismea-Nielsen)

Tabella 1.3: tabella riassuntiva delle differenti zone di cattura definite dalla F.A.O.

Tabella 3.1: tabella specie campionate durante il progetto di ricerca.

Tabella 3.2: mix di PCR per l'amplificazione del gene Citocromo ossidasi subunità I.

Tabella 3.3: caratteristiche dei *primers* per l'amplificazione del gene Citocromo Ossidasi subunità I.

Tabella 3.4: profilo termico utilizzato per l'amplificazione del gene Citocromo Ossidasi subunità I.

Tabella 4.1: didascalia per gli acidi grassi: nome e tempo di ritenzione

Tabella 4.2: ripartizione percentuale degli acidi grassi identificati nell'estratto lipidico ottenuto mediante Soxhlet da *Scomber scombrus*. Valori espressi in %. (CV% \leq 2)

Tabella 4.3: ripartizione percentuale degli acidi grassi identificati nell'estratto lipidico ottenuto mediante Soxhlet da *Thunnus alalunga* . Valori espressi in %. (CV% \leq 2)

Tabella 4.4: ripartizione percentuale degli acidi grassi identificati nell'estratto lipidico ottenuto mediante Soxhlet da *Alosa fallax lacustris*. Valori espressi in %. (CV% \leq 2)

Tabella 4.5: ripartizione percentuale degli acidi grassi identificati nell'estratto lipidico ottenuto mediante Soxhlet da *Auxis rochei*. Valori espressi in %. (CV% \leq 2)

Tabella 4.6: ripartizione percentuale degli acidi grassi identificati nell'estratto lipidico ottenuto mediante Soxhlet da *Merluccius merluccius*. Valori espressi in %. (CV% ≤ 2)

Tabella 4.7: ripartizione percentuale degli acidi grassi identificati nell'estratto lipidico ottenuto mediante Soxhlet da *Diplodus annularis*. Valori espressi in %. (CV% ≤ 2)

Tabella 4.8: ripartizione percentuale degli acidi grassi identificati nell'estratto lipidico ottenuto mediante Soxhlet da *Lepidopus caudatus*. Valori espressi in %. (CV% ≤ 2)

Tabella 4.9: ripartizione percentuale degli acidi grassi identificati nell'estratto lipidico ottenuto mediante Soxhlet da *Thymallus thymallus*. Valori espressi in %. (CV% ≤ 2)

Tabella 4.10: ripartizione percentuale degli acidi grassi identificati nell'estratto lipidico ottenuto mediante Soxhlet da *Thunnus thynnus*. Valori espressi in %. (CV% ≤ 2)

Tabella 4.11: ripartizione percentuale degli acidi grassi identificati nell'estratto lipidico ottenuto mediante Soxhlet da *Pseudopeneus prayensis*. Valori espressi in %. (CV% ≤ 2)

Tabella 4.12: ripartizione percentuale degli acidi grassi identificati nell'estratto lipidico ottenuto mediante Soxhlet da *Telestes muticellus*. Valori espressi in %. (CV% ≤ 2)

Tabella 4.13: ripartizione percentuale degli acidi grassi identificati nell'estratto lipidico ottenuto mediante Soxhlet da *Trigla lucerna*. Valori espressi in %. (CV% ≤ 2)

Tabella 4.14: ripartizione percentuale degli acidi grassi identificati nell'estratto lipidico ottenuto mediante Soxhlet da *Sardina pilchardus*. Valori espressi in %. (CV% ≤ 2)

Tabella 4.15: confronto delle componenti lipidiche tra specie appartenenti alla famiglia Scombridae

Tabella 4.16: confronto dei valori degli isotopi stabili tra specie appartenenti alla famiglia Scombridae

Tabella 4.17: confronto tra specie dichiarata in etichetta e risultato dell'analisi di *Barcoding*

RINGRAZIAMENTI

La realizzazione di questa ricerca è stata possibile grazie alla collaborazione tra il Dipartimento di Scienze Chimiche e Farmaceutiche dell'Università di Ferrara e l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie – CSI sezione di Adria.

Ringrazio il dott. Giuseppe Arcangeli che ha permesso l'inizio di questa collaborazione, spingendomi ad ampliare le mie conoscenze anche in settori diversi per trovare approcci nuovi e multidisciplinari.

Ringrazio la dott.ssa Berto Daniela ed il dott. Federico Rampazzo per aver permesso la possibilità di scambio di conoscenze ed informazioni a più livelli con estrema gentilezza e pazienza.

Un grande e profondo ringraziamento è riservato al Prof. Vincenzo Brandolini, che mi ha concesso il privilegio di affrontare il percorso di PhD student nel gruppo di Chimica degli Alimenti dell'Università di Ferrara, composto inoltre dalle Dott.sse Paola Tedeschi, Annalisa Maietti e Caterina Bergantin, preziose collaboratrici ed amiche durante tutto il periodo di ricerca. In particolare a Paola va la mia più profonda gratitudine per avermi sostenuta ed aiutata in questi tre anni.

Infine, ringrazio chi mi è stato vicino durante tutti questi anni: Alberto, presente e futuro della mia vita e la mia famiglia senza la quale non saprei vivere.

Ringrazio inoltre gli amici di lunga data e tutte le persone da cui, positivamente o negativamente, ho imparato qualcosa nella vita.

Grazie di cuore a tutti.