

RIASSUNTO DELLA TESI

Titolo della tesi: **STUDI CHIMICO-MOLECOLARI DI PROFILI NUTRIZIONALI IDENTIFICATIVI DI DIVERSE SPECIE ITTICHE**

Dottorando

Dott.ssa Tosi Federica

Tutore

Prof. Brandolini Vincenzo

Dott. Arcangeli Giuseppe

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.

Secondo uno studio condotto da ISMEA (Istituto di Servizi per il Mercato Agricolo Alimentare) nel 2015, la produzione complessiva di pesce è stata prevista in crescita del 2,6%. 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.^[1]

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 ITTIODATABASE. Lo studio 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.

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; ogni esemplare è stato identificato morfologicamente, classificato e fotografato.

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/ μ L) 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 Primo (COI), gene di elezione per analisi di *Barcoding*.^[2,3] Il prodotto di amplificazione di ciascun campione è stato quantificato e purificato per poterlo sottoporre ad 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. 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 ^[4]; questa assenza di variabilità su un gene mitocondriale porta alla difficoltà della tecnica di *Barcoding* di andare a identificare correttamente le specie del genere *Thunnus*.

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 qualitative nei profili lipidici. 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 diversi 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 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 dell'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.

Nella quarta parte del progetto è stato previsto uno studio preliminare dei campioni, già analizzati chimicamente e geneticamente, di alcune specie pelagiche come *Scomber scombrus*, *Thunnus alalunga*, *Thunnus thynnus*, *Auxis rochei*, appartenenti alla famiglia Scombridae, utilizzando gli 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* e l'applicazione di queste tecniche, combinazione 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, 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 ITTIOBASE.

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.

L'ultima parte del progetto ha avuto come elemento centrale le frodi.

Nel settore alimentare le frodi sono considerate come condotte illecite 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.^[5] Quando si parla di frodi alimentari si fa riferimento alla produzione, trasformazione, distribuzione e quindi al commercio di alimenti non conformi alla normativa vigente.^[6,7] I casi più frequenti di frodi alimentari a danno dei consumatori si realizzano attraverso false dichiarazioni per provenienza, qualità, composizione, caratteristiche di un alimento. Lo scopo di questa parte dello studio 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(*High Resolution Melt Analysis*) e di PCR *Real-time* hanno avuto successo per una corretta identificazione di prodotti ittici freschi, trasformati e di miscele nei diversi ambiti. In particolare il caso d'identificazione di *Octopus vulgaris*, ossia è stata sviluppata una metodica rapida ed affidabile per l'identificazione del Polpo rispetto alle altre specie appartenenti al genere *Octopus* e *Amphioctopus* di minor valore commerciale con le quali il polpo è spesso sostituito. Tutte le tecniche molecolari sviluppate hanno avuto 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.

Bibliografia:

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

[2] 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

[3] 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

[4] Steven Cadrin, Lisa A. Kerr and Stefano Mariani. *Stock Identification Methods 2nd Edition* (2013) ISBN: 9780123970039.

[5] 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>

[6] 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

[7] 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