

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

Scienze degli Alimenti, Nutrizione animale e sicurezza alimentare – SA.NA.SA.

Ciclo XXIV

Settore Concorsuale di afferenza: 07/H2

Settore Scientifico disciplinare: VET/04

**AUTENTICAZIONE D'ORIGINE,
STIMA DELLA *FRESHNESS QUALITY*
e STUDIO DEL PROFILO NUTRIZIONALE
COME ELEMENTI FONDANTI PER LA VALORIZZAZIONE
DELL'ALIMENTO ITTICO**

Presentata da: Dr.ssa Magda Rotolo

Coordinatore Dottorato

Prof. Roberto Rosmini

Relatore

Prof. Anna Badiani

Esame finale anno 2012

**AUTENTICAZIONE D'ORIGINE,
STIMA DELLA *FRESHNESS QUALITY* e
STUDIO DEL PROFILO NUTRIZIONALE
COME ELEMENTI FONDANTI PER LA VALORIZZAZIONE
DELL'ALIMENTO ITTICO**

Prefazione 5

PARTE I: L'alimento ittico nella percezione del consumatore

I.1 Introduzione 7
I.2 Food Quality & Food Safety 7
I.3 La scelta del consumatore..... 8
I.4 Situazione in Europa 11
I.5 Situazione in Italia 15
I.6 Esposti di legge UE in tema di tracciabilità ed etichettatura alimentare 18
I.7 Wrap it up! 25
I.8 Bibliografia 28

PARTE II: Autenticazione d'origine

II.1 Introduzione 35
II.2 Stato dell'arte in merito all'autenticazione degli alimenti ittici 36
 II.2.1 analisi del DNA 37
 II.2.2 analisi dei lipidi 39
 II.2.3 analisi degli isotopi stabili 43
 II.2.4 analisi dei minerali 44
 II.2.5 analisi multivariata 45
II.3 Il biologico 48
II.4 Materiali e Metodi 50
 II.4.1 Gli esemplari di spigola presi in esame 50

II.4.2	Aspetti Morfometrici	52
II.4.3	Determinazione dell'Umidità	53
II.4.4	Analisi Lipidiche	53
II.4.4.i	Estrazione dei Lipidi Totali	53
II.4.4.ii	Determinazione della % di Fosfolipidi nei Lipidi Totali	54
II.4.4.iii	Separazione dei Lipidi Neutri dai Lipidi Polari	54
II.4.4.iv	Preparazione dei Metilesteri degli Acidi Grassi	55
II.4.4.v	Analisi Gascromatografica degli Acidi Grassi	55
II.4.5	Determinazione del Tenore in Macroelementi, Oligoelementi ed elementi tossici	56
II.4.5.i	Mineralizzazione del campione	56
II.4.5.ii	Elenco e Lettura degli Elementi	57
Macroelementi	57	
Oligoelementi ed elementi tossici	58	
II.4.6	Analisi degli isotopi stabili	58
II.4.7	Qualità del Dato Analitico	60
II.4.8	Elaborazione dei Dati	
II.5	Risultati e Discussione	
II.5.1	Caratterizzazione delle Fonti degli Esemplari di Spigola	
II.5.1.i	Premessa	
II.5.1.ii	Il Profilo degli Esemplari Selvaggi	
II.5.1.iii	Il Profilo degli Esemplari Provenienti da allevamenti Estensivi e Semi-Intensivi	
II.5.1.iv	Il Profilo degli Esemplari Provenienti da allevamenti Intensivi	
II.5.1.v	Le Abbondanze Isotopiche Relative nei Profili delle Tipologie di Allevamento	
II.5.2	Le Possibilità di Autenticazione come Emerse dal Progetto	
II.6	Considerazioni conclusive e riflessioni per il futuro	
II.7	Bibliografia	

PARTE III: Stima della *Freshness Quality*

III.1	Introduzione	
-------	--------------------	--

III.2	Qualità Freschezza e sua rilevazione negli alimenti ittici	
III.3	Materiali e Metodi	
III.3.1	Il campionamento e le Tesi a confronto	
III.3.1.1	Seppia (<i>Sepia officinalis</i>)	
III.3.1.2	Nasello (<i>Merluccius merluccius</i>)	
III.3.1.3	Triglia di fango (<i>Mullus barbatus</i>)	
III.3.2	Valutazione della freschezza per via sensoriale	
III.3.3	Valutazione della freschezza per via chimica	
III.3.4	Valutazione della freschezza per via fisica	
III.4	Analisi dei dati	
III.5	Risultati e Discussione	
III.5.1	Seppia (<i>Sepia officinalis</i>)	
III.5.1.1	Valutazione della freschezza per via sensoriale	
III.5.1.2	Valutazione della freschezza per via chimica	
III.5.1.3	Valutazione della freschezza per via fisica	
III.5.2	Nasello (<i>Merluccius merluccius</i>)	
III.5.2.1	Valutazione della freschezza per via sensoriale	
III.5.2.2	Valutazione della freschezza per via chimica	
III.5.2.3	Valutazione della freschezza per via fisica	
III.5.3	Triglia di fango (<i>Mullus barbatus</i>)	
III.5.3.1	Valutazione della freschezza per via sensoriale	
III.5.3.2	Valutazione della freschezza per via chimica	
III.5.3.3	Valutazione della freschezza per via fisica	
III.6	Qualità Freschezza: considerazioni conclusive	
III.7	<u>Bibliografia</u>	

Prefazione

Mai come oggi l'alimento ittico si manifesta essere materia di ricerca ampia e variegata, soprattutto se paragonata al più comune alimento muscolare terricolo. Anche se l'importanza di questa categoria di prodotti è stata realmente capita solo negli ultimi anni (basti pensare, per esempio, al vuoto legislativo presente fino a qualche anno addietro), pesci, molluschi e crostacei fanno parte da sempre della dieta di una larga parte della popolazione mondiale e si sono qualificati come alimenti in grado di unire indubbi pregi qualitativi, quali gusto e facile digeribilità, ad un alto valore nutrizionale, fatto, questo, innegabile se si considera che da sempre 'mangiare pesce fa bene'.

La straordinaria valenza dell'alimento ittico, inoltre, emerge chiara dal fatto che varie branche della zootecnia se ne sono occupate in misura crescente: basti pensare agli studi per migliorare la nutrizione degli esemplari allevati, oppure ai numerosi approcci “analitici in senso lato” per la caratterizzazione della qualità delle loro carni, da quelli sensoriali, a quelli microbiologici e per il controllo dei contaminanti, da effettuare su esemplari di allevamento, come pure selvatici, per “fare la conoscenza” di un alimento tanto comune e tanto utilizzato, ma troppo spesso collocato in secondo piano. Da questo punto di vista, poi, anche i comuni consumatori non sempre riescono ad apprezzare il reale valore dell'alimento ittico, rimanendo spesso bloccati in un vero e proprio “limbo di insicurezza all'acquisto”, per via sia della scarsa conoscenza del prodotto, sia dei suoi connotati da sempre tenuti per poco simpatici, la necessità di sottoporlo a pulizia come prima fase della preparazione e, di conseguenza, l'odore non sempre gradito che può diffondersi in casa.

Valorizzare gli alimenti ittici diventa, quindi, d'importanza fondamentale per gli operatori del settore. A differenza di quanto accade per gli alimenti muscolari terricoli, però, ci sono aspetti che sono più difficili da indagare perché di non facile acquisizione.

Il primo tra tutti è l'aspetto “freschezza”. Se, infatti, la vita commerciale di una bistecca può arrivare anche ad una settimana, questo non è vero per l'alimento ittico fresco che, già dal giorno successivo all'acquisto, inizia a perdere quelle caratteristiche che lo rendono appetibile. Diventa quindi indispensabile riuscire a riconoscere il grado di freschezza di un alimento ittico e cercare di conservarlo al meglio.

Un'altro aspetto che rende le derrate ittiche oggetto di studi davvero “particolari” è l'ampio ambito della autenticazione, sia essa per l'origine o per il metodo di produzione. Se questo si dimostra fondamentale per gli esemplari selvatici, che potrebbero essere pescati in

zone inquinate o essere sostituiti con controparti allevate, l'introduzione dell'acquacoltura biologica ha fatto sì che l'aspetto autenticazione diventasse necessario anche per valorizzare un prodotto, certo sempre allevato, ma con un qualcosa in più, che non ha ancora molto mercato perché poco conosciuto e al momento di più costosa acquisizione.

Per concludere, dal punto di vista nutrizionale pesci, molluschi e crostacei non hanno niente da invidiare agli alimenti muscolari terricoli, anzi, vengono spesso consigliati per perseguire una dieta sana ed equilibrata. E' un fatto, però, che i nutrienti per i quali l'alimento ittico è considerato "salutare" (come, per esempio, i famosi acidi grassi polinsaturi della serie omega 3) sono anche gli stessi che più facilmente possono alterarsi e non essere più disponibili. Occorre quindi verificare se, effettivamente, in ambito casalingo, possano prodursi perdite che ne abbassino il valore dietetico.

Ecco dunque per quale motivo, nella mia tesi, dopo aver spiegato il complicato rapporto che il consumatore intrattiene con gli alimenti in generale, e con gli alimenti ittici in particolare (illustrando anche come l'Unione Europea abbia cercato, tramite regolamenti specifici, di porre chiarezza in un contesto così ampio), andrò a discutere tre approcci diversi per valorizzare la matrice ittica, esemplificati da:

- differenziazione per via chimica della polpa di esemplari allevati e selvatici di spigola (*Dicentrarchus labrax*) come approccio analitico per l'autenticazione d'origine;
- valutazione della freschezza per via sensoriale, chimica e fisica di esemplari di seppia (*Sepia officinalis*), nasello (*Merluccius merluccius*) e triglia (*Mullus barbatus*);
- valutazione per via chimica, in pre e post cottura, della componente lipidica di esemplari di mazzancolla (*Penaeus kerathurus*), canocchia (*Squilla mantis*) e seppia (*Sepia officinalis*), come modello di indagine nutrizionale su alimenti ittici abitualmente consumati nel bacino Mediterraneo.

Per quanto inserita in un unico quadro e concepita nel rispetto di una sorta di obiettivo "superno" di ricerca, ogni parte sarà a sé stante e, pertanto, sarà caratterizzata da una *mise au point*, più o meno ampia, da una parte sperimentale con discussione dei risultati e da una sua propria raccolta bibliografica.

Parte I: L'alimento Ittico nella Percezione del Consumatore

I.1 Introduzione

La sicurezza e la qualità degli alimenti sono state, negli ultimi anni, al centro del dibattito pubblico, politico ed industriale a causa di fattori diversi, ma di uguale importanza, che hanno portato a rivedere completamente l'approccio alla produzione alimentare, industriale e non.

Il primo elemento da considerare è il susseguirsi, dagl'inizi degli anni '90 ad oggi, di scandali legati ai prodotti di origine animale (ad esempio: sindrome BSE, influenza aviaria, diossine nel latte e nella carne di pollo, ecc.). che, come conseguenza immediata, hanno alimentato sfiducia nel sistema produttivo e portato diverse parti della popolazione ad interessarsi ad aspetti legati alla produzione alimentare, inducendo così una richiesta sempre più ampia di prodotti che fossero strettamente controllati e controllabili, che rispettassero il benessere animale, che fossero privi di organismi geneticamente modificati (OGM) e che, preferibilmente, fossero biologici (Bredahl, 2001; Magnusson e Koivisto Hursti, 2002; Knight, 2005). Ad oggi quindi, soprattutto nei paesi più sviluppati, la domanda all'acquisto si è molto diversificata, essendo i consumatori diventati più attenti, critici ed esigenti.

Questa differenziazione nella domanda d'acquisto ha fatto sì che sia a livello politico che a livello industriale si iniziasse a dare molta importanza ai concetti di '*food quality*' e '*food safety*': se fino all'inizio degli anni '90, la scelta del consumatore era guidata soprattutto dal prezzo dei beni di consumo ed, eventualmente, dall'abitudine all'acquisto, oggi le cose sono cambiate, evidenziando che la 'strategia del prezzo' non è necessariamente la più attrattiva (Grunert, 2005), ma che l'origine e le modalità di produzione dei prodotti sono diventate fattori discriminanti nella scelta del consumatore.

I.2 Food Quality & Food Safety

Convenzionalmente, con il termine '*food quality*', ovvero qualità degli alimenti, si intende un concetto che possiede 2 dimensioni, una *oggettiva* ed una *soggettiva* (Grunert, 2005). La qualità *oggettiva* si riferisce a caratteristiche intrinseche del prodotto ed è garantita

dal produttore/fornitore, mentre la qualità *soggettiva* è la qualità percepita dal consumatore. Questa, a sua volta, può essere distinta in una visione *'olistica'* o globale, ovvero quando nella percezione del consumatore la qualità equivale a tutte le caratteristiche desiderabili che un prodotto dovrebbe avere, ed una visione *'d'eccellenza'*, ovvero il prodotto considerato ha caratteristiche desiderabili che i consumatori, nel proprio linguaggio, potrebbero non considerare come parte del concetto basilare di qualità, ma come *'valore aggiunto'* a quelli già presenti. La relazione tra le 2 dimensioni di qualità è il punto chiave che muove il mercato: quando il produttore riesce a tradurre i desideri del consumatore in caratteristiche intrinseche del prodotto da commercializzare e quando il consumatore può riscontrare le caratteristiche da lui desiderate nel modo in cui il prodotto è stato creato, la qualità può diventare un parametro competitivo per gli operatori alimentari. In ambito ittico ad esempio, è stato dimostrato (Brunsø et al., 2007) che, secondo il consumatore medio, le principali caratteristiche necessarie di qualità sono la freschezza e il gusto, anche se non sempre chi acquista è realmente capace di giudicare questi aspetti.

In senso stretto, *'food safety'*, ovvero sicurezza alimentare, è definita come la “non probabilità” che un alimento possa provocare danni alla salute, una volta consumato. Anche in questo caso, si può definire la sicurezza da un punto di vista *'oggettivo'*, ovvero l'assenza di rischio di un dato alimento certificato dagli esperti del settore, e da un punto di vista *'soggettivo'*, ovvero l'assenza di rischio percepito dal consumatore. Seguendo la visione olistica della qualità (vedi sopra), la sicurezza alimentare dovrebbe essere una caratteristica fondamentale di un alimento, almeno nella percezione di chi acquista. Tuttavia, è stato dimostrato (Brunsø et al., 2002; van Rijswijk e Frewer, 2006), che la sicurezza non è la prima qualità che i consumatori menzionano: anche se l'influenza che essa esercita sui cittadini varia nel tempo (ad esempio, basti pensare a quando si presenta una nuova crisi alimentare o alla percezione che i consumatori hanno degli alimenti contenenti O.G.M.), la salubrità è considerata un requisito fondamentale di tutti i prodotti, una qualità che deve esistere a prescindere e non un criterio d'acquisto utile a discriminare prodotti diversi.

I.3 La scelta del consumatore

Come sopra ricordato, lo scalpore creato da accadimenti d'interesse sanitario su scala mondiale ha suscitato l'interesse del consumatore per le modalità di produzione e di lavorazione del prodotto destinato al consumo; ma se fino a 10-15 anni fa solo il settore della

produzione terricola era stato coinvolto (era ancora forte la convinzione che i prodotti del mare fossero già 'naturali', perché allo stato selvatico), con il passare del tempo anche il settore ittico ha dovuto dimostrare la salubrità dei suoi prodotti. Se una volta il consumatore si fidava di quel che gli veniva detto riguardo la provenienza e la freschezza del pesce, oggi c'è la tendenza da parte di chi consuma, abitualmente o non, a voler essere più protagonista e conoscere meglio ciò che compra.

Per capire il rapporto che esiste tra consumatore e prodotto acquistato, per prima cosa sono da analizzare alcuni aspetti importanti del processo mentale che viene messo in atto durante la spesa.

Innanzitutto, siccome la formazione del giudizio su un determinato oggetto è basato su una scansione di tutte le informazioni in proprio possesso che ne permettono la classificazione come prodotto valido o meno, il consumatore cerca informazioni sul prodotto che vuole acquistare. Come dimostrato da Pieniak et al. (2007), esistono due tipi di ricerca, quella 'interna' e quella 'esterna': la ricerca interna si basa su gusto, memoria personale, esperienze passate e conoscenza del prodotto in esame, mentre la 'ricerca esterna' comprende tutte quelle informazioni ottenute da fonti terze. Tra queste esistono quelle 'personali' (il rivenditore o negozio di fiducia), quelle 'impersonali' (medici e nutrizionisti, governo, l'industria alimentare), i 'mass-media' (internet, televisione, radio e giornali) e le etichette.

Una volta ottenute tutte le informazioni possibili, il consumatore cerca di dedurre tramite esse la qualità del prodotto in esame. Occorre però fare una precisazione: come dimostrato da Juhl e Poulsen (2000), quando ci si trova a dover valutare la qualità di quei prodotti senza marca ed altamente deperibili come il pesce fresco, scatta un meccanismo per cui il consumatore segue una sorta di scala di preferenze delle informazioni in suo possesso, formandosi aspettative e traendo conclusioni da esse seguendo, in ordine decrescente, la propria esperienza ed il gusto, le informazioni esterne definite 'personali', le indicazioni delle etichette e, in maniera del tutto minore, le informazioni ottenute tramite fonti impersonali o i mass-media. A tal proposito, già da lungo tempo, è stato dimostrato (Cox, 1967) però che, pur avendo bisogno d'informazioni su ciò che compra, il consumatore preferisce 'suggerimenti' qualitativi che si presuppone siano predittivi delle caratteristiche qualitative di proprio interesse e con i quali sia più in confidenza rispetto, ad esempio, a 'suggerimenti' che non è abituato a prendere in considerazione (non ha importanza spiegare come un prodotto abbia determinate caratteristiche se chi deve comprarlo non sa neanche di cosa si stia parlando!). Questo aspetto ha una ovvia implicazione nella modalità in cui il produttore deve fornire informazioni: il dare troppe indicazioni su un prodotto per ricercare la soddisfazione del

consumatore non comporta necessariamente che esso, non abituato ad usare certe informazioni, sia spinto all'acquisto (Pieniak et al., 2007).

Un altro aspetto da considerare del processo mentale di chi acquista, è che, fin da subito, il consumatore sviluppa 'aspettative' di qualità che influenzano la sua scelta. Queste aspettative si basano su caratteristiche intrinseche ed estrinseche del prodotto in esame (Bello Acebrón e Calvo Dopico, 2000). Per caratteristiche intrinseche si intendono quegli aspetti che fanno parte integrante del prodotto e non possono essere cambiate, se non cambiando il prodotto stesso (per esempio, la provenienza, la specie, la presenza di grasso, il colore delle carni, ecc). Per caratteristiche estrinseche si intendono quegli aspetti del prodotto che non fanno parte della sua composizione, ma che sono legati al modo in cui vengono presentati (per esempio, il prezzo, la marca, le promozioni sull'acquisto, il metodo di imballaggio). A questo proposito, le etichette possono essere considerate mezzi attraverso cui dedurre la qualità o influenzare il formarsi un'aspettativa su di essa confrontando prodotti dello stesso tipo ma con caratteristiche diverse ed influenzando, di conseguenza, il comportamento all'acquisto (Brunsø et al., 2002; Grunert, 2005). I consumatori sono ben predisposti verso le etichette e spesso le usano come semplici regole decisionali o metodi euristici da seguire (Gigerenzer e Todd, 1999): se esistono incertezza e difficoltà nel valutare la qualità di un prodotto per mancanza di altre informazioni esterne, il consumatore non potrà far altro che fidarsi delle indicazioni riportate sul prodotto stesso e, anche quando rimanga un dubbio, può sempre affidarsi al legame di fiducia con la marca che più abitualmente utilizza. (Boulding e Kirmani, 1993; Bredahl, 2004; Verbeke, 2005).

Infine, alla modalità di reperire ed elaborare informazioni, va aggiunta una sorta di 'pressione psicologica' che ognuno di noi subisce all'atto dell'acquisto. A livello inconscio, infatti, esistono delle norme cosiddette 'soggettive' che regolano la frequenza, il consumo e quindi l'acquisto di un prodotto (Verbeke e Vackier, 2005). Queste norme si possono dividere 'norme sociali esterne' (medici e nutrizionisti, governo, industria alimentare), in 'norme sociali interne' (la famiglia, il partner, gli amici) e 'norme personali' (obbligo morale nel comprare e preparare un determinato prodotto). Per esempio, parlando di pesce, è stato dimostrato da vari autori (Myrland et al., 2000; Olsen, 2003; Verbeke e Vackier, 2005) che l'attitudine al consumo è influenzata in maniera decrescente dall'influenza dell'ambiente di vita quotidiano (amici e parenti, presenza o meno di figli al di sotto dei 12 anni, numero di componenti della famiglia), la percezione di attributi positivi (il gusto e l'immagine di salubrità) vs aspetti negativi (le lische ed il prezzo), l'abitudine al consumo, il sentimento di responsabilità ad offrire alla famiglia un pasto sano, la regione di provenienza e, in maniera del tutto minore, le

campagne pubblicitarie governative e i consigli dei medici.

I.4 Situazione in Europa

Nonostante la consapevolezza generale che il pesce sia un alimento ottimo per la salute (Trondsen et al., 2004b; Pieniak et al., 2008a) e le campagne pubblicitarie governative atte ad aumentare il consumo di pesce per questioni di salute pubblica, in molti casi i cittadini europei non mangiano abbastanza pesce rispetto a quanto i nutrizionisti raccomandano (Welch et al., 2002; Scientific Advisory Committee on Nutrition, 2004; Pieniak et al., 2007). Per capire il motivo di questo consumo ridotto occorre analizzare il rapporto che il consumatore ha con il pesce.

In generale, l'attitudine a mangiar prodotti del mare è influenzata da diversi aspetti legati sia ad ambiti personali e familiari (gusto personale, stile di vita, volontà di preparare pasti salutari, esperienza e abitudine, confidenza e conoscenza del prodotto acquistato) sia a valori 'moralì' quali l'eco-sostenibilità ed il benessere animale.

Nell'ambito delle abitudini personali, ci sono aspetti positivi (l'alto valore nutrizionale ed il buon sapore) ed aspetti negativi (la presenza lische, il costo, l'odore, la scarsa disponibilità, la facile deperibilità e il rischio d'inquinamento delle carni). Questi aspetti possono influenzare in maniera molto diversa le diverse fasce di consumatori. Per esempio, da studi condotti in diverse nazioni (Myrland et al., 2000; Olsen, 2003; Trondsen et al., 2003; Trondsen et al., 2004a; Verbeke e Vackier, 2005; Brunsø et al., 2007), anche extraeuropee (Lambert et al., 2008; Feng et al., 2009), è stato dimostrato che il consumo di pesce segue costantemente lo stesso andamento, ovvero i fattori che più ne influenzano l'acquisto sono sempre i medesimi. Questi fattori sono: il genere (le donne ne consumano più degli uomini), l'età (gli anziani ne consumano più dei giovani per un maggior interesse agli aspetti benefici, la maggior abitudine a cucinarlo ed il minor fastidio all'odore), la densità del nucleo familiare (il consumo del pesce aumenta con l'aumento del numero dei componenti, fatta eccezione in presenza di ragazzi di età superiore ai 12 anni, per cui il consumo di pesce tal quale diminuisce o viene sostituito da prodotti elaborati a causa di una riluttanza dei più piccoli verso il sapore e l'odore), il livello di istruzione (con un livello medio-alto di scolarità i consigli dei nutrizionisti vengono meglio percepiti), il livello reddituale (anche se per Trondsen et al., 2003 questo aspetto è ininfluenza, sembra che il consumo di pesce diminuisca al diminuire del reddito per via del suo costo), la vicinanza o meno del mare (il consumo di pesce è più elevato nelle regioni marittime rispetto a quelle regioni dell'entroterra) ed il livello di consapevolezza degli aspetti dietetici positivi del pesce (maggiore è la consapevolezza, maggiore è il consumo

di pesce).

Molto importante è l'aspetto legato alla 'confidenza' che il consumatore ha con il pesce (Verbeke et al., 2005): il consumatore che manca d'esperienza nel valutare la qualità del pesce (per scarsa abitudine al consumo o poca fiducia nell'esserne capace) sarà portato a comprarne meno, percependo il rischio di incappare in pesce di bassa qualità o di non comprovata salubrità, a differenza del consumatore abituale che, al contrario, sarà molto meglio predisposto e presenterà un più alto consumo settimanale. A tal proposito, in uno studio che coinvolgeva cittadini di diverse Nazioni (Pieniak et al., 2007), è stato dimostrato che esistono 3 tipi di consumatori: gli scettici, gli entusiasti e i fiduciosi. Il gruppo degli 'scettici' è formato da uomini di età tendenzialmente avanzata, soprattutto artigiani, con livello di scolarità medio-basso; questi dimostrano scarsa conoscenza del pesce, scarsa fiducia nelle informazioni fornite e in chi le fornisce, scarso interesse nell'acquisire informazioni e rendere quelle addizionali (per esempio, metodo di preparazione, benefici per la salute, ricette per cucinare, ecosostenibilità del prodotto, benessere del pesce, uso di mangimi O.G.M., ecc.) come obbligatorie ed infine dimostrano di avere scarso interesse nell'assunzione di pesce e, di conseguenza, un suo basso consumo settimanale. Il gruppo degli 'entusiasti' sarebbe formato soprattutto da donne, con un livello di scolarità medio-alto, una forte fiducia nei mezzi di informazione, nelle informazioni fornite ed un loro utilizzo come aiuto all'acquisto, una volontà accesa di aggiungere informazioni addizionali a quelle già obbligatorie e una forte motivazione nel consumare pesce settimanalmente. Il gruppo dei 'fiduciosi' è formato da persone tendenzialmente giovani, con livello medio di scolarità, che hanno una scarsa conoscenza del pesce e ne consumano poco, si fidano relativamente dei mezzi d'informazione, delle informazioni fornite e dimostrano moderato interesse in informazioni addizionali come il metodo di preparazione, la marca del fornitore, la garanzia di sicurezza, le ricette per cucinare.

Esiste quindi tra i consumatori una diversa percezione sulle informazioni riguardanti il pesce (Verbeke et al., 2005). Questa differenza comporta modalità diverse sia nell'acquisire, sia nell'interpretare indicazioni fornite o consigli esterni. I consumatori abituali saranno abili non solo nel riconoscere la qualità del pesce tramite le sue caratteristiche intrinseche, ma potranno anche utilizzare e, quindi fidarsi di, tutte le informazioni esterne fornite. Le cose cambiano per chi non consuma abitualmente il pesce: sebbene in generale, le indicazioni più utilizzate siano il nome commerciale/la specie del pesce, il peso e la data di scadenza, nei consumatori non 'confidenti,' il prezzo,

la data di scadenza e la modalità di preparazione saranno gli spunti che influenzeranno maggiormente la scelta all'acquisto. Inoltre, dovendo reperire indicazioni attendibili, le fonti più frequentemente utilizzate dai 'non esperti' saranno per lo più personali (famiglia, amici e rivenditore abituale), prendendo in considerazione solo secondariamente le informazioni provenienti da medici nutrizionisti e governative sulla salute pubblica (come le pubblicità progresso) o quelle diffuse da radio, tv e giornali.

A conferma di quanto detto fin'ora, vari autori (Juhl e Poulsen, 2000; Pieniak et al., 2007), nell'analizzare l'utilizzo di informazioni disponibili riguardo il pesce, hanno dimostrato che i consumatori con esperienza (ovvero alto consumo settimanale di pesce), profonda conoscenza del prodotto in esame ed attitudine positiva verso il suo consumo abituale sono più predisposti all'utilizzo di tutte le informazioni messe a loro disposizione; che i consumatori occasionali sono più predisposti verso quelle informazioni riguardanti la qualità e la salubrità del pesce, nonché i consigli sulla modalità di preparazione e cottura; infine che l'uso di fonti personali d'informazione (quali il rivenditore di fiducia, la famiglia o i conoscenti) è maggiore tra chi ha un'alta percezione di rischio riguardo al pesce e tra i consumatori di nazioni dove esiste un basso consumo di pesce.

Un altro aspetto importante della percezione del consumatore riguardo ai prodotti ittici concerne la loro salubrità e sicurezza. Esiste un divario tra realtà scientifica e immaginario collettivo: anche se i cittadini dell'Unione Europea sono interessati alla propria salute e, di conseguenza, a perseguire una dieta sana e priva di rischi, quando si tratta di considerare il binomio benessere-rischio legato al consumo di pesce (ad esempio, presenza di fattori nutritivi importanti *vs* metalli pesanti per inquinamento del mare), sembra che venga dato peso solo all'avviso più vicino alle conoscenze personali pregresse. E' stato dimostrato, infatti, che i cittadini meno avvezzi al consumo di pesce sono più influenzati dagli avvisi di rischio, continuando a mantenere un ridotto consumo di pesce, mentre i cittadini abituati a mangiare prodotti del mare sono più predisposti a seguire gli avvisi sui benefici delle derrate ittiche, mantenendo costante il loro consumo (Verbeke et al., 2005, Pieniak et al., 2008b).

Sempre collegata a questo aspetto, c'è la differenza di percezione tra pesce allevato e selvatico. In tema di sicurezza e salubrità, il pesce è strettamente legato all'ambiente in cui vive o viene allevato, a quello che mangia e a come viene lavorato. Questo comporta che la presenza di contaminanti ambientali (quali per esempio, mercurio, PCBs, diossine), mangimi con ingredienti OGM o manipolazioni non idonee possono completamente mettere in secondo piano gli aspetti positivi per cui il pesce è ricercato. A tal proposito, sembra che il pesce di

acquacoltura (allevato) non sia visto di buon occhio dai consumatori e quindi, all'atto dell'acquisto, venga preferito il prodotto selvatico perché considerato più fresco, di maggior qualità e più salubre (Verbeke et al., 2005; Brunsø et al., 2007). La differenza percettiva in termini di qualità tra le 2 tipologie di pesce evidenzia un ostacolo non da poco: si potrebbe creare una barriera allo sviluppo dell'acquacoltura per una 'non-accettazione' da parte dei consumatori dei prodotti da essa derivati, sebbene non esistano evidenze scientifiche che mostrino effettive differenze qualitative in termini di valori nutrizionali (Hossain, 2011), né i consumatori riescono a dimostrare il perché di questa differenza percettiva. Nell'analizzare questo aspetto, Altintzoglou et al., 2010, in uno studio condotto tra i cittadini di 3 Stati Europei, hanno dimostrato che presentando il pesce allevato ad un pool di consumatori abituali attraverso informazioni bilanciate (ovvero un misto di informazioni su aspetti positivi e negativi del pesce) garantite da un ente controllore (per esempio, l'Unione Europea), la percezione di salubrità e la fiducia nell'acquacoltura cambiano in modo positivo.

Sebbene l'interesse pubblico e le attitudini verso aspetti quali l'eco-sostenibilità (Vermeir I. e Verbeke W., 2008) ed il benessere animale (Frewer et al., 2005) siano in aumento, gli schemi comportamentali di chi acquista non mostrano necessariamente lo stesso incremento (Vermeir e Verbeke, 2006). Tra attitudine e comportamento del consumatore esiste un divario tale per cui la sola predisposizione morale non rispecchia il comportamento all'acquisto (Ajzen, 2001): fattori come il gusto personale, il prezzo, la qualità, la convenienza e la familiarità con determinate marche sono criteri che possono pesare molto di più rispetto ai soli attributi etici di un prodotto e, di conseguenza, l'attributo 'sostenibilità' (concetto per il consumatore astratto in quanto non può essere effettivamente verificato e quindi deve essere per forza solo creduto) viene preso in considerazione solo da una piccola parte di consumatori. In ogni caso, è stato dimostrato (Vermeir e Verbeke, 2008) che su una determinata fascia di popolazione (per lo più giovani) la sola predisposizione positiva verso la produzione sostenibile può essere un predittore valido del comportamento all'acquisto: sebbene anche in questo caso fattori come la non-confidenza e la percezione di inefficacia dell'acquisto ecologico possano influenzare negativamente l'acquisto di questo genere di prodotti (soprattutto se è insita l'idea che i prodotti ecologici siano di difficile reperimento e che l'acquisto di essi non sia utile al miglioramento della società), i consumatori convinti che il loro comportamento possa giovare all'ambiente opteranno più facilmente per l'acquisto 'sostenibile'. Per quel che riguarda il pesce, è stato stilato il profilo di chi maggiormente ne consuma seguendo attributi di sostenibilità (Verbeke et al., 2007), mostrando però come queste persone siano preferibilmente di età avanzata, fortemente convinte di conoscere quel

che acquistano e con la convinzione dell'utilità del loro gesto; questo genere di consumatori, inoltre, è molto interessato ad avere tutte le informazioni possibili riguardanti aspetti di sostenibilità e di etica che coinvolgono l'industria della pesca.

I.5 Situazione in Italia

In accordo con il contesto europeo, il rapporto del consumatore italiano con il pesce è influenzato, oltre che dalla propria sfera razionale, da una forte componente emotiva, legata ad abitudini alimentari, alla cognizione del benessere che la sua presenza nella dieta comporta, ma, soprattutto alla regione di provenienza del consumatore.

La situazione in Italia è stata recentemente esaminata da uno studio dell'ISMEA (ISMEA, 2011) condotto per mezzo di 10 *focus group*, diversificati in base all'area geografica di appartenenza (Nord, Centro, Sud ed Isole), alla dimensione demografica della città, alla lontananza dalla costa (zone interne e zone costiere) e formati da consumatori responsabili degli acquisti alimentari per il proprio nucleo familiare.

Nella penisola, il pesce viene consumato da una a due volte alla settimana, con frequenze più basse nelle aree interne, superiori nelle zone costiere. E' riscontrabile una ciclicità settimanale per cui si ha un'alto consumo il venerdì, per tradizione religiosa o per abitudine, ed il fine settimana, per il maggiore il tempo a disposizione da dedicare alla preparazione del pesce, oltre ad una ciclicità annuale per cui si registra un aumento d'intensità di utilizzo nei mesi estivi, sia per il maggiore tempo a disposizione (per esempio quando si è in vacanza) sia perché il consumo di pesce dà una sensazione di freschezza e leggerezza, ricercata nei periodi più caldi dell'anno. Particolare, inoltre, è la convinzione che la pesca in estate sia più ricca e la disponibilità di pesce sia maggiore. Anche da noi, le cause del ridotto consumo di pesce sono il ritmo di vita frenetico che non permette di dedicarsi alla sua preparazione, la famiglia sempre meno numerosa che rende poco conveniente l'impiego di tempo e di fatica per prepararlo o, al contrario, la presenza di bambini che in tanti casi non lo gradiscono, un cambiamento di residenza dalla costa ad una città dell'entroterra, e, soprattutto, la percezione che il pesce sia un alimento costoso. Dall'altra parte, i motivi di avvicinamento al consumo del pesce sono l'aspetto salutistico (il pesce è "un alimento dietetico ricco di Omega 3"), la distribuzione più capillare del prodotto fresco in ipermercati e supermercati, che ha permesso un avvicinamento dei consumatori ed un abbassamento dei prezzi, ed un comportamento di "moda" con l'aumento del consumo di pesce crudo.

Confrontando pesce e carne, si riscontrano sostanziali differenze. I cittadini delle zone interne sembrano preferire la carne al pesce per motivi legati al prezzo, alla difficoltà di preparazione, sia per il tempo che per la competenza nel cucinarlo, oltre che agli eventuali odori sgradevoli che si formano in casa. Per quanto anche i cittadini di mare siano concordi su aspetti negativi del pesce quali il prezzo e gli eventuali odori sgradevoli, la complessità di preparazione non sembra essere un ostacolo al suo acquisto in quanto si ritiene esistano modi semplici e veloci per cucinarlo oltre che una più ampia varietà di scelta rispetto alla carne. Il pesce, più che la carne, è considerato un prodotto raffinato e di prestigio da tutti gli italiani, ma anche in questo caso esiste una sostanziale differenza di percezione. Considerando gli aspetti negativi (prezzo, difficoltà di preparazione ed odori sgradevoli), i cittadini meno abituati al suo consumo preferiscono, soprattutto se si tratta di occasioni importanti, non rischiare esiti negativi e preparare prodotti con i quali abbiano più familiarità. Dal punto di vista della salute, il pesce è considerato in modo più positivo rispetto alla carne perché più leggero, più digeribile, meno grasso, contenente più sostanze nutritive e, di conseguenza, è considerato più sano ed adatto ai bambini, anche se sfama meno e quindi non viene considerato un pasto unico. All'atto della spesa, emerge una diversa sensazione di tranquillità: chiaramente, nelle aree interne, dove il consumo di carne è maggiore, si ritiene la carne più facile da valutare, più facilmente controllabile, mentre il pesce lascia l'incertezza di non essere abbastanza fresco e salubre (“il mare è difficile da controllare”); il contrario avviene nelle zone costiere.

Riguardo al pesce in quanto tale, occorre fare una distinzione di percezione tra presentazione del prodotto (fresco, congelato, scongelato) e la tipologia di allevamento (allevato, selvatico o biologico). Tra tutti i consumatori, il prodotto fresco è di gran lunga preferito a quello surgelato o scongelato. Siccome si ritiene che nel prodotto fresco il sapore e le proprietà nutritive siano conservate più intatte, molti preferiscono il prodotto tal quale o, in alternativa, congelare personalmente il pesce a causa di una sorta di diffidenza nei confronti dei metodi industriali.

Tra pesce allevato e selvatico, gli Italiani preferiscono 'emotivamente' il pesce selvatico in quanto viene considerato più buono (carne più soda, più saporita, più profumata, meno grasso), perché presenta un fascino intrinseco ed è creduto avere proprietà nutrizionali superiori (per i bambini è preferito all'allevato), anche se non possono essere controllati né i singoli esemplari, né le acque in cui vengono pescati. Di contro, il pesce allevato, per quanto perda in sapore, viene considerato più sicuro da un punto di vista igienico-sanitario (si crede che allevamenti ed acque siano costantemente controllati) ed è ritenuto più economico, anche

se l'idea di 'industriale' ed 'artificioso' è un aspetto che rimane costante nell'immaginario del consumatore (viene paragonato al pollo di batteria). Per quel che riguarda il concetto di biologico associato al pesce, questo desta parecchie perplessità in quanto, se all'inizio i consumatori tendono a credere che il pesce di per sé sia 'biologico' perché vive allo stato selvatico, ad una più attenta riflessione arrivano alla conclusione che il pesce biologico deve rispettare determinati standard igienico-sanitari e di sostenibilità (allevamento in acque pulite, alimentazione naturale, rispetto dei tempi di crescita e salvaguardia dell'ecosistema), quindi non può che essere allevato.

Esiste una differenza tra i luoghi d'acquisto. Con l'espandersi della grande distribuzione, i cittadini dell'entroterra hanno avuto la possibilità di avvicinarsi al pesce sia grazie alla comodità di accesso (oltre ad acquistare del pesce si può fare tutta la spesa), sia alla fiducia riposta nei grandi supermercati (si ritiene esistano più controlli, quindi una maggiore igiene e freschezza del prodotto) che permettono anche ai consumatori meno abituati al consumo di sentirsi tutelati da acquisti sbagliati; nota negativa è la lontananza fisica tra l'acquirente ed il banco del pesce che non permette un controllo di qualità prima di comprare. Altro luogo tipico per l'acquisto di prodotti ittici è il mercato rionale o la bottega di fiducia che, in contrasto alla sensazione di freddezza della grande distribuzione, dà percezione di 'calore', legando emotivamente gli acquirenti. Soprattutto tra i cittadini costieri, si forma un rapporto stretto con il dettagliante, spesso immaginato essere in contatto con il pescatore, se non il pescatore stesso; l'acquisto al mercato sembra generare la sensazione di un sapore più intenso e di una maggiore genuinità del pesce a cui si affianca una più elevata possibilità di confrontare i prezzi. All'interno dei luoghi di vendita, il venditore acquista un ruolo molto importante per il consumatore, ma anche in questo caso esiste una differenza in base alla zona di residenza. Nelle città lontane dal mare, in cui quindi il consumo di pesce è minore, il venditore diventa il consulente per un prodotto che non è conosciuto come altri (per esempio, la carne); nelle aree costiere, invece, il venditore non è altrettanto fondamentale perché più consumatori si ritengono in grado di conoscere specie, modalità d'uso e freschezza del pesce.

Tra le informazioni più richieste dai consumatori (se non quasi considerate obbligatorie) ci sono il prezzo (la sua assenza genera diffidenza e l'ipotesi che sia elevato), la provenienza (tra l'altro non sempre comprensibile da buona parte degli acquirenti), la specie ittica, lo stato fisico (fresco, congelato, surgelato), il metodo di produzione (allevato o pescato); tra le informazioni più frequentemente attese ci sono la modalità di conservazione, i consigli per la preparazione in cucina o per l'abbinamento ad altri cibi o a bevande e vini, le date di pesca e di scadenza (fortemente volute dai consumatori fino quasi ad essere

considerate obbligatorie). A conti fatti, gli Italiani preferiscono avere un serie equilibrata d'informazioni, ovvero non troppo scarse, ma nemmeno eccessive ed inutili; se poi è vero che un cartellino 'povero' richiama ad un prodotto genuino e vicino all'origine, è però altrettanto vero che si crea una sensazione di sfiducia e di scarsa credibilità verso il prodotto così etichettato. Non bisogna cadere però nella situazione contraria: un sito internet di riferimento o il nome della specie in latino rendono l'informazione più completa ma si rischia che la sensazione percepita dal consumatore sia quella di una comunicazione non autentica, ma pubblicitaria.

Al momento dell'acquisto, tra i consumatori è risultata una preferenza per i prodotti di provenienza vicina. Questo aspetto è legato alla convinzione che un pesce pescato in mari limitrofi sia più fresco (per i trasporti più brevi e per minor numero di passaggi tra operatori del settore), più controllato e quindi più sicuro (esiste la convinzione che i controlli in Italia siano più efficaci e frequenti e che le normative siano molto restrittive), senza tralasciare la componente emotiva connessa al sentimento d'appartenenza ad una comunità. Ai prodotti pescati in mari lontani vengono attribuite, invece, caratteristiche negative come l'essere meno controllati, essere pescati senza attenzione ad aspetti etici ed essere mantenuti in condizioni igienico-sanitarie peggiori.

I.6 Esposti di legge UE in tema di tracciabilità ed etichettatura alimentare

“La sicurezza degli alimenti e la tutela degli interessi dei consumatori sono fonte di crescente preoccupazione per i cittadini, le organizzazioni non governative, le associazioni professionali, le controparti commerciali internazionali e le organizzazioni commerciali”. Per questo motivo, “occorre far sì che la fiducia dei consumatori e delle controparti commerciali sia garantita attraverso l'elaborazione aperta e trasparente della legislazione alimentare e attraverso interventi adeguati da parte delle autorità pubbliche per informare i cittadini qualora vi siano ragionevoli motivi per sospettare che un alimento comporti un rischio per la salute” (Reg. 178/2002). Con l'idea di “perseguire un elevato livello di tutela della salute”, di “costituire una base comune per le disposizioni adottate in materia di alimenti e mangimi” a livello di Stati membri e per “far sì che i consumatori, gli altri soggetti interessati e le controparti commerciali abbiano fiducia nei processi decisionali alla base della legislazione alimentare” e per avere, inoltre, standard di produzione armonici a livello internazionale, l'Unione Europea ha stilato una serie di regolamenti *ad hoc*, che tracciano le linee guida per

un corretto sistema di produzione, tracciabilità ed etichettatura delle risorse alimentari.

La premessa per riuscire ad ottenere la circolazione libera e sicura degli alimenti tra gli Stati membri è che i requisiti di sicurezza delle derrate alimentari e dei mangimi non presentino differenze significative tra uno Stato e l'altro. Per garantire questa condizione è necessario che “esista la possibilità di ricostruire il percorso compiuto dagli alimenti attraverso un sistema generale di rintracciabilità dei prodotti alimentari e dei mangimi che permetta alle imprese alimentari di essere in grado di individuare l'azienda che ha fornito loro l'alimento, il mangime, l'animale o la sostanza che può entrare a far parte di un dato alimento o di un dato mangime e che consenta di poter procedere a ritiri mirati e precisi, di fornire informazioni ai consumatori o ai funzionari responsabili dei controlli per evitare disagi quando la sicurezza degli alimenti è in pericolo”. (Reg. 178/2002)

Con questi propositi, è stato stilato il Regolamento (CE) N. 178/2002. Allo scopo di tutelare la salute umana mantenendo funzionante il mercato alimentare, le novità introdotte con questo regolamento furono molte.

Per prima cosa, si è iniziato a considerare il processo produttivo, dal rifornimento dei mangimi per gli animali d'allevamento fino alla distribuzione dei prodotti di origine animale al consumatore, come un'unica entità (“[...]considerando come processo unico tutti gli aspetti della catena di produzione, prendendo in considerazione la produzione, la trasformazione, il trasporto e la distribuzione dei mangimi con i quali vengono nutriti gli animali destinati alla produzione alimentare, compresa la produzione di animali che potrebbero essere utilizzati come mangimi negli allevamenti di pesci, dato che contaminazioni accidentali o intenzionali dei mangimi, adulterazioni o pratiche fraudolente o altre pratiche scorrette in relazione ad essi possono avere un'incidenza diretta o indiretta sulla sicurezza degli alimenti”). L'importanza di questo aspetto è che si inizia a prendere in considerazione la necessità di controllare non solo gli animali da cui i prodotti per l'alimentazione umana sono derivati, ma, più a monte, la salubrità con cui gli stessi animali vengono allevati.

Dopo aver stabilito i requisiti generali per alimenti e mangimi sicuri, il regolamento introduce il concetto di rintracciabilità obbligatoria: “gli operatori del settore alimentare e dei mangimi devono essere in grado di individuare chi abbia fornito loro un alimento, un mangime, un animale destinato alla produzione alimentare o qualsiasi sostanza destinata o atta a entrare a far parte di un alimento o di un mangime”, “devono disporre di sistemi e procedure per individuare le imprese alle quali hanno fornito i propri prodotti” e per ottenere questo gli alimenti o i mangimi che sono immessi sul mercato “devono essere adeguatamente etichettati o identificati per agevolarne la rintracciabilità, mediante documentazione o informazioni

pertinenti”. Occorre fare una precisazione a tal proposito. L’implementazione dei sistemi di rintracciabilità costituisce uno strumento indispensabile per valorizzare particolari caratteristiche di un prodotto (ad esempio, l’origine/territorialità o le caratteristiche peculiari degli ingredienti) oltre che per soddisfare le aspettative del cliente (che esso sia GDO o consumatore finale). E' chiaro che il solo sistema di rintracciabilità non è in grado di garantire la sicurezza del prodotto alimentare, ma può sicuramente dare un importante contributo al raggiungimento di tale obiettivo perché, qualora si manifesti una non conformità di tipo igienico-sanitario, consente da un lato di risalire fino al punto della filiera in cui si è originato il problema, dall’altro di procedere - se necessario - con il ritiro “mirato” del prodotto.

Vengono introdotti i concetti di 'analisi del rischio' e 'principio di precauzione'. Con questi principi, ogni step di produzione viene controllato, ne vengono controllati i punti critici e vengono messe in atto pratiche per evitare eventuali problematiche che possano scaturire da quel determinato livello di produzione e che comportino danno alla salute umana, agevolando così la “prevenzione di ostacoli ingiustificati alla libera circolazione degli alimenti”. Per far sì che ci sia obiettività nell'analisi dei punti critici, è stabilito che le valutazioni di rischio debbano essere condotte “in modo indipendente, obiettivo e trasparente ed essere basate sulle informazioni e sui dati scientifici disponibili”. Viene poi introdotta la responsabilità degli operatori del settore alimentare: essi, ad ogni livello produttivo (che si tratti di mangimi o dell'alimento finale), devono controllare che non vengano introdotti sul mercato prodotti non conformi e sono tenuti ad informare “immediatamente le autorità competenti quando ritengano o abbiano motivo di ritenere che un alimento da essi immesso sul mercato possa essere dannoso per la salute umana”.

Infine, viene istituita un'Autorità Europea per la sicurezza alimentare, organo che rappresenta una fonte scientifica indipendente di consulenza, d'informazione e comunicazione del rischio, al fine di accrescere la fiducia dei consumatori e, grazie alla collaborazione degli Stati membri, dei produttori e delle associazioni di consumatori, permettere una libera circolazione degli alimenti all'interno dell'Europa.

In Italia, la norma di riferimento per la certificazione di sistemi di tracciabilità nel settore agroalimentare è la ISO 22005 emanata nel 2007 (“*Traceability in the feed and food chain – General principles and basic requirements for system design and implementation*”) che si applica anche alle produzioni mangimistiche. Essa è una norma internazionale e, sebbene sia su base volontaria, aiuta a rendere maggiormente visibili e affidabili i processi aziendali, consentendo di comunicare responsabilità e fiducia ai consumatori. I principali obiettivi di questa norma sono di supportare gli obiettivi di qualità e sicurezza; di rispondere

alle richieste esplicite del consumatore; di definire la storia e l'origine del prodotto; di facilitare eventuali ritiri o richiami dei prodotti commercializzati; d'identificare le responsabilità di ciascun operatore della filiera; di facilitare il controllo di specifiche informazioni che riguardano il prodotto agroalimentare; di comunicare specifiche informazioni ai maggiori *stakeholder* e ai consumatori; di adempiere ad eventuali obblighi imposti da normativa locale, nazionale o internazionale; di aumentare il rendimento, la produttività e i guadagni dell'organizzazione. Per poter avere la certificazione di attuazione della norma, l'operatore alimentare deve progettare e realizzare un sistema di rintracciabilità, seguendo determinati aspetti (vedi norma ISO:22005). Una volta ottenuta la certificazione, questa ha validità triennale, mentre annualmente sono previsti *audit* di sorveglianza per la conferma del certificato nel triennio di validità del contratto.

In ambito ittico, per quello che riguarda tracciabilità ed etichettatura, sono stati redatti regolamenti precisi, ovvero il Regolamento CE n. 104/2000 ed il Regolamento CE n. 2065/2001, che disciplina il precedente, entrati in vigore dal 1° gennaio 2002.

In dettaglio, con il Regolamento (CE) N. 104/2000 l'Unione Europea si è prefissata di creare un'organizzazione comune dei mercati della pesca grazie alla collaborazione tra Autorità competenti ed associazioni di pescatori; di favorire lo sfruttamento sostenibile e la valorizzazione di prodotti sul mercato, anche attraverso l'utilizzo di derrate fresche ritirate dal mercato concedendo, ai fini del consumo umano, un aiuto per la loro trasformazione, stabilizzazione ed ammasso (ad es. congelamento, salagione, essiccazione, marinatura, cottura e pastorizzazione); di applicare norme comuni di commercializzazione per “eliminare dal mercato i prodotti di qualità non soddisfacente e facilitare le relazioni commerciali sulla base di una concorrenza leale”; di controllare in modo stretto prodotti freschi o trasformati; di fornire ai consumatori un minimo dettaglio d'informazioni sulle caratteristiche principali dei prodotti (denominazione commerciale della specie, il metodo di produzione, la zona di cattura); di raggruppare l'offerta da parte delle organizzazioni di produttori con “orientamento della produzione secondo i bisogni di mercato” per una “valorizzazione ottimale delle catture, [...] presentando una serie di misure previsionali volte a pianificare i quantitativi conferenti ed a regolamentare preventivamente l'offerta dei loro aderenti”; di concedere agli Stati non membri di poter commercializzare all'interno della comunità; di creare una politica economica comune che fissi un prezzo di orientamento per ciascuna campagna di pesca in modo da “tener conto delle prospettive di evoluzione della produzione e della domanda, della necessità di stabilizzare i costi sui mercati e di evitare la formazione di eccedenze, di contribuire al reddito dei produttori e di prendere in considerazione gli interessi dei consumatori” e che

possa portare aiuto alle organizzazioni di produttori nel caso in cui ci siano dei turbamenti di mercato, riconoscimenti adeguati qualora queste “conducano iniziative positive per il raggiungimento di una migliore percezione della realtà di mercato”, un regime comunitario di sostegno dei prezzi, la concessione di indennità compensative ai produttori, la sospensione dei dazi doganali “per assicurare alle industrie alimentari di trasformazione condizioni di approvvigionamento sufficiente anche da Paesi terzi, senza però che il prezzo di rifornimento sia anormalmente basso per non ostacolare la compravendita all'interno della comunità”.

Il Regolamento (CE) N. 2065/2001 stabilisce le modalità d'applicazione del regolamento precedentemente descritto, precisandone il campo d'applicazione, adeguando le denominazioni commerciali ammesse in funzione delle esigenze di mercato, precisando le modalità d'informazione ai consumatori, definendo le esigenze per cui, per piccole quantità di prodotto, non è obbligatorio fornire informazioni ai consumatori e disponendo che gli stati membri istituiscano un regime di controllo di tracciabilità.

In pratica, questi regolamenti stabiliscono che in Europa, i prodotti ittici vivi, freschi o refrigerati, congelati, secchi, salati o in salamoia provenienti sia dall'attività di pesca sia dall'acquacoltura, commercializzati sul territorio comunitario a prescindere dalla loro origine (anche quando importati da Paesi terzi) e destinati al consumatore finale possono essere commercializzati solo se recano un'indicazione o un'etichetta che contenga la denominazione commerciale della specie, il metodo di produzione e la zona di cattura o di allevamento, facendo rientrare nel campo di applicazione dei due regolamenti anche i prodotti decapitati, tagliati a pezzi o in filetti, oppure triturati, escludendone i prodotti cotti, preparati o conservati con procedimenti diversi per esempio, le conserve di pesci, di crostacei e di molluschi (tonno, sardine all'olio, ecc.), gli impanati e altri tipi di preparazioni alimentari (a base di surimi, sughi, caviale e suoi sucedanei preparati con uova di pesce, ecc.).

Le informazioni obbligatorie da fornire con l'etichettatura sono distinte tra la fase di vendita al dettaglio e le fasi precedenti. Nella vendita al dettaglio devono essere fornite la denominazione commerciale della specie (secondo l'elenco predisposto dallo Stato membro; in Italia, tale elenco è allegato al D.M. del 27 marzo 2002 ed è stato integrato dal D.M. del 5 marzo 2010); il metodo di produzione (pescato, pescato in acque dolci o allevato); la zona di cattura o di allevamento (per i prodotti pescati in mare, l'indicazione delle zone di pesca definite dalla FAO; per i prodotti pescati in acque dolci, l'indicazione dello Stato membro o del Paese terzo di origine; per i prodotti allevati, l'indicazione dello Stato membro o del Paese terzo di allevamento in cui si è svolta la fase finale di sviluppo del prodotto, ovvero la fase che intercorre tra lo stadio giovanile e la taglia commerciale). Nelle fasi precedenti alla

vendita al dettaglio, ad ogni stadio di commercializzazione devono figurare la denominazione scientifica della specie (anch'essa contenuta negli elenchi predisposti dallo Stato membro), la denominazione commerciale, il metodo e la zona di produzione.

In sintonia con i regolamenti Europei riguardanti i prodotti alimentari e con l'intento di tutelare gli interessi dei consumatori e fornire loro un livello elevato di protezione per la salute, è stato pubblicato recentemente il Regolamento N. 1169/2011 (Reg. (UE) N. 1169/2011) in tema di etichettatura degli alimenti, che, oltretutto, aggiorna la più vecchia Direttiva 90/496/CEE relativa all'etichettatura nutrizionale (Direttiva 90/496/CEE).

Con questa serie di norme, l'Unione Europea vuole permettere ai cittadini di “effettuare scelte consapevoli ed utilizzare gli alimenti in modo sicuro, nel rispetto in particolare di considerazioni sanitarie, economiche, ambientali, sociali ed etiche”, permettendo in ogni caso “la libera circolazione degli alimenti legalmente prodotti e commercializzati, tenuto conto della necessità di proteggere gli interessi legittimi dei produttori e di promuovere la fabbricazione di prodotti di qualità”.

Il presupposto che ha mosso la stesura di questo regolamento è stata l'evidenza che la maggior parte dei cittadini è interessata al rapporto tra l'alimentazione e la salute perché esiste la consapevolezza che la scelta di una dieta adeguata previene o rallenta l'instaurarsi di un'ampia serie di malattie metaboliche. In questo frangente, risulta chiaro come l'etichettatura nutrizionale sia uno dei metodi principali per informare i consumatori sulla composizione degli alimenti, aiutarli ad adottare decisioni consapevoli e garantire, parallelamente, il mantenimento di una concorrenza efficace tra i diversi operatori del settore. In sintesi, questo regolamento “definisce in modo generale i principi, i requisiti e le responsabilità che disciplinano le informazioni sugli alimenti e, in particolare, l'etichettatura degli stessi; fissa gli strumenti volti a garantire il diritto dei consumatori all'informazione e le procedure per la fornitura di informazioni sugli alimenti, tenendo conto dell'esigenza di prevedere una flessibilità sufficiente in grado di rispondere alle evoluzioni future e ai nuovi requisiti di informazione”.

In pratica, le caratteristiche fondamentali di un'etichetta devono essere la leggibilità, (“informazioni obbligatorie sugli alimenti sono apposte in un punto evidente in modo da essere facilmente visibili, chiaramente leggibili ed eventualmente indelebili”); la veridicità (l'etichette non deve indurre in errore il consumatore fornendo al prodotto attributi non reali e non devono essere omesse informazioni); il corretto contenuto di informazioni. Tra le informazioni da fornire esistono quelle obbligatorie e facoltative. Le indicazioni obbligatorie sono:

- la denominazione dell'alimento;
- l'elenco degli ingredienti;
- qualsiasi ingrediente provochi allergie o intolleranze;
- la quantità di taluni ingredienti o categorie di ingredienti (come per esempio gli additivi, i coloranti o i nano materiali);
- la quantità netta dell'alimento;
- il termine minimo di conservazione o la data di scadenza; le condizioni particolari di conservazione e/o le condizioni d'impiego;
- il nome o la ragione sociale e l'indirizzo dell'operatore del settore alimentare (che risulta, tra l'altro, avere la responsabilità del prodotto e della sua etichettatura);
- il paese d'origine o il luogo di provenienza;
- le istruzioni per l'uso, per i casi in cui la loro omissione renderebbe difficile un uso adeguato dell'alimento;
- per le bevande che contengono più di 1,2 % di alcol in volume, il titolo alcolometrico volumico effettivo;
- una dichiarazione nutrizionale fornita riferendosi a quantità di 100 g o 100 ml oppure, nel caso in cui l'alimento sia pre-imballato e siano precisate porzioni o unità di consumo, una dichiarazione nutrizionale per porzione o per unità di consumo, come integrazione all'espressione per 100 g o per 100 ml. Tra le indicazioni nutrizionali da recare in etichetta devono essere presenti il valore energetico, le quantità di grassi, acidi grassi saturi, carboidrati, zuccheri, proteine e sale. Informazioni facoltative da aggiungere alla dichiarazione nutrizionale possono essere le quantità di acidi grassi monoinsaturi, acidi grassi polinsaturi, polioli, amido, fibre, sali minerali o vitamine.

Un aspetto importante da sottolineare è che il valore energetico e le quantità di sostanze nutritive da recare obbligatoriamente si riferiscono all'alimento così com'è venduto ma, nel caso in cui l'alimento sia venduto previa lavorazione, "tali informazioni possono riguardare l'alimento dopo la preparazione, a condizione che le modalità di preparazione siano descritte in modo sufficientemente particolareggiato e le informazioni riguardino l'alimento pronto per il consumo".

I.7 Wrap it up!

Riassumendo quanto detto fin'ora, è chiaro che, in un contesto economico in cui la domanda all'acquisto risulta estremamente diversificata per l'aumentata attenzione dei cittadini nei confronti dei prodotti alimentari, le caratteristiche '*food quality*' e '*food safety*' sono fondamentali e ricercate da parte di tutte le categorie di consumatori.

In generale però, all'atto dell'acquisto, il consumatore si confronta con una serie d'aspetti, razionali ed emotivi, che lo portano a comprare o meno un alimento. Nella ricerca di informazioni sul prodotto in esame, esistono infatti influenze interne personali (gusto, benessere dei propri cari, budget familiare) ed esterne (consigli di medici e campagne governative, etichette più o meno chiare), oltre che aspettative personali e pressioni sociali, che orientano l'opinione dell'acquirente.

Per quel che riguarda il pesce, il sapere di compiere qualcosa di positivo per la propria salute e quella dei propri cari è l'aspetto che maggiormente influenza la scelta al consumo, visto che i prodotti del mare sono considerati salutari, gustosi e nutrienti da una larga parte della popolazione. Indifferentemente dal contesto geografico, sebbene esista la consapevolezza generale di quanto sia importante una dieta ricca in prodotti ittici e siano in corso in tutto il mondo campagne pubblicitarie per incrementarne il consumo, esistono però realtà molto diverse in cui si verificano *trend* d'acquisto incostanti. Si è visto che, a grandi linee, i consumatori si dividono in 'abituati' al consumo e 'non abituati' ed, in base a questa distinzione, esiste una risposta diversa alle cosiddette barriere legate al prodotto in sé che potenzialmente ne limitano l'acquisto.

Il pesce è percepito come un alimento dispendioso da un punto di vista economico (è più costoso della carne) e di tempo (comunemente si ritiene chieda più tempo per essere preparato); contiene lisce e può creare cattivo odore in casa; bisogna essere pratici nella sua preparazione e per riconoscerne le caratteristiche di freschezza; se il nucleo familiare è ristretto o sono presenti adolescenti, è spesso difficile sentirsi motivati a cucinarlo. Considerando questi svantaggi, i consumatori 'abituati', non si fanno comunque porre limiti e considerano il pesce alla stregua di qualsiasi altro alimento; contraria è invece la reazione di chi non è abituato al consumo. Tra l'altro, il profilo di chi acquista più facilmente pesce sembra seguire uno standard: donne di media età con un buon livello d'istruzione, senza grossi problemi economici, che si occupano di famiglie relativamente numerose. E' chiaro che queste caratteristiche non sono fisse, ma si è visto che il genere (donna > uomo), l'età (anziani > giovani), il livello d'istruzione (alto > basso), il reddito (alto > basso) e la regione di

provenienza (zone costiere > zone interne) influenzano profondamente l'abitudine dei consumatori.

Quando poi si opta per l'acquisto di prodotti ittici, ci si trova di fronte una serie d'informazioni che, pur avendo lo scopo di facilitare la scelta, potrebbero avere l'effetto opposto. Anche in questo caso, l'abitudine del singolo consumatore fa sì che il suo comportamento si differenzi, facendogli preferire determinate informazioni e fonti da cui trarle rispetto ad altre. I consumatori abituali di pesce, per esempio, si sentono più sicuri delle proprie capacità decisionali, quindi informazioni come la denominazione di specie, la zona d'allevamento o di cattura ed il solo esame visivo possono bastare a renderli predisposti verso un determinato prodotto, tanto più se venduto da un negoziante di fiducia. I consumatori con scarsa esperienza, invece, controllano molto più facilmente informazioni quali la data di scadenza, il prezzo ed eventualmente le modalità di preparazione, facendosi comunque consigliare da parenti e amici, non sentendosi all'altezza di scegliere da soli. Oltretutto, i consumatori inesperti sono anche quelli che si fanno influenzare più facilmente da informazioni negative sulla salubrità del prodotto, come per esempio la possibile presenza di sostanze tossiche o i metodi d'allevamento percepiti come qualcosa di 'snaturante'. Pur non esistendo prove scientifiche in merito, la stragrande maggioranza dei consumatori, anche quelli abituali, tendono a considerare i prodotti d'allevamento meno sani di quelli pescati, preferendo questi ultimi, soprattutto se la scelta viene fatta pensando ai familiari.

Considerato il rapporto 'combattuto' che il consumatore intrattiene con gli alimenti in generale e con l'alimento ittico in particolare, l'Unione Europea ha stilato una serie di regolamenti allo scopo di metter chiarezza in tema di tracciabilità degli alimenti, partendo dall'idea che il miglioramento dei sistemi di rintracciabilità sia uno strumento indispensabile per la valorizzazione di particolari caratteristiche dei prodotti (come l'origine/territorialità o le caratteristiche peculiari di particolari lavorazioni) e per il soddisfacimento dei cittadini. I principali intenti di queste leggi sono di supportare gli obiettivi di qualità e sicurezza, rispondendo alle richieste esplicite dei consumatori, definendo la storia e l'origine dei prodotti, facilitando eventuali ritiri o richiami dei prodotti commercializzati ed identificando le responsabilità di ciascun operatore della filiera.

Più precisamente, il Regolamento N. 178/2002, che regola tutte le derrate alimentari, ed i Regolamenti N. 104/2000 e N. 2065/2001, specifici per le derrate ittiche, rendono obbligatorie determinate indicazioni sui prodotti in commercio. In ambito ittico, informazioni quali la denominazione commerciale della specie, il metodo di produzione e la zona di cattura o di allevamento sono indicazioni caratteristiche e discriminanti il prodotto, quindi necessarie

ai fini della sua rintracciabilità. In aggiunta a queste, il recente regolamento N. 1169/2011 definisce e precisa tutte le informazioni obbligatorie da mettere in etichetta, unendo alle informazioni caratterizzanti anche indicazioni nutrizionali, sia sul prodotto venduto tal quale sia sul prodotto eventualmente trasformato. Questo aspetto risulta essere molto importante, considerando tanto l'approccio "industriale", quanto quello "casalingo" agli alimenti ittici. Nella maggior parte dei casi, pesci, molluschi e crostacei vengono acquistati freschi per poi essere processati, pratica che può indurre cambiamenti nella loro composizione chimica dell'alimento. Più in dettaglio, è stato dimostrato che i diversi metodi di cottura possono modificare la composizione acidica dei lipidi (García-Arias et al., 2003; Türkkan et al., 2008; Weber et al., 2008), come pure quella minerale (Gokoglu et al., 2004; Ersoy et al., 2009) e possono anche concentrare contaminanti tossici (Emami-Khansari et al., 2005; Musaiger e D'Souza, 2008). Questo implica che il consumatore, indotto all'acquisto anche dalle caratteristiche nutritive di un dato alimento ittico, spesso si trova ad acquistare prodotti che se consumati tal quale possiedono determinate proprietà nutritive, mentre dopo lavorazione potrebbero perdere le caratteristiche nutritive per cui vengono scelti.

Detto questo, sembrerebbe quindi ovvio che fattori quali l'etichettatura dettagliata e la tracciabilità possano essere utili alla caratterizzazione del prodotto preso in esame e che quindi sia facile, con semplici mezzi, riuscire a conquistare la fiducia di chi acquista. Purtroppo, pur essendo nato con l'intento di ridurre le preoccupazioni su qualità e sicurezza degli alimenti e per aumentare la sensibilità verso produzioni sostenibili, offrire trasparenza durante gli scambi commerciali e salvaguardare la salute pubblica, il concetto di tracciabilità, almeno in ambito ittico, non risulta sempre ben chiaro. Per esempio, Giraud e Halawany (2006), in un sondaggio che ha coinvolto 210 cittadini di 9 Stati Comunitari, riportano che esiste un ampio divario per quanto riguarda la definizione e l'interesse verso questo aspetto: è risultato infatti che la tracciabilità è più spesso percepita come qualcosa che ricollega ad un'origine 'genuina' dei prodotti piuttosto che alla possibilità di seguire il loro percorso lungo la catena produttiva.

In definitiva, nonostante gli sviluppi tecnologici e le chiare norme legislative, nonostante sia stato dimostrato (Jacquet e Pauly, 2008) come la non corretta etichettatura comporti aspetti negativi quali l'incorrere del consumatore in frodi (esemplari allevati pagati come se fossero selvatici) e la possibile ingestione di contaminanti (esemplari creduti di una zona "pulita" in effetti provenienti da zone inquinate), sembra che sia ancora molto difficile tracciare l'origine dei prodotti ittici, soprattutto a livello di grande distribuzione (Sioen et al., 2007) e, di conseguenza, avere la totale fiducia dei consumatori.

Da queste premesse si evince come la volontà di caratterizzare chiaramente i prodotti ittici risulta essere di primaria importanza per dare credibilità al settore, per valorizzare i prodotti nazionali e per conquistare quella fiducia che il consumatore medio ancora stenta a dare.

I.8 Bibliografia

- Ajzen I. (2001). Nature and operation of attitudes. *Annual review of psychology*, 52, 27–58.
- Altintzoglou T., Verbeke W., Vanhonacker F., Luten J. (2010). The image of fish from aquaculture among Europeans: impact of exposure to balanced information. *Journal of Aquatic Food Product Technology* 19, (2), 103–119, DOI:10.1080/10498850.2010.492093.
- Bello Acebrón L., Calvo Dopico D (2000). The importance of intrinsic and extrinsic cues to expected and experienced quality: an empirical application for beef. *Food Quality and Preference* 11 229–238.
- Boulding, W., Kirmani, A. (1993). A consumer-side experimental examination of signalling theory. *Journal of Consumer Research*, 20, 111–123.
- Bredahl L. (2001). Determinants of Consumer Attitudes and Purchase Intentions With Regard to Genetically Modified Food – Results of a Cross-National Survey. *Journal of consumer policy*, 24(1), 23–61, DOI: 10.1023/A:1010950406128.
- Bredahl, L. (2004). Cue utilisation and quality perception with regard to branded beef. *Food Quality and Preference*, 15, 65–75.
- Brunso, K., Fjord, T. A., Grunert, K. G. (2002). Consumers' food choice and quality perception. MAPP working paper 77. Aarhus: Aarhus School of Business. <https://pure.au.dk/portal/files/32302886/wp77.pdf>
- Brunso K., Verbeke W. Olsen S. O., Fruensgaard Jeppesen L. (2007). Motives, barriers and quality evaluation in fish consumption situations: exploring and comparing heavy and light users in Spain and Belgium. *British Food Journal*, 111 (7), 699–716, DOI:10.1108/00070700910972387.
- Cox, D. F. (1967). The sorting rule model of the consumer product evaluation process, 324–369. In (D.F. Cox ed.), *Risk Taking and Information Handling in Consumer Behaviour*. Boston, MA: Graduate School of Business Administration, Harvard University.
- Emami-Khansari F., Ghazi-Khansari M., Abdollahi M. (2005). Heavy metals content of

- canned tuna fish. *Food Chemistry*, 93, 293–296.
- Ersoy B., Özeren A. (2009). The effect of cooking methods on mineral and vitamin contents of African catfish. *Food Chemistry*, 115, 419–422.
- Feng W., Jian Z., Weisong M., Zetian F., Xiaoshuan Z. (2009). Consumers' perception toward quality and safety of fishery products, Beijing, China. *Food Control*, 20, 918–922, DOI:10.1016/j.foodcont.2009.01.008.
- Frewer L. J., Kole A., Van de Kroon S.M.A., De Lawere C. (2005). Consumer attitudes towards the development of animal-friendly husbandry systems. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*, (2005) 18, 345–367, DOI:10.1007/s10806-005-1489-2.
- García-Arias M.T., Álvarez Pontes E., García-Linares M.C., García-Fernández M.C., Sánchez-Muniz F.J. (2003). Cooking–freezing–reheating (CFR) of sardine (*Sardina pilchardus*) fillets. Effect of different cooking and reheating procedures on the proximate and fatty acid compositions. *Food Chemistry*, 83(3), 349–356.
- Gigerenzer, G., Todd, P. M. (1999). Simple heuristics that make us smart. Oxford, UK: Oxford University Press.
http://www.dangoldstein.com/papers/Czerlinski_How_Good_Are_Simple_Heuristics_Chapter_1999.pdf.
- Giraud G., Halawany R. (2006). Consumers' Perception of Food Traceability in Europe. Paper prepared for presentation at the 98th EAAE Seminar 'Marketing Dynamics within the Global Trading System: New Perspectives', Chania, Crete, Greece as in: 29 June – 2 July, 2006, <http://ageconsearch.umn.edu/bitstream/10047/1/sp06gi04.pdf>.
- Gokoglu N., Yerlikaya P., Cengiz E. (2004). Effects of cooking methods on the proximate composition and mineral contents of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Food Chemistry*, 84, 19–22.
- Grunert K. G. (2005) Food quality and safety: consumer perception and demand. *European Review of Agricultural Economics* 32(3), 369–391, DOI:10.1093/eurrag/jbi011.
- Hossain M.A. (2011). Fish as Source of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids (PUFAs), Which One is Better-Farmed or Wild?. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 3(6): 455-466.
- ISMEA (2011). Il pesce a tavola: percezioni e stili di consumo degli italiani. Preferenze e comportamento del consumatore, grado di informazione e conoscenza della normativa sull'etichettatura attraverso la tecnica dei focus group, 25 pp.
<http://www.ismea.it/flex/cm/pages/ServeBLOB.php/L/IT/IDPagina/6191>.

- Jacquet J.L., Pauly D. (2008). Trade secrets: Renaming and mislabeling of seafood. *Marine Policy*, 32, 309–318, DOI:10.1016/j.marpol.2007.06.007.
- Juhl, H. J., Poulsen, C. S. (2000). Antecedents and effects of consumer involvement in fish as a product group. *Appetite*, 34, 261–267.
- Knight J.G. (2005) Impact of Genetically Modified Organisms on Perceptions of Country Image: Implications for Food Exporters, <http://www.haofile.net/other/enpdf/PDF/660156.pdf>.
- Lambert J., Klieb L., Weber M. (2008). Regional influences upon the selection of imported versus domestic seafood. *Academy of Marketing Studies Journal*, 12(1), 17–42.
- Musaiger A.O., D’Souza R. (2008). The effects of different methods of cooking on proximate, mineral and heavy metal composition of fish and shrimps consumed in the Arabian Gulf. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 58 (1), 103–109.
- Myrland, Ø., Trondsen, T., Johnston, R. S., Lund, E. (2000). Determinants of seafood consumption in Norway: Lifestyle, revealed preferences, and barriers to consumption. *Food Quality and Preference*, 11, 169–188.
- Olsen, S. O. (2003). Understanding the relationship between age and seafood consumption: The mediating role of attitude, health involvement and convenience. *Food Quality and Preference*, 14, (3), 199–209, DOI:10.1016/S0950-3293(02)00055-1.
- Pieniak Z., Verbeke W., Scholderer J., Brunsø K., Olsen S. O. (2007). European consumers’ use of and trust in information sources about fish. *Food Quality and Preference*, 14, 199–209.
- Pieniak Z., Verbeke W., Perez-Cueto F., Brunsø K., De Henauw S. (2008a). Fish consumption and its motives in households with versus without self-reported medical history of CVD: a consumer survey from five European countries. *BMC Public Health*, 8, 306–320, DOI:10.1186/1471-2458-8-306.
- Pieniak Z., Verbeke W., Scholderer J., Brunsø K., Olsen S. O. (2008b). Impact of consumers’ health beliefs, health involvement and risk perception on fish consumption: a study in five European countries. *British Food Journal*, 110(9), 898–915, DOI:10.1108/00070700810900602.
- Scientific Advisory Committee on Nutrition, Committee on toxicity of chemicals in food (2004). Advice on fish consumption: Benefits and risks. London: TSO. www.detoxmetals.com/content/FISH/FISH/fishreport200401.pdf.
- Sioen I., Verbeke W., De Henauw S., Parmentier K., Raemaekers M., Willems J., Van Camp J. (2007). Determining the origin of seafood products on the belgian market: challenges

- to traceability and database management. *The Open Food Science Journal*, 1, 33–42.
- Trondsen, T., Scholderer, J., Lund, E., & Eggen, A. E. (2003). Perceived barriers to consumption of fish among Norwegian women. *Appetite*, 41, 301–314.
- Trondsen, T., Braaten, T., Lund, E., Eggen, A. E. (2004a). Health and seafood consumption patterns among women aged 45–69 years. A Norwegian seafood consumption study. *Food Quality and Preference*, 15, 117–128.
- Trondsen T., Braaten T., Lund E., Eggen A.E. (2004b). Consumption of seafood—the influence of overweight and health beliefs. *Food Quality and Preference*, 5(4), 361–374.
- Türkkan A.U., Cakli S., Kilinc B. (2008). Effects of cooking methods on the proximate composition and fatty acid composition of seabass (*Dicentrarchus labrax*, Linnaeus, 1758). *Food and Bioproducts Processing*, 86, 163–166.
- van Rijswijk W., Frewer L.J. (2006). How consumers link traceability to food quality and safety: An international investigation. Paper prepared for presentation at the 98th EAAE Seminar ‘Marketing Dynamics within the Global Trading System: New Perspectives’, Chania, Crete, Greece as in: 29 June – 2 July, 2006.
- Verbeke, W. (2005). Agriculture and the food industry in the information age. *European Review of Agricultural Economics*, 32, 347–368.
- Verbeke W., Vackier I. (2005). Individual determinants of fish consumption: application of the theory of planned behaviour. *Appetite*, 44, 67–82, DOI:10.1016/j.appet.2004.08.006.
- Verbeke W., Sioen I., Pieniak Z., Van Camp J., De Henauw S. (2005). Consumer perception versus scientific evidence about health benefits and safety risks from fish consumption. *Public Health Nutrition*, 8(4):422–429, DOI: 10.1079/PHN2004697.
- Verbeke W., Sioen I., Brunsø K., De Henauw S., Van Camp J. (2007). Consumer perception versus scientific evidence of farmed and wild fish: exploratory insights from Belgium. *Aquaculture International*, 15, 121–136, DOI 10.1007/s10499-007-9072-7.
- Vermeir I., Verbeke W. (2006). Sustainable food consumption: exploring the consumer “attitude-behavioral intention” gap. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*, 19, 169–194.
- Vermeir I., Verbeke W. (2008). Sustainable food consumption among young adults in Belgium: Theory of planned behaviour and the role of confidence and values. *Ecological Economics*, 64(3), 542–553, DOI:10.1016/j.ecolecon.2007.03.007.
- Weber J., Bochi V.C., Ribeiro C.P., Victorio A.M., Emanuelli T. (2008). Effect of different cooking methods on the oxidation, proximate and fatty acid composition of silver

catfish (*Rhamdia quelen*) fillets. *Food Chemistry*, 106, 140–146.

Welch A.A., Lunda E., Amiano P., Dorronsoro M., Brustad M., Kumle M., Rodriguez M., Lasheras C., Janzon L., Jansson J., Luben R., Spencer E.A., Overvad K., Tjønneland A., Clavel-Chapelon F., Linseisen J., Klipstein-Grobusch K., Benetou V., Zavitsanos X., Tumino R., Galasso R., Bueno-de-Mesquita H.B., Ocké M.C., Charrondière U.R., Slimani N. (2002). Variability of fish consumption within the 10 European countries participating in the European investigation into cancer and nutrition (EPIC) study. *Public Health Nutrition*, 5, 1273–1285.

NORME:

ISO 22005 (2007), “*Traceability in the feed and food chain – General principles and basic requirements for system design and implementation*”,
<http://www.safefood.gov.cn/GB/files/uploadfiles/200811/20081117083256100.pdf>.

ESPOSTI DI LEGGE:

Decreto Ministeriale del 27 marzo 2002. Etichettatura dei prodotti ittici e sistema di controllo.
Gazzetta Ufficiale n. 84 del 10 aprile 2002

Decreto Ministeriale del 5 marzo 2010. Denominazione in lingua italiana di specie ittiche nell'elenco di cui al decreto del 27 marzo 2002 e successive modifiche ed integrazioni.
Gazzetta Ufficiale N. 124 del 29 Maggio 2010.

Direttiva 90/496/CEE del Consiglio del 24 settembre 1990 relativa all'etichettatura nutrizionale dei prodotti alimentari. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, L 276 del 6.10.1990, 40–44.

Regolamento (CE) N. 104/2000 del Consiglio del 17 dicembre 1999 relativo all'organizzazione comune dei mercati nel settore dei prodotti della pesca e dell'acquacoltura. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, L 17 del 21.1.2000, 22–52.

Regolamento (CE) N. 2065/2001 della Commissione del 22 ottobre 2001 che stabilisce le modalità d'applicazione del regolamento (CE) n. 104/2000 del Consiglio per quanto concerne l'informazione dei consumatori nel settore dei prodotti della pesca e dell'acquacoltura. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, L 278 del 23.10.2001, 6–8.

Regolamento (CE) N. 178/2002 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 28 gennaio 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. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, L31 del 1.2.2002, 1–24.

Regolamento (CE) 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 e abroga la direttiva 87/250/CEE della Commissione, la direttiva 90/496/CEE del Consiglio, la direttiva 1999/10/CE della Commissione, la direttiva 2000/13/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, le direttive 2002/67/CE e 2008/5/CE della Commissione e il regolamento (CE) n. 608/2004 della Commissione. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, L 304 del 22.11.2011, 18–63.

Parte II: Autenticazione d'origine

Nella società occidentale odierna, i consumatori hanno la possibilità di scegliere tra una moltitudine di prodotti diversi. All'atto dell'acquisto, ognuno di noi infatti può 'prenderci il lusso' di decidere in base al proprio gusto, al proprio stato di salute, alle proprie convinzioni etiche o, semplicemente, in base alla propria possibilità economica. Pur essendo un aspetto positivo della globalizzazione, questa variabilità di offerta deve però essere monitorata per far sì che il consumatore compri effettivamente ciò che ha scelto di acquistare senza incorrere in frodi o in rischi per la salute. È quindi di estrema importanza poter verificare quanto dichiarato in etichetta.

Per quel che riguarda i prodotti ittici, la variabilità d'offerta del mercato è enorme, basti pensare che si può scegliere tra diverse tipologie ittiche (pesci, molluschi o crostacei), tra diverse specie (d'acqua salata o d'acqua dolce), tra diverse modalità di reperimento (allevamento o pesca), tra diverse modalità di allevamento (tradizionale, in valle o biologico) e, anche quando gli esemplari non sono freschi, si può scegliere tra prodotti derivati congelati tal quali, lavorati o pronti al consumo. In un '*mare magnum*' tale, il rischio di acquistare un prodotto per un altro, pagandolo magari più del valore effettivo, è molto alto. Da aggiungere il discorso salute: al di là dei soggetti allergici, che comunque devono poter avere informazioni chiare sulla presenza di allergeni nel prodotto acquistato, possono esistere rischi anche per soggetti sani che acquistano un prodotto pensandolo derivante da una zona salubre ed invece proveniente da una zona inquinata. Un'ulteriore e recente aspetto da non sottovalutare è inoltre l'interesse per i prodotti ittici biologici che, purtroppo, si stanno ancora facendo strada nella grande distribuzione a causa del loro difficile inserimento nell'immaginario dei consumatori. Mediamente, chi acquista pesce considera il prodotto pescato 'già come biologico' e fa fatica a far propria l'idea che le stesse regole dell'allevamento biologico terricolo possano essere applicate all'allevamento di specie acquatiche.

Detto ciò, è chiaro perché negli ultimi anni si siano sviluppate metodiche sempre più sensibili e precise atte a verificare l'identità dei prodotti ittici, siano essi tal quali o lavorati. Ad oggi, la varietà di tecniche analitiche esistente è ampia ed è possibile quindi scegliere quelle più accurate per valutare aspetti diversi di uno stesso prodotto, come la specie, la provenienza o il metodo di produzione. Purtroppo però, si è visto che per poter descrivere esattamente un prodotto non esiste una metodica unica che, da sola, riesca ad identificare le caratteristiche discriminanti dei campioni in esame. L'approccio diventa quindi multi-modale,

nell'accezione di sottoporre la medesima matrice ad una serie di analisi che ne verifichino tutti gli aspetti d'interesse.

Nella parte introduttiva di questo capitolo, mi prefiggo quindi lo scopo di mostrare quali sono le tecniche disponibili per l'autenticazione d'origine dei prodotti ittici, chiarendone i punti di forza e di debolezza, spiegando perché e quando è vantaggioso utilizzare una metodica piuttosto che un'altra, non prescindendo dal fatto che gli studi in merito sono stati fatti soprattutto per determinate specie d'interesse e che quindi non è detto siano valide ed utilizzabili in modo indiscriminato per tutte le specie in commercio. Di seguito poi, dopo aver mostrato a che punto si è arrivati per quel che riguarda il biologico in ambito ittico, presenterò il progetto MIPAAF “Strumenti per l'autenticazione e la certificazione dei prodotti ittici da acquacoltura biologica”, a cui ho preso attivamente parte nel triennio 2009-2011, messo in atto per verificare la possibilità di autenticare esemplari di diversa origine (come provenienza e metodo d'allevamento) di spigola.

II.1 Introduzione

Secondo la definizione di Dennis (1998) l'autenticazione degli alimenti è “il processo attraverso cui si verifica che un alimento rispecchi quanto descritto in etichetta”.

In ambito ittico, le informazioni obbligatorie da rendere in etichetta sono la specie, la metodologia di produzione e la provenienza (Reg. N. 104/2000 e Reg. N. 2065/2001), caratteristiche che devono quindi poter essere verificate. Riguardo alla provenienza, occorre inoltre sottolineare che la percezione dei consumatori sulla zona di origine dei prodotti è molto importante. È stato dimostrato (Knight et al., 2007) che essa influenza in modo preponderante la predisposizione all'acquisto: conoscere l'origine geografica di un prodotto è un'informazione che non serve solo a dare un giudizio sulla qualità del prodotto in esame, ma racchiude in sé anche connotati fortemente emotivi che avvicinano o allontanano i consumatori ai prodotti da acquistare, tenendo conto del fatto che, tra l'altro, esiste una forte predisposizione per l'acquisto di prodotti derivanti dal proprio paese d'origine (Verlegh, 2007; Lambert et al., 2008; Martinez, 2009).

In parallelo all'accresciuta disponibilità delle derrate, è quindi aumentata anche la volontà del consumatore di conoscere esattamente quello che compra. Se una volta mangiare pesce era proibitivo per la scarsa disponibilità di prodotto fresco e i conseguenti prezzi elevati, in aggiunta alla mancanza di informazioni chiare, oggi il consumo ittico è possibile

quotidianamente ad un costo contenuto ed avendo informazioni più dettagliate sul prodotto scelto. Questo miglioramento di vita ha comportato che l'acquirente abituale abbia 'affinato' il gusto e sia quindi diventato più attento nella scelta di ciò che porta in tavola: che ci sia motivo di applicare espressioni come 'sa di fango, di terra o di nafta' nel consumarlo, la visibile presenza di abbondante grasso nella cavità celomatica dei pesci allevati piuttosto che in quelli selvatici e il dubbio sul mangime utilizzato in allevamento sono i principali motivi che hanno spinto i consumatori a fare distinzione tra pesce allevato e selvatico (Kole et al., 2009; Altintzoglou et al., 2010), dal momento che, al di là dei sistemi estensivi, nel momento in cui gli animali sono messi in un recinto, di terra o d'acqua che sia, e vengono alimentati artificialmente, la loro carne subisce un cambiamento dal punto di vista fisico e chimico (Jobling et al., 2002; Regost et al., 2003; Bell et al., 2004; Mourente e Bell, 2006; Fountoulaki et al., 2009). In quest'ottica, la discriminazione tra le diverse tipologie di produzioni (selvatico, allevato o biologico) è di fondamentale importanza per ottenere standard soddisfacenti di qualità e fiducia da parte del consumatore.

Di fronte ad un'ampia varietà di pesce, una variegata domanda da parte dei consumatori e l'obbligatorietà da parte del produttore di definire le caratteristiche del prodotto in vendita, si è reso necessario, oltre che migliorare le metodiche di analisi già esistenti, svilupparne di sempre più specifiche per poter valutare la veridicità delle informazioni poste in etichetta ed evitare così frodi (Martinez et al., 2003; Peres et al., 2007; Luykx et al., 2008) con questo scopo, negli ultimi anni si sono moltiplicate le pubblicazioni scientifiche miranti a “tracciare”, genericamente parlando, l'alimento ittico facendo ricorso ad analisi chimiche più o meno complesse della parte edule, come pure dei tessuti mineralizzati, quali gli otoliti e le squame (Adley et al., 2009; Aursand et al., 2009; Bremner, 2009; Smith e Watts, 2009; Turchini et al., 2009; Costas-Rodriguez et al., 2010; Fasolato et al., 2010; Higgins et al., 2010; SantAna et al., 2010; Ottavian et al., 2012; Usydus et al., 2012, per menzionarne alcuni), e complementandone gli esiti con analisi statistiche abili a manipolare un elevato numero di variabili spesso correlate fra di loro (Kelly et al., 2011).

II.2 Stato dell'arte in merito all'autenticazione degli alimenti ittici

Grazie alla globalizzazione, la produzione e la distribuzione degli alimenti hanno subito un forte aumento in tutto il mondo. Sebbene questo aspetto sia estremamente positivo per permettere ad una più larga fascia di popolazione l'acquisto di prodotti che fino a qualche

anno fà potevano sembrare *d'elite* (basti pensare, per esempio, a prodotti come il salmone o il caviale), l'allargamento dei mercati, il maggior consumo di derrate ittiche con il conseguente impoverimento nel numero di specie tradizionali e l'introduzione nel mercato di specie di prestigio minore hanno aumentato il rischio di frodi (per fare un esempio, la sostituzione, tra le specie di merluzzo, di esemplari di *Gadus morhua*, più prestigioso, con esemplari di *Theragra chalcogramma*, più economico, per la produzione di prodotti ittici surgelati quali filetti o bastoncini di pesce) (Rehbein, 2009).

Gli obiettivi perseguiti con l'autenticazione di un prodotto riguardano il consumatore, le specie in esame ed il mercato. Risalendo all'origine dei prodotti, infatti, è possibile prevenire frodi, salvaguardare la salute dei cittadini (evitando per esempio reazioni allergiche, causate da possibili allergeni non dichiarati, o intossicazioni, procurate da esemplari provenienti da zone non idonee per la pesca o per l'allevamento), proteggere specie in via d'estinzione, garantire la corretta etichettatura dei prodotti, mantenere un commercio equo tra gli Stati e supportare eventuali ispezioni doganali. Dopo l'entrata in vigore dei Regolamenti Europei in tema di etichettatura, è nata quindi la necessità di sviluppare e standardizzare tecniche analitiche che fossero abbastanza semplici e veloci per poter confermare le informazioni riportate sui prodotti o smascherare eventuali frodi.

Nel corso degli anni metodiche diverse, più o meno complesse, sono state messe a punto ma, essendo la scelta della tecnica analitica fortemente influenzata dal substrato di cui si dispone, si è sempre più fatta largo l'idea che la caratterizzazione di un determinato prodotto potesse derivare dall'accoppiamento di più tecniche, per poi elaborare i risultati attraverso l'analisi statistica. Sottoporre i medesimi campioni a metodiche diverse e poi elaborarne i risultati tramite analisi statistica permette di identificare il '*marker*' o la combinazione di '*markers*' con un alto valore discriminatorio. Una volta ottenuti '*markers*' specifici per ogni singolo prodotto è possibile creare un database che permetta un confronto rapido con eventuali nuovi campioni da classificare (Lees e Thomas, 2008).

II.2.1 Analisi del DNA

L'aumento degli scambi commerciali a livello mondiale, l'aumento globale del consumo di prodotti ittici, così come la richiesta di determinate specie di pesci da parte dei consumatori, hanno avuto come riscontro negativo l'aumento incontrollato di frodi, messe in atto tramite etichette non veritiere, sostituzioni di esemplari “economici” con esemplari di maggior pregio o utilizzo di specie protette (Yamashita et al., 2008).

Fino a qualche anno fà, il metodo tipico per differenziare le specie ittiche d'identità

dubbia era il riconoscimento morfometrico delle stesse, metodo però limitato ad esemplari interi e totalmente inadatto nel caso di prodotti derivati o sottoprodotti, poiché, abitualmente, durante i processi di lavorazione, la maggior parte dei tratti morfometrici usati per l'identificazione vengono rimossi (Smith et al., 2008). L'avvento di metodiche basate sull'analisi genetica ha risolto questo problema, aiutando la differenziazione di specie partendo da esemplari interi (Withler et al., 2004), da parti di essi (Asensio et al., 2002), da matrice fresca o processata (Pepe et al., 2005, 2007; Smith et al., 2008), da pinne o squame (Yue e Orban, 2001; Wasko et al., 2003).

Questa metodica comporta vari passaggi. Per prima cosa, il materiale genico (introni o esoni di proteine codificanti, geni di RNA ribosomiale, Internal Transcribed Spacer -ITS- di geni ribosomiali o microsatelliti) viene isolato attraverso la solubilizzazione della matrice con urea ed altri detergenti, la rimozione di inibitori della polimerasi ed eventualmente la digestione del materiale contenente RNA (che potrebbe competere con il DNA durante la reazione). Una volta isolata la sequenza genica d'interesse, questa viene amplificata, utilizzando *primers* specie specifici, attraverso PCR (Polimerase Chain Reaction). La quantità amplificata viene poi caratterizzata mediante elettroforesi da cui è infine possibile interpretare i risultati confrontandoli con i database di riferimento (Rehbein, 2009).

Quando lo scopo di discriminare la specie di diversi esemplari presenti sul mercato, l'utilizzo di questa metodica è il più indicato. Rapida (analisi effettuate in 2-3 ore) e relativamente economica, l'analisi del DNA ha permesso di differenziare esemplari di molte specie, come l'acciuga (Jérôme et al., 2008), la sardina (Jérôme et al., 2003), il nasello (Hubalkova et al., 2008), il merluzzo (Chen et al., 2012) e molte altre, anche partendo da matrici fresche (Herrero et al., 2012a), congelate (Comesana et al., 2003), o processate (Lago et al., 2012; Rehbein e Schiefenhövel, 2012).

Purtroppo però, pur essendo molto utile, frequentemente usata e sviluppata attraverso metodiche sempre nuove (Gil, 2007), l'efficacia di questa tecnica è fortemente dipendente dalla matrice in esame e, se usata da sola, non sempre aiuta nell'autenticazione d'origine dei campioni (Martinez et al., 2003). In molti casi, se la matrice di cui si dispone è rappresentata da composti quali oli, zuccheri o altri componenti purificate, non risulta idonea per la ricerca di materiale genico perché, semplicemente, non ne contiene o ne contiene in quantità non rintracciabili. Similmente, disponendo solo di materiale genetico, l'unico modo per discriminare l'origine di un campione è quello di conoscere a priori '*markers*' genetici specifici di una determinata zona (provenienti da esemplari simili o dal loro habitat), da cui, quindi, si può evincere se un esemplare sconosciuto appartiene o meno a quella stessa zona geografica.

Questo discorso, tra l'altro, è vero per esemplari selvatici, ma perde di efficacia per esemplari allevati. Fino a qualche tempo fa, infatti, gli allevamenti che disponevano di 'stock genetici' di prestigio potevano esportare gli avannotti ottenuti in altre aziende, portando così ad un "rimescolamento" nella genetica degli esemplari allevati. Inoltre, anche disponendo di esemplari 'autoctoni', il mangime utilizzato per ingrassare i pesci può provenire da diversi produttori e da diversi Paesi, fatto che, di conseguenza, comporta che la composizione della dieta non rappresenti in nessun modo quello che si troverebbe naturalmente nella zona di allevamento (Martinez et al., 2003).

Per riuscire a discriminare il metodo di produzione e l'origine di esemplari sconosciuti, occorrono altre tecniche analitiche descritte di seguito.

II.2.2 Analisi dei Lipidi

I Lipidi Totali (LT) presenti nei tessuti possono essere suddivisi in 2 classi principali, i Lipidi Neutri (LN), più abbondanti, ed i Lipidi Polari (LP), in quantità più modesta. I LN sono rappresentati da TriacilGliceroli (TG), molecole costituite da uno 'scheletro' di glicerolo a cui sono legate 3 catene di acidi grassi; a livello metabolico i TG hanno funzione energetica e di riserva. I LP sono rappresentati soprattutto da FosfoLipidi (PL), molecole costituite da uno 'scheletro' di glicerolo a cui sono legati un gruppo fosfato con carica negativa, una molecola alcolica contenente un atomo di azoto ed una catena acidica; a livello metabolico queste molecole, insieme al Colesterolo ed ai GlicoLipidi, vanno a formare tutte le membrane cellulari. Considerando in questo caso solo la componente lipidica, l'importanza dietetica degli alimenti ittici è dovuta principalmente alla presenza di PUFA (Poli Unsaturated Fatty Acids), molecole attive a vari livelli metabolici (Turner et al., 2003; Singh, 2005; Panchaud et al., 2006; Siddiqui et al., 2008; Saravanan et al., 2010; Bousquet et al., 2011). Tra quelli presenti in percentuali elevate si contano l'acido linoleico (LA, 18:2n6), l'acido linolenico (ALA, 18:3n3), l'acido arachidonico (ARA, 20:4n6), l'acido eicosapentanoico (EPA, 20:5n3) e l'acido docosaesaenoico (DHA, 22:6n3). Queste molecole sono dette essenziali, cioè non vengono sintetizzate dall'organismo (Sargent et al., 1995), e, visto il ruolo che ricoprono, sono considerate molto importanti, al punto che, nella dieta quotidiana, si ricerca la presenza di quegli alimenti che posseggono quantità di PUFA tali da soddisfare i fabbisogni giornalieri raccomandati (Agostoni et al., 2010).

In natura, questi acidi grassi non sono presenti in quantità uniforme. Mentre in ambiente acquatico gli acidi grassi EPA e DHA esistono in percentuali maggiori rispetto agli altri PUFA, in ambiente terricolo le concentrazioni sono invertite, con un'abbondanza di acidi

grassi quali LA, ALA e ARA. Questa premessa è necessaria perché, siccome è stato dimostrato che la composizione in acidi grassi presenti nelle varie classi di lipidi della polpa di pesce è strettamente dipendente da fattori quali la dieta (Jobling et al., 2002; Dalsgaard et al., 2003; Jobling, 2004; Bell et al., 2004), la stagione (Fernandez-Jover et al., 2007; Guler et al., 2008), la temperatura (Cordier et al., 2002; Person-Le Ruyet et al., 2004) e lo stato fisiologico (Shirai et al., 2001; Huynh et al., 2007; Yanes-Roca et al., 2009), si evince che, a condizioni ambientali o di allevamento conosciute, la presenza nella polpa di un'alta percentuale di LA o di ALA rappresenta un indice adatto per discriminare se il pesce è stato alimentato artificialmente o meno. Essendo cresciuto l'uso di mangimi derivati dalle piante (per esempio sono molto utilizzati i derivati della soia, del mais o della colza) (Bell et al., 2003; Torstensen et al., 2004; Turchini et al., 2009a), la composizione acidica dei pesci allevati è cambiata di conseguenza. Questa variazione, quindi, può aiutare a discriminare il pesce allevato dal selvatico (Alasalvar et al., 2002; Orban et al., 2003; Grigorakis, 2007; Yildiz et al., 2008; Lenas et al., 2010).

La più comune tecnica di analisi degli acidi grassi è l'analisi Gas-Cromatografica (GC). La matrice viene processata per isolare e purificare la componente lipidica attraverso un trattamento delicato (estrazione liquido-liquido), ottimo per minimizzare il deterioramento ossidativo degli acidi grassi ad alto grado di insaturazione (Bligh e Dyer, 1959). Isolata la componente lipidica si procede con la transmetilazione, procedura che permette la liberazione degli acidi grassi dallo scheletro di glicerolo, per poi, infine, analizzare il campione attraverso il GasCromatografo, strumento che, permettendo la ripartizione della miscela da analizzare tra una fase stazionaria ed una fase mobile in funzione della diversa affinità di ogni sostanza della miscela con le 2 fasi, permette il rilevamento quanti-qualitativo degli acidi grassi presenti nel campione (Blanchet et al., 2005; Reida et al., 2006; Busetto et al., 2008; Luykx et al., 2008; Axelson et al., 2009; Fasolato et al., 2011; Hunt et al., 2011).

Quando lo scopo è di differenziare esemplari di cui non si conosca l'origine, questa tecnica presenta numerosi vantaggi. Primo tra tutti è l'essere relativamente economica e veloce. Inoltre, basandosi sull'identificazione dei lipidi, la tecnica non è dipendente dallo stato della matrice che si vuole analizzare perciò il campione può essere fresco (Mnari et al., 2007; Özogul e Özogul, 2007), congelato (Senso et al., 2007) o lavorato (Özden, 2005; Weber et al., 2008). Possono essere analizzate tutte le specie, siano esse di mare (Passi et al., 2002; Visentainer et al., 2007) o d'acqua dolce (Moreira et al., 2001; Özogul et al., 2007); derivanti da d'allevamento (Alasalvar et al., 2002; Bell et al., 2003; Blanchet et al., 2005) o selvatiche (Alasalvar et al., 2002; Blanchet et al., 2005). Riconducendosi a quanto precedentemente

detto sulla quantità di PUFA presenti normalmente nella polpa di pesce, risulta quindi chiaro come, ai fini dell'autenticazione, la tecnica GC rappresenti un mezzo valido per la distinzione, tra esemplari della stessa specie, del metodo di produzione (allevato *vs* selvatico) dove la grossa differenza è rappresentata dall'alimentazione artificiale. Purtroppo però, anche questa metodica non è esente da svantaggi. Innanzitutto è da considerarsi distruttiva poiché, di qualsiasi tipo sia la matrice, è sempre necessario processare il campione (vedi sopra). Inoltre non è pensabile, attraverso il solo profilo acidico, riuscire a discriminare la specie di appartenenza del campione in esame, distinzione per la quale, come precedentemente spiegato, la tecnica d'eccellenza rimane l'analisi genetica.

Da quanto detto, quindi, si può concludere che neanche la tecnica GC, se presa singolarmente, può riuscire ad autenticare *'in toto'* un campione completamente sconosciuto.

Un'altra tecnica abbastanza diffusa per quantificare la componente lipidica degli alimenti ittici (Xiccato et al., 2004; Luykx et al., 2008; Ottavian et al., 2012) si basa sulla spettroscopia ad infrarossi (IRS). Le varie metodiche che fanno parte di questo gruppo fanno affidamento sull'irradiamento della matrice in esame con onde infrarosse, misurando poi le vibrazioni emesse dal campione irradiato. Siccome i gruppi funzionali formanti le molecole rispondono con una frequenza di vibrazione caratteristica, misurando questa frequenza ed analizzando lo spettro di risonanza che ne deriva, si può capire a quale gruppo di molecole il gruppo funzionale che vibra appartiene. Quando poi le vibrazioni di tutti i gruppi funzionali costituenti un campione vengono considerate insieme, si forma una sorta di 'impronta digitale', utile per caratterizzare l'identità del campione (Luykx et al., 2008). In base alla lunghezza d'onda dei raggi infrarossi che colpiscono il campione si parla di MIRS (Mid InfraRed Spectroscopy, range tra 4000 e 400 cm^{-1}) o NIRS (Near InfraRed Spectroscopy, range tra 14000 e 4000 cm^{-1}).

L'utilità delle tecnica IRS si presenta sotto vari aspetti. Per prima cosa è una metodica non distruttiva e relativamente rapida, caratteristiche che hanno portato ad un suo uso sempre più frequente per la valutazione qualitativa degli alimenti velocemente deperibili come il pesce (Chen e He, 2007; Peres et al., 2007). Inoltre, la tecnica IRS è semplice da mettere in pratica, sicura per l'operatore e per l'ambiente poiché non prevede l'utilizzo di solventi tossici (Ottavian et al., 2012). Ancora non dipende dallo stato della matrice in esame, potendo fornire informazioni su sottoprodotti (Cozzolino et al., 2002) e mangimi (Cozzolino et al., 2005, 2009). E' applicabile a diverse specie come l'halibut (Nortvedt et al., 1998), il capelano (Solberg and Fredriksen 2001), la spigola (Xiccato et al. 2004), il tonno (Khodabux et al., 2007), il gamberetto boreale (Gudjónsdóttir et al., 2011). La tecnica IRS aiuta a differenziare

esemplari allevati da selvatici (Xiccato et al., 2004; Majolini et al., 2010; Costa et al., 2011; Ottavian et al., 2012), come può discriminare campioni freschi da congelati (Karoui et al., 2010; Zhu et al., 2012).

Purtroppo però, come per la tecnica gascromatografica, il limite che accompagna l'IRS è legato all'impossibilità di determinare la specie dei campione esaminati, aspetto che rende la tecnica, se presa singolarmente, non adatta all'autenticazione completa di matrici sconosciute.

Una tecnica di analisi della componente lipidica abbastanza recente, ma che ha trovato largo impiego (Martinez et al., 2003, 2005; Peres et al., 2007; Rezzi et al., 2007; Luykx et al., 2008; Aursand et al., 2009), è la Risonanza Magnetica Nucleare (NMR). È una tecnica non invasiva e non distruttiva che si basa sulla misurazione dei tempi di rilassamento (T_1 e T_2) dei nuclei degli atomi di carbonio (^{13}C NMR) o idrogeno (^1H NMR). Sottoponendo la matrice in esame ad un campo magnetico, gli atomi che la compongono assorbono energia, si eccitano ed impiegano un tempo caratteristico per tornare allo stato iniziale. Siccome l'energia assorbita e, quindi, il tempo che i nuclei impiegano a tornare allo stato non eccitato sono influenzati dalla potenza del campo magnetico, dal tempo di irradiazione totale (dati che possono essere stabiliti preventivamente dall'operatore) e dall'ingombro sterico dei nuclei, questa metodica produce informazioni dettagliate sulla struttura molecolare del campione (Zamora e Hidalgo, 2006). Infatti, oltre alla concentrazione totale dei lipidi, ed alla quantità totale di acidi grassi della serie omega 3, è possibile avere informazioni sulla distribuzione posizionale (α o 1,3- e β o 2-) di importanti acidi grassi quali l'EPA ed il DHA sullo scheletro di glicerolo (Sacchi et al., 1993a, b, 1994; Medina et al., 1994; Aursand et al., 1995).

Ai fini dell'autenticazione, questa tecnica si è rivelata molto utile (Rezzi et al., 2003; Valentini et al., 2008). Grazie infatti alla possibilità di analizzare campioni derivanti da matrice fresca (Boselli et al., 2012), da prodotti lavorati (Medina et al., 1997; Martinez et al., 2005) o da sottoprodotti (Aursand et al., 2007; Standal et al., 2011), e poiché è stato dimostrato che la distribuzione posizionale degli acidi grassi mono- di- e polinsaturi è tipica per ogni specie (Sacchi et al., 1993b; Aursand et al., 1995), la peculiarità della tecnica di dare informazioni posizionali sulle catene acidiche, appartenenti a trigliceridi o fosfolipidi, ha reso possibile differenziare esemplari di specie diversa (Standal et al., 2009, 2010; Boselli et al., 2012; Lei et al., 2012). Considerando poi la già ricordata l'influenza che la dieta ha sulla composizione acidica della carne, la tecnica di risonanza si è resa utile anche nella discriminazione tra esemplari allevati e selvatici (Rezzi et al., 2007; Mannina et al., 2008; Standal et al., 2008), arrivando anche a discriminare la zona d'origine (Standal et al., 2008; Aursand et al., 2009).

Purtroppo questa tecnica non è priva di svantaggi. I limiti più grandi della tecnica sono il costo gestionale ed il tempo effettivo di risonanza, spesso molto lungo, per ottenere risultati attendibili. Attraverso la mia esperienza nei laboratori dello CSIS di Vigo (programma Marco Polo 2010 dell'Università di Bologna), ho potuto verificare che per effettuare analisi di risonanza occorre un macchinario specifico, personale qualificato ed una zona dedicata, protetta da campi elettromagnetici esterni che potrebbero inficiare lo svolgimento delle analisi. Inoltre, per avere uno spettro di risonanza attendibile, occorre rispettare e, soprattutto, aspettare i tempi di rilassamento degli atomi presenti nel campione, tempi diversi in base al posizionamento ed al numero di legami che ogni atomo possiede. Per questo motivo, in base anche alla tecnologia di cui si dispone, il tempo di analisi può variare molto (da ore a giorni) ed una volta ottenuto uno spettro di risonanza, non è sempre facile interpretarlo 'visivamente' (come si può fare per uno spettro ottenuto con il GC), a causa delle sovrapposizioni spettrali che atomi diversi, ma con uguali tempi di rilassamento, possono produrre.

A causa di questa difficoltà, è chiaro come sia impossibile ottenere informazioni utili all'autenticazione senza sottoporre i dati ottenuti da NMR ad analisi statistiche piuttosto raffinate. (Lees e Thomas, 2008).

II.2.3 Analisi degli Isotopi Stabili

Gli isotopi sono atomi di uno stesso elemento che hanno stesso numero atomico, ma diverso numero di massa. Idrogeno (H), carbonio (C), azoto (N) ed ossigeno (O) sono gli atomi più comuni nella materia vivente, ma la loro composizione isotopica nell'ambiente varia. Gli isotopi di idrogeno ed ossigeno variano in base ai cambiamenti atmosferici (per evaporazione, condensazione e precipitazione dell'acqua normalmente presente nell'atmosfera), quelli del carbonio in base alla fotosintesi (le piante fissano diversamente la CO₂ in base al ciclo che utilizzano: piante "C3" che usano il ciclo di Calvin, piante "C4" che usano il ciclo di Hatch e Slack, piante "CAM" o che usano il metabolismo acido delle *Crassulacee*) (Lees e Thomas, 2008), mentre quelli dell'azoto sono fortemente dipendenti dalle pratiche agricole, cioè dalla quantità di prodotti azotati (naturali, come il letame, o artificiali, come i fertilizzanti sintetici) presenti nel terreno (Bateman et al., 2005). Per questo motivo, tutti gli organismi accumulano nei propri tessuti isotopi tipici dell'ambiente in cui vivono e del cibo di cui si alimentano. Esistendo quindi una variabilità nella distribuzione isotopica delle diverse zone geografiche, è possibile attraverso l'analisi di questi elementi discriminare esemplari provenienti da regioni diverse (Kelly et al., 2005).

Per descrivere la distribuzione isotopica in un prodotto, si usa il rapporto tra isotopi pesanti e

leggeri dello stesso atomo ($^2\text{H}/^1\text{H}$, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) presenti in esso. Una volta misurato il rapporto isotopico del campione in esame, questo viene confrontato con quello di standard internazionali quali il VSMOW (Vienna – Standard Mean Ocean Water) per l'isotopo $\delta^{18}\text{O}\%$, il VPDB (Vienna – Pee Dee Belemnite, un carbonato di calcio) per il $\delta^{13}\text{C}\%$ e l'ARIA per il $\delta^{15}\text{N}\%$, prodotti e certificati dall'Agenzia Internazionale di Energia Atomica a Vienna (Kelly, 2003).

Per calcolare la percentuale di isotopi nella matrice in esame si usa la seguente formula:

$$\delta\% = (R_{\text{campione}}/R_{\text{std}} - 1) \times 1000$$

dove R è il rapporto tra isotopo pesante e isotopo leggero dello stesso atomo per il campione (R_{campione}) e per lo standard internazionale (R_{std}).

La tecnica che serve a verificare questo rapporto è la Spettrometria a Rapporto di Massa Isotopica (IRMS). All'atto pratico, con questa tecnica è possibile differenziare diversi isotopi degli stessi atomi e i relativi rapporti isotopici ($^2\text{H}/^1\text{H}$, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$) poiché ognuno di essi si presenta a frequenze o tempi diversi.

Siccome ogni molecola presenta distribuzione posizionale isotopica e proporzione tra isotopi caratteristiche della zona di provenienza (Martínez et al., 2010), questa tecnica e quelle ad essa correlate (per esempio, la SNIF-NMR, Site-specific Natural Isotope Fractionation-Nuclear Magnetic Resonance) si sono dimostrate utili ai fini dell'autenticazione di svariati prodotti alimentari (Kelly et al., 2005). Anche in ambito ittico, è stato possibile applicare lo studio isotopico a diverse specie, come la spigola (Bell et al., 2007), il salmone (Molkentin et al. 2007), l'orata (Morrison et al., 2007), il rombo (Busetto et al., 2008), nonché discriminare esemplari allevati e selvatici (Thomas et al., 2008; Anderson et al., 2010) e risalire alla zona d'origine (Thomas et al., 2008)

Come per le tecniche di risonanza, però, anche la ricerca di isotopi è gravata da limiti quali il costo dei macchinari e la tempistica di analisi. Inoltre, pur risultando utile come tecnica unica nel riconoscere il metodo di produzione (allevato-selvatico), per ottenere dati attendibili circa l'autenticazione d'origine la ricerca isotopica deve essere associata ad altre metodiche analitiche a cui far seguire una analisi statistica dei risultati (Thomas et al., 2008)

II.2.4 Analisi dei Minerali

Come gli isotopi stabili, così i minerali vengono naturalmente accumulati dagli organismi viventi attraverso l'ambiente in cui vivono ed il cibo di cui si nutrono (Herrero et

al., 2012b). In ambito ispettivo, i macroelementi più frequentemente indagati sono Na, K, Ca, Mg, P, S, mentre gli oligoelementi sono Zn, Fe, Cu, Mn, Se, Cr, Co, Ni, As, Cd, Hg, Pb, di cui gli ultimi 3 sono considerati tossici ed esistono quindi limiti imposti per legge (Reg. CE N. 629/2008 che modifica il precedente Reg. CE N. 1881/2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari).

Ai fini dell'autenticazione d'origine, la determinazione degli elementi minerali si è rivelata molto utile (Peres et al., 2007; Luykx e van Ruth, 2008; Martinez et al., 2010), grazie anche alla possibilità di determinare livelli di concentrazioni in tracce (mg/L) e ultra-tracce ($\mu\text{g/L}$) (Luykx e van Ruth, 2008). Innanzitutto, per quantificare i minerali presenti, la matrice utilizzabile può essere rappresentata tanto da muscolo (Yildiz, 2008), quanto da ossa (Toppe et al., 2007), otoliti (Rooker et al., 2003) o squame (Chaudhry e Jabeen, 2011). E' stata indagata la composizione minerale di diverse specie d'acqua dolce, quali la trota (Gokoglu et al., 2004), alcune specie di carpa (Natarajan e Sreenivasan, 2011) ed il salmone (Helland et al., 2006); di diverse specie marine quali la spigola e l'orata (Alasalvar et al., 2002; Erkan e Özden, 2007; Yildiz, 2008), diverse specie di merluzzo (Toppe et al., 2007) e di gamberetti (Yanar e Çelik, 2006). In molti casi, è stato possibile discriminare campioni allevati da selvatici (Orban et al., 2002; Gonzalez et al., 2006; Grigorakis, 2007). Inoltre, unendo questa metodica all'analisi statistica, è stato possibile discriminare la provenienza dei campioni in esame (Cubadda et al., 2006; Costas-Rodriguez et al., 2010; Fasolato et al., 2010; Costas et al., 2011).

Dovendo ricercare elementi in tracce ed a causa della facilità con cui il campione può essere contaminato durante la manipolazione, il limite più grosso di questa ricerca è di dover processare il campione prima di eseguire le analisi vere e proprie. Per questo, i materiali di lavoro diversi dal tipo "usa e getta" devono essere in teflon e, per eliminare eventuali contaminazioni, devono essere sottoposti, tra un campione e l'altro, ad un lavaggio con acidi organici ed ad un risciacquo con acqua deionizzata ultra pura (Milli-Q), processo che comporta un discreto consumo di tempo e aumenta il rischio per l'operatore (si usano acidi ultra puri a pH molto bassi) (Martinez et al., 2010). Una volta processata la matrice, è necessario digerirla in un forno a microonde, prima di poterla, finalmente, analizzare con le metodiche spettrometriche (quali per esempio, la spettrometria ad emissione atomica, AES, la spettrometria di assorbimento atomico, AAS, o la spettrometria a fluorescenza atomica, AFS) (Martinez et al., 2010). Inoltre, come per altre metodiche, attraverso la sola analisi dei minerali non è possibile discriminare esemplari di specie dubbia se a questa tecnica non viene aggiunta l'analisi del materiale genico (Luykx e van Ruth, 2008).

II.2.5 Analisi multivariata dei dati

Con Bo Jørgensen, potremmo affermare che la Natura è preda della covarianza (Jørgensen, 2009): davvero esistono ben poche entità o funzioni che possano essere tenute per “indipendenti”. Giusto come esempio, il nostro, cui peraltro ci siamo ispirati largamente per la stesura di questo paragrafo, ricorda che il riconoscimento di quale famiglia, specie o stock siano quelli di appartenenza di un dato esemplare di pesce si basa su ben più di un singolo attributo. Di conseguenza, la maggior parte delle attività di ricerca, come pure un imponente numero di casi di attività di supervisione routinaria, presuppone che lo/a scienziato/a (o il tecnico, per lui/lei) si ritrovi in mano parecchie, differenti, rilevazioni, tutte effettuate su di una stessa “entità”. Il susseguente assemblaggio di tutte queste informazioni allo scopo di estrarne di più rilevanti grazie all’analisi multivariata dei dati (a seguire MDA) è un passo di grande rilievo e peraltro ormai imperativo ai fini della “Quality prediction” tramite rilevazioni *on-line*, oppure *in-line* (Bro et al., 2002).

Col termine MDA ci si riferisce ad un’ampia gamma di metodi matematici che trattano simultaneamente numerose misure prese su di uno stesso campione, alcuni dei quali metodi sono “generici”, mentre altri rispondono a problemi conoscitivi molto specifici. Fra i primi rientrano i modelli multilineari che, oltre ad essere adattabili a svariati contesti, offrono l’indubbio vantaggio di essere comprensibili ai “laici”, se così ci è permesso definire chi si occupa, nello specifico, di qualità degli alimenti senza essere né uno statistico, né, tantomeno, un matematico (Jørgensen, 2009).

La MDA mira a trarre vantaggio dal fatto che entro un *pool* di rilevazioni sussiste correlazione e lo fa sostituendo i singoli valori con veri e propri *pattern* di misure. A questo punto, un qualsivoglia campione sarà caratterizzato da una certa quantità di ciascun membro di quello che di solito è un piccolo set di tali *pattern*. Sempre a questo punto, la differenza esistente fra i campioni sarà espressa da una differenza nelle “quantità” sopra menzionate. Così operando, i *pattern* fungono da caratteristiche fondamentali e quelle “quantità” finiscono per chiudere in sé un più alto livello di variabilità. Diventa pertanto possibile considerarli come attributi “generalisti” sui quali, per esempio, è possibile basare valutazioni di qualità o autenticità (Jørgensen, 2009).

Più in dettaglio, quando si usa il tipo di MDA denominato “modellizzazione multilineare” (*multi-linear modelling*), i cosiddetti *pattern* prendono il nome di strutture latenti perché, inizialmente nascosti dietro le misure fisiche, possono venire alla luce come risultato dell’analisi dei dati. Le strutture latenti forniscono informazioni sulla correlazione che intercorre tra le grandezze misurate, cosa sovente degna di interesse almeno quanto i valori

assunti dalle grandezze stesse (Bro et al., 2002).

La modellizzazione multilineare (per la più parte bilineare, ma anche, frequentemente, trilineare e talvolta perfino di ordine superiore) si è rivelata essere un approccio generico, sì, ma dotato di grande efficienza. A tutta prima, questo può suonare sorprendente, perché non si può dubitare della non-linearità della natura dell'universo. Comunque, può accadere che i modelli lineari siano bastevoli alla bisogna, nel qual caso li si dovrebbe preferire, quantomeno per la loro relativa semplicità. Quanto sopra, ancora una volta, conduce ad un più elevato livello di interpretabilità, diversamente da quanto accade con i metodi non-lineari. Si considerino, per esempio, le reti neurali artificiali (*Artificial Neural Networks*, ANN), spesso utilizzate per calibrazioni basate su, per esempio, la spettroscopia NIR. Non v'è dubbio che le ANN favoriscono un migliore *fit*, ma questo accade a spese della trasparenza: eloquentemente, Jørgensen (2009) afferma che le ANN agiscono come “scatole nere”. In alternativa e sempre nel contesto multivariato, variabili non-lineari possono venire convenientemente introdotte nella modellizzazione lineare, per esempio aggiungendo alla matrice dei dati nuove colonne contenenti funzioni delle variabili, come l'elevazione al quadrato di una variabile (x_i^2) oppure il prodotto di due variabili ($x_i x_j$).

Uno dei metodi bilineari più utili è l'analisi delle componenti principali (*Principal Component Analysis*, PCA). Questo metodo risolve la matrice dei dati in strutture latenti denominate “componenti principali”, la prima delle quali spiega la maggiore aliquota possibile della varianza totale del campione. I dati residui possono ancora segretamente obbedire ad una struttura non esplicitata, nella quale ipotesi la successiva componente principale dovrà catturare una frazione la più ampia possibile della varianza residua, sotto il vincolo che sia indipendente dall'altra/e componente/i principale/i. Questa decomposizione della matrice dei dati prosegue fintantoché i residui apparentemente non contengono altro che “rumore”. Poiché la aliquota più importante della variabilità tra campioni è spiegata dalle prime componenti principali e siccome con tutta probabilità è quella la variabilità più interessante, queste poche componenti principali spesso bastano a descrivere i risultati dell'esperimento in un modo facilmente interpretabile (Jørgensen, 2009).

Di tanto in tanto, accade che la variazione più importante fra i campioni non sia la più interessante, nel contesto in cui ci si muove. In questi casi, un altro metodo molto utile e ampiamente applicabile, la regressione PLS (che sta per *Partial Least-Squares*), può vantaggiosamente sostituire la PCA. L'acronimo PLS si focalizza sulla matematica, ma viene anche spiegato come “proiezione” sulle strutture latenti. Nella regressione PLS sono in gioco due blocchi di dati. Il secondo blocco viene usato come mezzo per ruotare la soluzione

bilineare dagli assi principali a nuovi assi, dove la variazione di nostro interesse si rende più evidente. Al di là del pregio di migliorare la interpretabilità dei risultati, questo metodo si è dimostrato davvero di successo nella calibrazione multivariata, dove una certa grandezza, per esempio il tenore in lipidi o quello in protidi del campione, viene determinato a partire da una misurazione strumentale rapida, come può essere uno spettro NIR (Jørgensen, 2009).

Considerando la possibilità di sfruttare la totalità di dati ottenuti dalle tecniche strumentali, l'analisi multivariata è stata applicata per fini autentificativi a svariati prodotti alimentari (Arvanitoyannis et al., 2005). Per esempio, unita alle tecniche GC, isotopica e spettrometrica è stata utile per discriminare metodo di produzione e provenienza di specie commerciali quali la spigola (Fasolato et al., 2010; Ottavian et al., 2012), l'orata (Morrison et al., 2007), il salmone (Thomas et al., 2008; Anderson et al., 2010), il pesce persico (Gonzalez et al., 2006) e molte altre ancora (Arvanitoyannis et al., 2005). Unita alla tecnica NMR è servita a discriminare specie diverse di gadoidi in base al loro profilo fosfolipidico (Standal et al., 2010), ad autenticare le specie e la zona d'origine di gadoidi da cui è stato estratto olio da vendere in capsule (Aursand et al., 2007; Standal et al., 2008, 2009, 2011), a discriminare in base al profilo acidico il metodo di produzione di esemplari di orata (Rezzi et al., 2007), ad identificare metaboliti attivi (come per esempio TMAO, TMA, DMA) in polpa di merluzzo (Martinez et al., 2005), a discriminare la zona d'origine di salmoni allevati (Martinez et al., 2009).

Dalla quantità di dati presenti nella letteratura recente, si evince che la MDA è uno step ormai obbligato lungo un iter di ricerca, soprattutto se si lavora con quantità rilevanti di campioni: utilizzata largamente in contesti universitari, industriali e governativi, l'avvento della MDA ha migliorato i metodi di controllo qualitativi ed ha reso più facile l'individuazione di frodi alimentari (Arvanitoyannis et al., 2005).

II.3 Il Biologico

In Europa, a causa di scandali che hanno coinvolto diverse derrate alimentari (Gracia e de Magistris, 2007), la volontà di diversificare e regolamentare la produzione biologica nasce già all'inizio degli anni '90 con il Regolamento (CE) n. 2092/91, regolamento che però non prendeva in considerazione la produzione ittica. In mancanza di un regolamento europeo specifico e comune, ogni Stato membro regolava la produzione ittica biologica sulla base di legislazione volontaria nazionale, permettendo così alle aziende interessate di produrre

esemplari biologici secondo standard garantiti dai governi d'appartenenza (Ötles et al., 2010). I primi ad avere regolamenti nazionali in ambito ittico furono Austria e Germania per l'allevamento di carpe in vasche a terra, Inghilterra e Scandinavia per l'allevamento di salmoni (Bergleiter, 2008), mentre in Italia l'interesse verso l'acquacoltura biologica è abbastanza recente. I primi passi verso la possibilità di una conversione biologica di questo ramo della zootecnia risalgono alla fine del 2003, periodo in cui venne esposta dal gruppo dei Verdi in Senato una proposta di legge relativa al disciplinare della produzione ittica biologica (Disegno di legge n. 2483, comunicato alla presidenza del Senato il 17 settembre 2003).

In ogni modo, dalle prime leggi europee, si è dovuto aspettare più di 10 anni perché, anche in questo ambito, venisse introdotto il concetto di produzione biologica dal punto di vista legislativo. Le ragioni che hanno portato ad una produzione biologica in acquacoltura sono diverse. Tra queste, la volontà di orientare il consumo verso i prodotti ittici, garantendo un prodotto più “sicuro” (si conosce l'alimentazione dei pesci, le cure a cui vengono sottoposti e tutta la filiera viene controllata) e la volontà di accrescere l'interesse sulla provenienza del pesce, in modo tale che, andando incontro alle preferenze dei consumatori ed aumentando le conoscenze che essi hanno sul prodotto, il settore dell'acquacoltura ne potesse beneficiare in termini di credibilità. (Defrancesco, 2003; Altintzoglou et al., 2010).

Con queste premesse, riuscire a caratterizzare l'origine di un qualsivoglia esemplare del commercio per quelli che sono i tratti presi in esame in sede di etichettatura si configura ancora più importante alla luce della regolamentazione comunitaria che è andata di recente a disciplinare le produzioni da acquacoltura biologica [Regolamento (CE) N. 710/2009 e successivo Decreto Ministeriale contenente disposizioni attuative del Regolamento stesso (n. 11954 del 30.7.2010)] che reca le modalità di applicazione del più ampio Regolamento (CE) N. 834/2007 comprendente tutta la produzione biologica. Con tutta probabilità, l'emanazione del sopracitato Regolamento comunitario dedicato all'acquacoltura biologica, introducendo nel commercio, a pieno titolo, una categoria di alimenti ittici dotata di maggior pregio intrinseco, finirà per aprire la strada a più pressanti istanze dirette alla verifica di una corretta etichettatura della matrice ittica.

Secondo fonte IFOAM (Bergleiter, 2008), ad oggi le specie allevate secondo tecniche biologiche sono diverse e sparse in tutto il mondo. Per esempio, in ambito extraeuropeo, la tilapia. è allevata in Honduras, Ecuador, Israele, Brasile e Vietnam; il pangasio in Vietnam; specie diverse di gamberetti (*Peneaus* spp.) in Vietnam, Brasile, Ecuador, Perù, Java e Thailandia; la spigola in Israele. In Europa, tra le specie allevate biologicamente si annoverano lo storione (Spagna), la carpa, la tinca, il luccio, l'anguilla, il pesce gatto europeo

(Germania, Austria ed Ungheria), la trota (Inghilterra, Germania, Italia, Francia, Spagna Danimarca, Norvegia, Svezia, Svizzera, Austria), il salmone atlantico (Inghilterra, Irlanda, Norvegia), la spigola e l'orata (Francia, Italia). Sorprendentemente però, in letteratura esistono pochi dati in merito alla caratterizzazione qualitativa delle carni di specie ittiche biologiche e questi interessano soprattutto il salmone (Ostermeyer e Schmidt, 2004; Molquentin et al., 2007).

Tra le specie presenti nel bacino mediterraneo, la spigola (*Dicentrarchus labrax*) è quella maggiormente venduta sul mercato nazionale e presente in diverse “declinazioni commerciali”, selvaggia come allevata e, in quest’ultima ipotesi, potenzialmente proveniente da allevamenti nazionali come esteri (principalmente da Turchia, Grecia, Croazia), come pure da aziende caratterizzate da livelli ben diversi di “investimento” di fattori produttivi, andando dalla produzione estensiva di valle a contesti semi-intensivi, e di qui alle produzioni intensive ad elevata densità.

Comparati alla quantità di dati esistenti sulle differenze tra spigola allevata e selvatica (per citarne solo alcuni: Alasalvar et al., 2002; Orban et al., 2003; Periago et al., 2005; Erdem et al., 2009; Fasolato et al., 2010; Fuentes et al., 2010) e considerando che le normative europee sul prodotto ittico biologico sono relativamente recenti ed ancora in via di miglioramento, i dati in letteratura su esemplari allevati con il metodo biologico sono scarsi. L'unica eccezione è rappresentata da una recentissima pubblicazione che tratta degli esiti di una prova comparativa diretta a confrontare, su due taglie possibili, la “qualità” della carcassa e della polpa di spigole allevate alla medesima densità (circa 15 kg/m³), assumendo un gruppo un mangime “biologico”, l’altro un mangime “convenzionale” (Trocino et al., 2012). In questo caso però, la produzione delle spigole biologiche è avvenuta ottemperando al disciplinare dell’Associazione Italiana per l’Agricoltura Biologica (AIAB, Ed. 01, Rev.00, 01.09.04), perché evidentemente lo studio in esame è stato intrapreso prima che il già citato Reg. (CE) 710/2009 entrasse in vigore.

Fatte queste premesse, con lo scopo di verificare la possibilità di autenticare esemplari di diversa origine (come provenienza e modalità di produzione), utilizzando metodiche diverse per poi elaborare i risultati attraverso l’analisi multivariata, è stata scelta la spigola come specie modello per il progetto MIPAAF denominato “Strumenti per l’autenticazione e la certificazione dei prodotti ittici da acquacoltura biologica” condotto nel triennio 2009-2011, di cui di seguito verranno esposti i risultati.

II.4 MATERIALI E METODI

II.4.1 Gli esemplari di spigola presi in esame

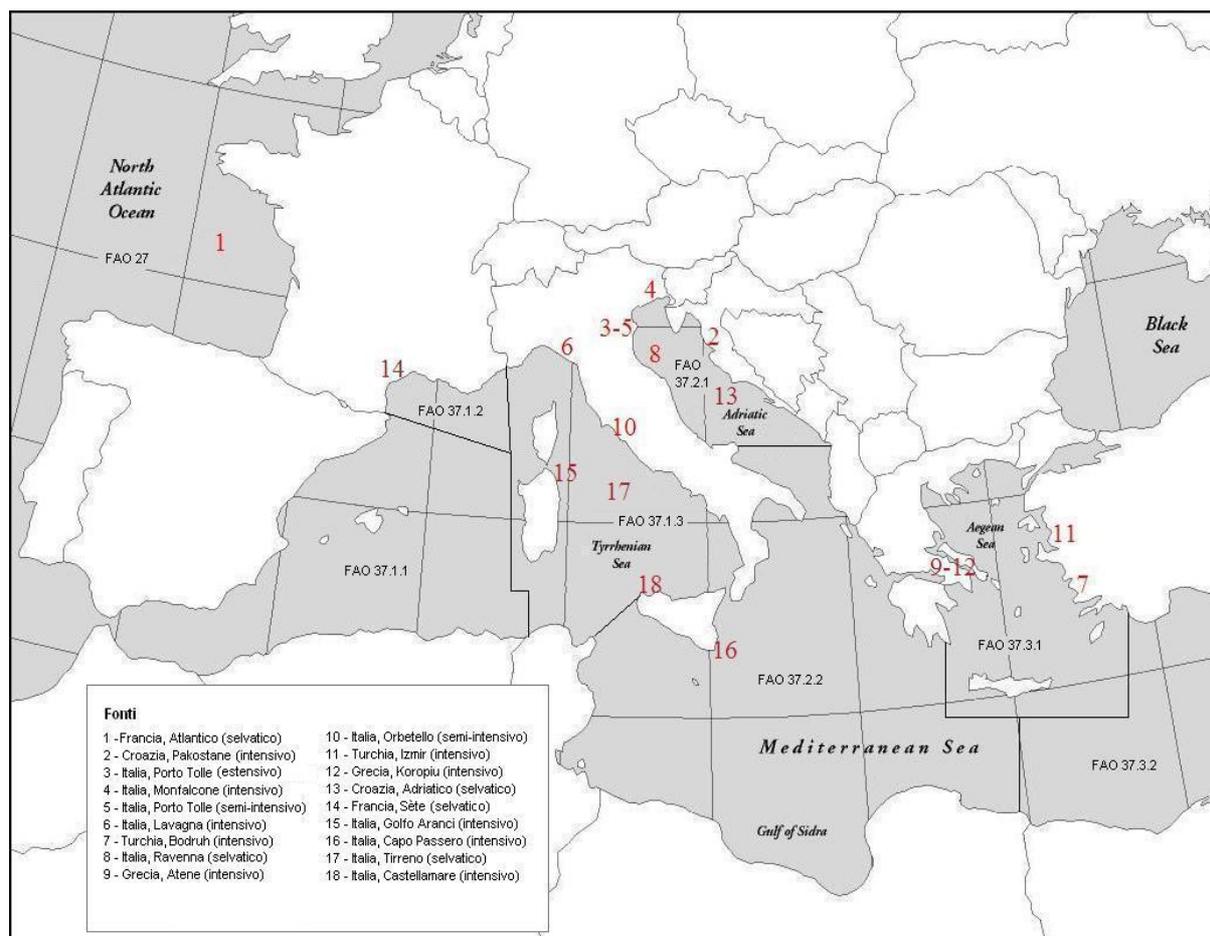
Il quadro delle fonti contemplate e degli esemplari di spigola la cui polpa è stata avviata ad analisi è delineato in **Tabella 1**, nella quale gli esemplari allevati (A) sono su fondo color lavanda, quelli selvaggi (S) su fondo rosso. La collocazione geografica delle fonti in questione viene esplicitata in **Figura 1**, riportata nella pagina seguente. Per una più dettagliata caratterizzazione di tali fonti si rinvia all'**Allegato n. 1**, contenente le informazioni ottenute dai fornitori coinvolti nella sperimentazione attraverso un modulo predisposto in lingua italiana (**Allegato n. 2a**) e in lingua inglese (**Allegato n. 2b**).

All'arrivo in laboratorio di ogni lotto di spigole (lotto = gruppo di esemplari omogeneo per fonte e per macrostagione), ogni esemplare veniva univocamente identificato con una stringa alfanumerica a 8 *digits* riportante la macro-stagione di reperimento (Autunno-Inverno, AI; Primavera-Estate, PE), il codice numerico identificativo della fonte (da 01 a 18), il metodo di produzione (Allevato o Selvaggio) e il numero progressivo dell'esemplare (da 001 in su).

Tabella 1 - Caratterizzazione delle fonti di provenienza degli esemplari di spigola (n = 160) presi in esame nel Progetto 7 C 11 (n.a. = non applicabile)

Zona FAO	Paese di origine	Località	Fonte	Tipo	Caratteristiche impianto	Densità d'allevamento	Numero esemplari	
							AI	PE
27	Francia	Atlantico nord-orientale	1	S	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>	5	5
37.1.2	Francia	Golfo del Leone	14	S	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>	5	5
37.1.3	Italia	Tirreno	17	S	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>	5	5
37.1.3	Italia	Lavagna (GE)	6	A	gabbie sommergibili	intensivo	5	5
37.1.3	Italia	Follonica (GR)	10	A	vasche a terra	semi-intensivo	5	5
37.1.3	Italia	Golfo Aranci - Isola Figarolo (OT)	15	A	gabbie galleggianti	Intensivo	5	5
37.1.3	Italia	Castellammare del Golfo (TP)	18	A	gabbie galleggianti	intensivo	5	---
37.2.1	Italia	Adriatico nord-occidentale	8	S	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>	5	5
37.2.1	Croazia	Adriatico nord-orientale	13	S	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>	5
37.2.1	Italia	Porto Tolle (RO)	3	A	vallicoltura	estensivo	5	5
37.2.1	Italia	Monfalcone (GO)	4	A	gabbie galleggianti	Intensivo	5	5
37.2.1	Italia	Porto Tolle (RO)	5	A	vasche a terra	semi-intensivo	5	5
37.2.1	Croazia	Pakostane	2	A	gabbie galleggianti	Intensivo	5	5
37.2.2	Italia	Pachino - Capo Passero (SR)	16	A	gabbie galleggianti	intensivo	5	5
37.3.1	Grecia	Atene	9	A	gabbie galleggianti	intensivo	5	<i>n.a.</i>
37.3.1	Grecia	Koropiu	12	A	gabbie galleggianti	intensivo	5	5
37.3.1	Turchia	Bodruh	7	A	gabbie galleggianti	intensivo	5	5
37.3.1	Turchia	Izmir	11	A	gabbie galleggianti	intensivo	5	<i>n.a.</i>

Figura 1 – Localizzazione geografica dei siti di provenienza delle spigole “sperimentali”



Le prime dieci variabili riportate nell'**Allegato n. 3a** permettono di comprendere appieno come il singolo esemplare venisse connotato. Nell'**Allegato n. 3b**, invece, si fornisce il valore assunto da ciascuna di queste dieci variabili per ciascun esemplare.

II.4.2 Aspetti Morfometrici

Ogni lotto (gruppo di esemplari di spigola provenienti dalla stessa fonte entro la medesima “macrostagione”, autunno-inverno o primavera-estate) era in origine costituito da 10 esemplari, ognuno dei quali è stato lavorato singolarmente, seguendo una procedura standardizzata (US-EPA, 2000) come dettagliato nel seguito di queste pagine e, nell'**Allegato n. 4**, col corredo di foto illustrative.

Venivano anzitutto effettuate le rilevazioni del peso (espresso in grammi) e della lunghezza (espressa in cm) sull'esemplare intero. Dopo esser stato pesato tal quale, il pesce veniva posto su un foglio di carta millimetrata e misurato dal margine estremo della bocca al termine del lobo dorsale della pinna caudale (*step 1*).

Si proseguiva poi con l'eviscerazione, aprendo l'esemplare ventralmente con un taglio

lungo la linea mediana, partendo dall'apertura anale fino alla testa (*step 2*). Il pesce eviscerato ed il pacchetto viscerale venivano pesati separatamente. Quindi, nell'ambito dei singoli visceri, venivano pesati fegato, gonadi (registrando eventualmente il sesso dell'esemplare se la maturazione sessuale lo permetteva) e grasso periviscerale (*step 3÷7*).

Per isolare i filetti, sul pesce eviscerato veniva praticata una doppia incisione dorsale che, dopo aver isolato le pinne dorsali, veniva prolungata verso la testa e verso la coda. Ancora, si praticava: un'incisione craniale laterale, lungo l'opercolo branchiale; un'incisione caudale, che isolava il peduncolo caudale; una doppia incisione ventrale che isolava la pinna anale. Giunti a questo punto, raschiando con cura il tessuto muscolare dalle coste, era possibile separare i filetti dalla carcassa (*step 8-9*).

Venivano registrati, separatamente, i pesi della carcassa, del filetto destro con pelle e di quello sinistro con pelle. Si procedeva quindi alla asportazione della pelle dai filetti, alla registrazione del peso dei filetti destro e sinistro senza pelle e alla registrazione del peso della pelle dei due filetti insieme (*step 10-11*).

I due filetti di ciascun esemplare venivano suddivisi in piccoli pezzi, debitamente mescolati e omogenati insieme servendosi di un *food processor* (MultiquickSystem ZK 100, Braun, Kronberg im Taunus, Germania), utilizzando due impulsi da cinque secondi ciascuno. Una volta ottenuto l'omogenato, lo si mescolava manualmente seguendo il metodo del *quartering*. Più in dettaglio, separato in quarti l'omogenato, i quarti opposti venivano ricombinati insieme e le due metà ottenute mescolate insieme, per ottenere nuovamente l'intero. L'operazione veniva ripetuta per tre volte (*step 12*).

L'omogenato veniva quindi suddiviso in sacchetti identificati attraverso etichette ciascuna delle quali riportava la data di lavorazione, il tipo di analisi a cui il contenuto sarebbe stato destinato (di volta in volta, umidità, estrazione dei lipidi, analisi dei minerali, determinazione degli isotopi e "scorta") ed un codice alfanumerico prestabilito, che permetteva l'individuazione univoca del campione (numero seriale, "macrostagione", lotto di appartenenza e tipologia, se allevato o selvatico). Per facilitare e rendere più efficiente lo stoccaggio, ogni sacchetto veniva conformato fino a formare una sorta di mattonella rettangolare di circa 2 cm di spessore. Tutti i sacchetti derivanti da ciascun esemplare sono stati infine riposti in *freezer* e stoccati a -20°C se destinati alle singole determinazioni analitiche, a -80°C se costituenti la "scorta" (*step 13*).

E' doveroso segnalare il fatto che, durante la lavorazione, sono state rilevate le informazioni morfometriche di tutti e dieci gli esemplari componenti ciascun lotto diverso per fonte e per macro-stagione ma che, in sede di elaborazione in analisi multivariata, quella cioè

che presupponeva l'assemblaggio di tutte le misure effettuate su ciascun esemplare, si è scelto di limitarsi ai 5 esemplari che, entro fonte e macrostagione, sono stati prelevati da ogni lotto in modo casuale per avviare la polpa alle analisi chimiche.

Poiché i dati completi sono contenuti nella relazione finale del progetto diretta al Ministero, ho preferito non riportarli in questa sede.

II.4.3 Determinazione dell'umidità

L'umidità della polpa separata da ciascun esemplare è stata determinata in doppio facendo ricorso alla metodica AOAC N. 950.46B (AOAC, 2000). Più in dettaglio, una volta sottoposta ad omogeneizzazione la polpa separata dai due filetti senza pelle di ciascun esemplare, da tale omogenato si sono prelevati circa 10 grammi di materiale che, dopo essere stati pesati con precisione in capsule di porcellana altrettanto precisamente pesate, sono stati collocati in stufa a $104 \pm 2^\circ\text{C}$ per 18 ore. Trascorso questo tempo, e comunque non prima di aver verificato la costanza del peso raggiunto dal materiale, si è determinato il peso secco e, dalla conoscenza di questo, si è passati al calcolo dell'umidità della matrice.

II.4.4 Analisi lipidiche

II.4.4.i Estrazione dei lipidi totali

L'estrazione dei lipidi totali (LT) è stata eseguita in duplicato su tutti gli esemplari ($n = 10$ per fonte e per macrostagione), seguendo il metodo di Bligh e Dyer (1959), come di seguito descritto. Ogni campione, composto da 4 g di omogenato ricavato dai filetti, posto in un provettone immerso nel ghiaccio, è stato nuovamente omogeneizzato due volte di seguito con Ultra-Turrax T25 per un minuto: la prima volta con 6 ml di cloroformio e 12 ml di metanolo, la seconda con altri 6 ml di cloroformio e 6 ml di acqua deionizzata. Dopo una centrifugazione a 4000 rpm a 4°C per 10 minuti, la fase superiore acquosa e la fase intermedia solida sono state eliminate, mentre la fase inferiore cloroformica contenente i LT estratti è stata filtrata attraverso sodio solfato anidro. Trasferito 1 ml esatto dell'estratto lipidico in un pesafiltro accuratamente tarato, fatto evaporare completamente il solvente su una piastra riscaldante a 50°C e pesato il residuo lipidico, la percentuale di LT è stata così calcolata:

$$\% \text{ LT} = (\text{g di lipidi in 1 ml} \times 12 / \text{g di campione}) \times 100$$

dove il numero 12 si riferisce ai ml di cloroformio usati per l'estrazione.

II.4.4.ii Determinazione della % di fosfolipidi nei lipidi totali

Prima di procedere alla separazione delle due frazioni lipidiche dei lipidi neutri (LN) e dei lipidi polari (LP), che insieme costituiscono i LT, tenendo presente che i LP sono costituiti in massima parte da fosfolipidi (FL) (De Leonardis e Macciola, 2004), è stata effettuata una valutazione quantitativa dei FL tramite la determinazione colorimetrica del fosforo, secondo il metodo di Fiske e Subbarow (1925), in accordo con le modifiche apportate da Bartlett (1959) e da Marinetti (1962). Da ogni estratto lipidico sono state prelevate tre aliquote identiche che, dopo evaporazione del solvente, sono state sottoposte a mineralizzazione con acido perclorico e temperatura crescente fino a 250°C. Il fosforo inorganico così liberato è stato fatto reagire con eptamolibdato di ammonio e successivamente con acido 1-ammino-2-idrossi-4-naftalensolfonico a 100°C per sette minuti allo scopo di sviluppare un complesso azzurro la cui assorbanza allo spettrofotometro con luce a lunghezza d'onda di 830 nm risulta proporzionale alla quantità di fosforo presente. Dal confronto con l'assorbanza di soluzioni standard di fosforo a concentrazione nota è stato determinato l'esatto contenuto di fosforo nei vari campioni, dal quale infine sono state ricavate le quantità di FL tenendo presente che il fosforo ne rappresenta la venticinquesima parte.

II.4.4.iii Separazione dei lipidi neutri dai lipidi polari

I LN sono stati separati dai LP mediante SPE (Solid Phase Extraction) in fase normale utilizzando colonnine Strata SI-1 Silica (55µm, 70Å) Phenomenex (Torrance, CA, USA) della capacità di 12 ml, contenenti 2 g di silice, secondo il metodo descritto da Bayir *et al.* (2010), con alcune modificazioni. Dopo l'equilibratura della colonna di silice con quattro aliquote di cloroformio di 3 ml ciascuna, è stato applicato il campione di LT diluito in 3 ml di cloroformio ed è stata asportata la frazione dei LN facendo percolare per otto volte 3 ml di cloroformio con un flusso di circa due gocce al secondo. Successivamente, asciugata la silice mediante aspirazione sotto vuoto, sono stati eluiti i LP dapprima con quattro aliquote di metanolo da 3 ml ciascuna e poi aggiungendo per quattro volte 3 ml di una miscela cloroformio/metanolo 3:7 (v:v), regolando di nuovo il flusso a circa due gocce al secondo.

II.4.4.iv Preparazione dei metilesteri degli acidi grassi

I metilesteri degli acidi grassi dei LT, LN e LP sono stati preparati tramite transesterificazione con catalizzatore acido (Christie, 1989). I campioni sono stati portati a secco con flusso d'azoto entro provette di vetro con tappo a vite, diluiti con 100 µl di toluene e 1 ml

di una soluzione metilante composta da metanolo con l'1% di acido solforico 96% e posti in stufa a 50°C per 12 ore. Successivamente i metilesteri prodotti sono stati recuperati mediante l'aggiunta di 1 ml di una soluzione di NaCl al 5% e di 900 µl di esano, seguita da agitazione con vortex, centrifugazione per 10 minuti a 2000 rpm e infine raccolta della fase superiore contenente i metilesteri.

II.4.4.v Analisi gascromatografica degli acidi grassi

I metilesteri degli acidi grassi sono stati analizzati quali-quantitativamente con un gascromatografo Varian 3380, dotato di un autocampionatore CP-8200 Varian, di un sistema d'iniezione split mantenuto a 230 °C, di un rivelatore a ionizzazione di fiamma a 300 °C e di una colonna capillare DB-23 J&W Scientific (30 m x 0.32 mm). La temperatura del forno è stata programmata da 150 a 230 °C con un incremento di 5 °C/min e isoterma finale. Come gas vettore è stato utilizzato azoto ad alta purezza, con un flusso di 1.2 ml/min. I dati ottenuti sono stati elaborati con Star Chromatography Workstation Varian.

Gli acidi grassi sono stati identificati confrontando il loro tempo di ritenzione con quello di miscele di standard noti (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA; PUFA n° 1, di origine marina, e PUFA n° 3, Menhaden Oil, Supelco, Inc, Bellefonte, PA, USA).

Il contenuto degli acidi grassi è stato riportato come percentuale dei singoli metilesteri rispetto alla loro totalità.

La qualità dei risultati analitici è stata controllata analizzando, con le procedure finora descritte, il materiale standard di riferimento "Lake Superior Fish Tissue" (SRM 1946; NIST, Gaithersburg, MD, USA): nelle tre prove effettuate durante il corso del progetto, il contenuto lipidico e la composizione quali-quantitativa degli acidi grassi sono sempre stati trovati corrispondenti a quelli certificati, come dettagliato nel paragrafo "Qualità del dato analitico".

Con i dati ottenuti dall'analisi degli acidi grassi sono stati calcolati anche i seguenti indici:

ΣSFA : valore percentuale relativo alla somma degli acidi grassi saturi;

$\Sigma MUFA$: valore percentuale relativo alla somma degli acidi grassi monoinsaturi;

$\Sigma PUFA$: valore percentuale relativo alla somma degli acidi grassi polinsaturi;

$\Sigma PUFA / \Sigma SFA$: rapporto fra la somma degli acidi grassi polinsaturi e saturi;

$\Sigma MUFA / \Sigma SFA$: rapporto fra la somma degli acidi grassi monoinsaturi e saturi;

$\Sigma PUFA n-3$: valore percentuale relativo alla somma dei PUFA n-3;

$\Sigma PUFA n-6$: valore percentuale relativo alla somma dei PUFA n-6;

$\Sigma n-3 / \Sigma n-6$: rapporto fra la somma dei PUFA n-3 e n-6;

$\Sigma n-6 / \Sigma n-3$: rapporto fra la somma dei PUFA n-6 e n-3;

EPA+DHA: somma degli acidi grassi C 20:5 n-3 (EPA) e C 22:6 n-3 (DHA);

EPA / DHA: rapporto fra gli acidi grassi C 20:5 n-3 (EPA) e C 22:6 n-3 (DHA);

DHA / EPA: rapporto fra gli acidi grassi C 22:6 n-3 (DHA) e C 20:5 n-3 (EPA);

$\Sigma C 20:1 + \Sigma C 22:1$: somma degli acidi grassi C 20:1 n-9, C 20:1 n-7 e C 22:1 n-11;

ARA / EPA: rapporto fra gli acidi grassi C 20:4 n-6 (ARA) e C 20:5 n-3 (EPA);

EPA / ARA: rapporto fra gli acidi grassi C 20:5 n-3 (EPA) e C 20:4 n-6 (ARA);

e, in relazione alla composizione acidica dei LN e LP, i seguenti indici:

LA / ARA: rapporto fra gli acidi grassi C 18:2 n-6 (LA) e C 20:4 n-6 (ARA);

LA / ALA: rapporto fra gli acidi grassi C 18:2 n-6 (LA) e C 18:3 n-3 (ALA).

Allo scopo di mantenere chiara la distinzione fra le variabili avviate alle elaborazioni, gli acidi grassi dei LN, coi relativi indici, sono stati denominati con la lettera identificativa “N” anziché con la classica “C”; per esempio, l’acido palmitico dei lipidi neutri è stato designato come N16:0, anziché C16:0. Analogamente, gli acidi grassi dei LP, coi relativi indici, sono stati denominati con la lettera identificativa “P”; dunque, mantenendo l’esempio, l’acido palmitico dei lipidi polari è stato designato come P16:0. Questo accorgimento è stato mantenuto anche nell’allestimento del Database di Letteratura (**DB_Wild** e **DB_Farmed**).

II.4.5 Determinazione del tenore in macroelementi, oligoelementi ed elementi tossici

II.4.5.i Mineralizzazione del campione

Per mineralizzazione si intende il processo chimico con il quale si distrugge la parte organica di una matrice complessa, per determinare la concentrazione di specie metalliche, per esempio tramite la spettroscopia di emissione con induzione al plasma (ICP-OES). La mineralizzazione, che presuppone l’impiego di agenti chimici quali l’acido nitrico (HNO₃), chiede il ricorso a strumenti detti “mineralizzatori”, che sfruttano la combinazione di agenti chimici, microonde ed alte pressioni per portare a termine tale processo. Si ottiene una buona mineralizzazione se dal processo si ricava un liquido incolore simile all’acqua.

Per effettuare le analisi richieste dal progetto, si è pesato direttamente circa 1 g di campione tal quale nella bomba del mineralizzatore. Sono stati aggiunti 6 ml di acido nitrico Ultrapur Merck al 67% e 2 ml di perossido di idrogeno Ultrapur Merck al 31%. I campioni sono stati mineralizzati in doppio con mineralizzatore a microonde MULTIWAVE 3000. Di seguito si riporta il programma di mineralizzazione adottato.

Programma mineralizzazione	
Rotore	XF 100-8, (8 vessel)
Peso campione	> 0.500
Miscela acidi	6 ml HNO ₃ + 2ml
Potenza	1200
Rampa	10 min
Ciclo	20 min
Raffreddamento	15 min
Pressione massima	60bar
IR	210°C

Conclusa la mineralizzazione il campione è stato recuperato e portato a volume finale (50 ml) con acqua Ultrapura MilliQ18mΩ.

II.4.5.ii Elenco e lettura degli elementi

Gli elementi sono stati determinati con un ICP-OES Optima 2100 PerkinElmer, spettrometro ad emissione atomica con sorgente al plasma accoppiato induttivamente.

Macroelementi

Per la determinazione dei macroelementi è stato utilizzato un nebulizzatore Meinhard a camera ciclonica con posizione della torcia radiale. Le rette di calibrazione sono state realizzate passanti per lo zero, con i seguenti coefficienti di correlazione (un valore di 1,000 indica una corrispondenza perfetta):

Ca	0,999996	K	0,999945
Mg	0,999994	S	0,999915
Na	0,999913	P	0,999925

Oligoelementi ed elementi tossici

Tutti gli oligoelementi e gli elementi tossici sono stati letti con posizione della torcia assiale, utilizzando un nebulizzatore ad Ultrasuoni CETAC U5000. Anche per questi elementi le rette di calibrazione sono state realizzate passanti per lo zero, con i seguenti coefficienti di correlazione:

Co	0.999949	Mn	0.999983
Cr	0.999970	Zn	0.999989
Cu	0.999949	As	0.999915
Fe	0.999993	Cd	0.999978
Ni	0.999945	Hg	0.999891
Se	0.999972	Pb	0.999945

La qualità dei risultati analitici è stata controllata come precisato nel paragrafo “Qualità del dato analitico”, riportato di seguito.

II.4.6 Analisi degli isotopi stabili

La determinazione della composizione isotopica di carbonio e azoto nel muscolo di spigola è stata condotta presso il laboratorio di Geochimica Isotopica dell'Università degli Studi di Parma. Da ogni esemplare di spigola è stata prelevata una quantità variabile tra i 2 e i 5 g di muscolo congelato. Questo è stato liofilizzato per un minimo di 5 giorni al termine dei quali il campione secco è stato tritato manualmente fino ad ottenere una granulometria inferiore a 0,6 mm. I campioni sono quindi stati pesati all'interno di piccole capsule di stagno (3,3 x 5 mm) mediante bilancia micro-analitica: 0,07±0,01 mg per l'analisi del $\delta^{13}\text{C}$ e 0,7±0,1 mg per la misura del $\delta^{15}\text{N}$. Tutti i campioni sono stati misurati in doppio. Per la determinazione di entrambi i parametri è stato utilizzato un analizzatore elementare EA/NA-1100 configurato CHN (Thermo Finnigan) collegato in flusso continuo d'elio ad uno spettrometro di massa Finnigan Delta Plus XP.

I valori isotopici sono stati espressi mediante la notazione δ :

$$\delta = \frac{(R_{\text{campione}} - R_{\text{standard}})}{(R_{\text{standard}})} * 1000$$

dove R_{campione} è il rapporto isotopico del campione in esame, R_{standard} è il rapporto isotopico degli standard di riferimento. I rapporti isotopici dei campioni in esame vengono quindi calcolati in relazione agli standard internazionali di riferimento: V-PDB per il carbonio e N atmosferico per l'azoto. La misura dei campioni è stata dunque preceduta da quella di una serie di standard di calibrazione, i cui valori isotopici rispetto a quelli internazionali sono noti e per i quali si conosce la composizione percentuale di C e N.

Per l'analisi isotopica dell'azoto sono stati usati gli standard:

KNO₃ : nitrato di potassio;

→ $\delta^{15}\text{N} = 4,7 \pm 0,2$;

IAEA N°1: sale di ammonio solfato $[(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4]$ preparato da Salati al CENA (Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Brasile) dal 1978 al 1983 (Gonfiantini, 1978, 1984);

→ $\delta^{15}\text{N} = 0,4 \pm 0,2$;

IAEA N°2: sale anidro di ammonio solfato $[(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4]$ preparato da E. Salati al CENA (Gonfiantini, 1978, 1984);

→ $\delta^{15}\text{N} = 20,3 \pm 0,2$;

USGS 25: sale anidro di ammonio solfato $[(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4]$ preparato da Bohlke nel 1992 (Bohlke et al., 1993);

→ $\delta^{15}\text{N} = -30,4 \pm 0,4$;

mentre per quella del carbonio gli standard erano:

USGS-24: grafite preparata da Coplen, in occasione dello U.S. Geological Survey, a partire dalla '*Baker® technical grade graphite*' (al 96% di calibro minore dei 44 μm) (Gonfiantini et al., 1995);

→ $\delta^{13}\text{C} = -16,0 \pm 0,1$;

IAEA-CH-6: saccarosio fornito all'IAEA da Polach, dell'Università Nazionale Australiana, Canberra (Hut, 1987);

→ $\delta^{13}\text{C} = -10,4 \pm 0,2$;

NBS 22: olio minerale preparato da Silverman (Chevron Oil Company, La Habra, California) (Silverman, 1964);

→ $\delta^{13}\text{C} = -29,7 \pm 0,2$;

Polietilene: → $\delta^{13}\text{C} = -31,8 \pm 0,2$;

Cellulosa: → $\delta^{13}\text{C} = -25,54 \pm 0,2$.

Per l'analisi elementare è stata utilizzata l'urea ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$) con percentuale di azoto e carbonio note, pari rispettivamente a 46,65% e 20%. La precisione dello strumento, calcolata sulla base delle ripetizioni degli standard, è stata di $\pm 0,2$ ‰ per entrambi gli elementi.

II.4.7 Qualità del dato analitico

Le analisi sono state effettuate in duplicato, facendo ricorso a reagenti di grado

analitico. La qualità dei risultati analitici è stata controllata analizzando tre materiali standard di riferimento, nei quali la concentrazione dei nutrienti di interesse era definita come *certificata* oppure come *di riferimento*:

- “SRM 1946 – Lake Superior Fish Tissue” (NIST, National Institute of Standards & Technology, Gaithersburg, MD, USA) per composizione centesimale, acidi grassi principali (14:0, 16:0, 16:1n-7, 17:0, 18:0, 18:1n-9, 18:2n-6, 18:3n-3, 20:1n-9, 20:4n-6, 20:5n-3, 22:1n-9, 22:5n-3, 22:6n-3) ed alcuni macro- e microelementi (Na, K, Ca, Mg, P, Zn, Fe, Cu, Mn, Se, Ar, Cd, Hg, Pb);
- “SRM 1546 – Meat Homogenate” (NIST, National Institute of Standards & Technology, Gaithersburg, MD, USA) per alcuni macro- e microelementi (K, Ca, Mg, Fe, Cu, Mn);
- “DORM-2 – Dogfish Muscle Certified Reference Material for Trace Metals” (NRC, National Research Council of Canada, Ottawa, Ontario, Canada) per numerosi microelementi ed elementi tossici (Zn, Fe, Cu, Mn, Se, Cr, Co, Ni, Ar, Cd, Hg, Pb, Al, Ag, Tl, Sn).

Per ciascun nutriente sono state effettuate determinazioni in doppio per tre volte durante il progetto, seguendo le procedure analitiche usate in questo lavoro. L'esito delle analisi effettuate a carico dei materiali standard di riferimento sopra elencati è stato ricapitolato nell'**Allegato n. 5 (a, b, c)**.

II.4.8 Elaborazione dei dati

I dati raccolti durante l'intera sperimentazione, come pure quelli derivati da analisi, sono stati archiviati in fogli elettronici mediante il programma Microsoft Office Excel 2007 e convertiti in formati adatti alla lettura da parte di alcuni pacchetti di elaborazione statistica (SigmaStat[®], Version 2.0, Systat Software, San José, CA, USA; Statistica[®], Release 7, StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA; MATLAB, MathWorks Inc, Natick, MA, USA).

Ogni singola fonte di esemplari di spigola è stata caratterizzata in relazione a ciascuna variabile morfometrica e compositiva nei **Allegati n. 6, 7, 8, 9, e 10**, i cui contenuti, in termini di variabili prese in considerazione, sono elencati a seguire:

Allegato n. 6 parametri morfometrici;

Allegato n. 7 tenore in umidità e in lipidi totali della polpa degli esemplari esaminati, insieme con la composizione percentuale in acidi grassi dei lipidi totali stessi;

Allegato n. 8 composizione percentuale in acidi grassi dei lipidi neutri della polpa;

Allegato n. 9 composizione percentuale in acidi grassi dei lipidi polari della polpa;

Allegato n. 10 componente elementale ed abbondanze isotopiche relative della polpa degli esemplari esaminati.

In relazione alle anzidette variabili e distintamente per le 18 fonti di spigola prese in esame, si è computata anzitutto la statistica di base, rappresentata da media, minimo, massimo, deviazione standard e coefficiente di variazione (dato dall'incidenza percentuale della deviazione standard sulla media). Poiché le informazioni in questione facevano parte dei dati utili ai fini della relazione finale del Progetto MIPAAF, ho preferito in questa sede non riportarle *in toto*, bensì riportare solo tre tabelle esemplificative, una per esemplari allevati, una per esemplari selvatici, la terza per l'unica fonte estensiva oggetto di indagine (**Table MN_4, MN_14, MN_3**). In ogni caso, la totalità delle informazioni ci ha permesso di comparare i "connotati" di ogni singola fonte con i dati derivanti dalla pertinente letteratura nazionale ed internazionale per la specie *Dicentrarchus labrax*, come raccolti nella tabella "**Database Letteratura**".

Per la classificazione automatica dei campioni sono state eseguite analisi mono e multiparametriche con la finalità di:

- individuare il metodo di produzione (selvaggio, allevato);
- individuare la zona di cattura FAO per gli esemplari selvaggi (4 le zone FAO prese in esame);
- individuare il Paese di origine per gli esemplari allevati (4 i Paesi presi in esame);
- verificare la possibilità di predire il fattore "Intensità" (4 i gradini in cui lo si è articolato).

È necessario specificare che con il fattore "Intensità" ci si riferisce alla densità di allevamento, ovvero la quantità di esemplari presenti nelle vasche o gabbie, normalmente espressa in kg/m³. In questa sede, per poter procedere ad elaborazioni che tenessero conto anche di questo fattore, si sono codificati con Intensità 0 gli esemplari selvaggi, con 1 gli allevati estensivi, con 2 gli allevati semi-intensivi, con 3 gli esemplari allevati intensivi, nazionali ed esteri.

Le analisi di singolo parametro sono state svolte per ciascun obiettivo di classificazione. Nel caso in cui i gruppi fossero solo due (tipicamente il confronto allevato vs selvaggio), è stato utilizzato il test T di Student per valutare la capacità discriminativa; in caso di un maggior numero di gruppi (come per le zone FAO di cattura dei selvaggi o il Paese d'origine degli allevati), si è proceduto con l'analisi mediante analisi della varianza (ANOVA) a una via. Pur nella consapevolezza del fatto che con un singolo parametro non si può fare classificazione di sorta, l'esito di queste analisi viene fornito egualmente (**Allegati n. 11÷16**).

Le analisi multiparametriche (PCA e classificazione) sono state effettuate separatamente sui vari insiemi di misure effettuate sui campioni:

- parametri morfometrici;
- tenore in umidità e in lipidi totali della polpa di spigola, insieme con la composizione percentuale in acidi grassi dei lipidi totali stessi;
- composizione percentuale in acidi grassi dei lipidi neutri della polpa di spigola;
- composizione percentuale in acidi grassi dei lipidi polari della polpa di spigola;
- composizione elementale (tenore in macro- e microelementi) della polpa di spigola;
- abbondanze isotopiche relative della polpa di spigola.

E' stata assunta la decisione di utilizzare in ciascuna delle sei analisi sopra citate l'intero set di misure che la tecnica (o lo strumento, o, ancora, l'accoppiata strumento-tecnica) di volta in volta in esame poteva fornire, perseguendo il raggiungimento di una "firma" completa. Come esempio, l'intero quadro acidico dei lipidi totali della polpa degli esemplari analizzati, completo di indici e rapporti fra acidi grassi, nonché del tenore in lipidi totali e del tenore in umidità della polpa è stato utilizzato come pacchetto di variabili. Dietro questo approccio, nell'esempio specifico, stavano due considerazioni, cioè che: a) di una matrice di cui si voglia determinare il quadro acidico dei lipidi totali, non si può non conoscere il tenore in acqua e quello in lipidi totali; b) nel momento in cui si effettua un'analisi gascromatografica esaustiva, quale quella richiesta dalle matrici ittiche, non ha alcun senso limitare l'uso dei risultati ottenuti solo ad alcuni acidi grassi.

Il metodo di analisi delle componenti principali (PCA) è stato utilizzato per fornire un quadro generale della capacità dei parametri utilizzati a discriminare i campioni in funzione dell'etichetta di classificazione tramite un'ispezione visuale dello spazio dei parametri, nello specifico, in base al metodo di produzione, alla zona di cattura FAO per gli esemplari selvaggi, al Paese di origine per quelli allevati, o, ancora, alla etichetta qui proposta col nome di "Intensità" per tutti gli esemplari presi in esame) (vedi **Allegati n. 25÷48**).

Lo scopo dell'analisi statistica multiparametrica è stato quello di valutare la *performance* classificatoria di ciascun insieme di parametri. A tale scopo i campioni sono stati classificati con il metodo del discriminante quadratico. La procedura di validazione, detta "*Leave-One-Out Crossvalidation*", ha permesso di valutare la robustezza del metodo nella classificazione. Questo metodo consiste nel sottrarre volta per volta dal novero dei campioni ogni singolo esemplare, per classificarlo poi sulla base delle informazioni relative agli altri campioni presenti. Si tratta di un metodo comunemente utilizzato ed accettato per analisi

statistiche discriminatorie di questo tipo (Scotlandi et al., 2009).

II.5 RISULTATI E DISCUSSIONE

II.5.1 Caratterizzazione delle fonti degli esemplari di spigola

II.5.1.i Premessa

Lo scopo di questo progetto di ricerca (a seguire, semplicemente il “Progetto”), come ricordato più volte, consisteva nel verificare la praticabilità di un’autenticazione di origine in senso lato per la spigola (*Dicentrarchus labrax*). Perseguire tale scopo ha voluto dire esaminare un certo numero di esemplari allevati e selvaggi, provenienti da varie fonti collocate eminentemente nel bacino del Mediterraneo, per ricavarne una serie di osservazioni di natura morfometrica e chimica. L’applicazione dell’elaborazione statistica in analisi multivariata su questa considerevole mole di dati rappresentava la fase decisiva del lavoro.

Le fonti di esemplari utilizzate per il Progetto sono state caratterizzate per tutti le variabili morfometriche e chimiche rilevate, anche se, come convenuto, negli Allegati queste informazioni vengono riportate solo per tre fonti, ritenute esemplificative del “contesto” selvaggio, allevato intensivamente e allevato estensivamente.

Tra gli allegati presenti sono stati collocati i Database di riferimento (tabelle **DB_Farmed** e **DB_Wild**), allestiti a partire da una selezione di articoli scientifici dedicati al *Dicentrarchus labrax* e pubblicati dai primi anni ‘90 ad oggi. I criteri cui ci si è ispirati per la scelta degli articoli di riferimento sono stati sostanzialmente questi:

- per gli esemplari allevati (tabella **DB_Farmed**) si sono presi in esame esemplari di taglia (peso e lunghezza) comparabile a quella esplorata nel Progetto;
- sempre per gli allevati, ogniqualvolta ci si è trovati di fronte ad una prova con esemplari di controllo ed una o più tesi “trattate”, si è tenuto conto dei soli esemplari di controllo;
- a quanto sopra si è dovuto derogare in occasione della composizione acidica dei lipidi neutri e polari, a causa della scarsità del numero di contributi reperiti;
- per tutti gli esemplari, allevati come selvaggi (questi ultimi collocati nella tabella **DB_Wild**), si sono considerate solo le variabili prese in esame anche nel Progetto;
- quando necessario, alcuni dati sono stati calcolati: a mo’ di esempio, si è ritenuto utile calcolare la somma degli acidi grassi polinsaturi della serie n-3 (PUFA n-3), come

pure altre somme e indici di qualità dei lipidi, nel caso questi valori non fossero stati riportati nell'articolo di volta in volta sotto esame; in una sola circostanza (dati riportati solo come istogrammi da Skalli et al., 2006), a causa della già menzionata scarsità di informazioni di letteratura, ci si è rassegnati a stimarli mediante proporzioni impostate a partire da istogrammi. In entrambi i database, i dati calcolati o stimati sono riconoscibili perché resi in corsivo;

- sempre per tutti gli esemplari caratterizzati nella letteratura scientifica, allevati come selvaggi, si sono registrate le metodiche adottate per ottenere la caratterizzazione chimica; i riferimenti bibliografici alle metodiche in questione, per noi di tipo indiretto, sono stati inclusi in bibliografia, mantenendoli comunque distinti con un semplice accorgimento (li precede un asterisco);
- sempre in generale, ma più marcatamente per gli esemplari selvaggi, ci si è talvolta dovuti accontentare di valori ottenuti su un numero estremamente modesto di esemplari: questa è una criticità di molta letteratura in ambito ittico pubblicata anche a livello internazionale, che deve suggerire una certa cautela nell'impiego del dato.

A chiusura di questa premessa occorre sottolineare che, nel condurre le elaborazioni statistiche in analisi multivariata sulla globalità delle fonti, si è tenuto sempre conto del fattore “Stagione” (come macrostagione, con AI = autunno-inverno e PE = primavera-estate), senza però che in queste condizioni (vale a dire, a fonti tutte riunite) ne emergesse l'utilità (e quindi la necessità di tenerne conto). Tuttavia, nella compilazione dei files Excel di caratterizzazione delle singole fonti, come pure nei quadri riepilogativi che presentano gli esiti di tutto il Progetto come capacità classificatoria delle diverse combinazioni di variabili, i dati della macrostagione autunno-invernale sono stati mantenuti distinti da quelli della macrostagione primaverile-estiva per facilitarne la lettura e rendere il senso della presenza (o meno) di bilanciamento nel reperire gli esemplari delle diverse fonti.

Per agevolare la lettura all'esame dei risultati, si ritiene opportuno presentare a seguire i tratti distintivi delle fonti prese in esame, raggruppate in base alla “Intensità” dichiarata dai responsabili di allevamento o dai fornitori (**Allegati n. 17÷21**). Per le sue peculiarità, la valutazione comparativa delle fonti per quanto concerne le abbondanze isotopiche relative sarà condotta immediatamente a seguire, ma a parte.

Le osservazioni che verranno esposte vogliono essere solo una riflessione a margine su come si connotano i dati. Avendo a che fare con un universo piuttosto complesso, si è consapevoli del fatto che l'approccio corretto alla elaborazione è rappresentato, in casi quali questo, dall'analisi multivariata, cui verrà dedicata la parte successiva dei “Risultati ottenuti”.

II.5.1.ii Il profilo degli esemplari selvaggi

Quattro delle cinque fonti di esemplari selvaggi erano nell'ambito del Mare Mediterraneo:

- # 8, Mare Adriatico, al largo di Ravenna;
- # 13, Mare Adriatico, al largo della Croazia;
- # 14, Mar Mediterraneo nord-occidentale, Golfo del Leone;
- # 17, Mar Tirreno centrale.

La quinta fonte si trovava in Atlantico, al largo delle coste francesi, ed è stata presa in considerazione perché tutt'altro che insolita, nel nostro Paese, come provenienza del selvatico (**vedi Figura 1**).

Dal punto di vista morfometrico, gli esemplari del Progetto rientravano per il peso nei connotati del Database di riferimento (**Tabella DB_Wild**). Anche per la lunghezza, verosimilmente, la compatibilità sussisteva (si può solo ipotizzarlo per il mancato reperimento, nel corso della compilazione del DATABASE di informazioni in relazione agli esemplari di mole maggiore).

Per quanto concerne i lipidi totali, i “nostri selvaggi”, con il range 2,06÷7,63 g/100 g eduli, si collocavano completamente entro l'intervallo dei dati di letteratura; questo non deve far sfuggire il fatto che un tenore lipidico elevato come lo era il limite superiore del range (valore medio fornito dagli esemplari autunno-invernali della fonte # 8) fosse da ritenere “sospetto”, forse da ricondursi ad un commensalismo piuttosto efficiente ai danni di un qualche allevamento in gabbie galleggianti posto relativamente nelle vicinanze (Dempster et al., 2002).

Limitandosi agli aspetti complessivi della composizione acidica, la condizione di cui sopra si ripeteva per la somma degli acidi grassi saturi, o Σ SFA (nostro range 24,37÷28,61 in % esteri metilici degli acidi grassi o FAME), la somma degli acidi grassi monoinsaturi, o Σ MUFA (nostro range 26,04÷36,23 % FAME), la somma degli acidi grassi polinsaturi della serie n-3, o Σ PUFA n-3 (nostro range 20,25÷35,83 % FAME), la somma degli acidi grassi polinsaturi, o Σ PUFA (nostro range 27,54÷41,22 % FAME). Diversamente, i selvaggi del Progetto presentavano un range di valori per il tenore in acidi grassi polinsaturi della serie n-6 (o Σ PUFA n-6, qui 3,27÷10,37) che per il limite inferiore si collocavano al di sotto di quello desumibile dalla letteratura. Per i nostri esemplari selvaggi da quanto sopra conseguiva una *ratio* fra PUFA n-3 e PUFA n-6 particolarmente interessante (range coperto 2,78÷11,18), contro un intervallo da letteratura decisamente più ristretto e spostato verso il basso (0,73÷3,43). Quanto alla composizione acidica dei lipidi neutri e polari, l'unico contributo

fruibile da letteratura (Passi et al., 2004) è nel complesso abbastanza riconducibile agli intervalli di valore costruibili coi i dati delle fonti selvagge del Progetto.

Ben pochi sono i lavori con cui si può confrontare il quadro elementale dei selvaggi (Alasalvar et al., 2002; Fuentes et al., 2010), lavori i cui dati sono stati, quando necessario (Fuentes et al., 2010), resi sul tal quale ed espressi in mg/kg, per poterli comparare con quelli emersi dal Progetto. I valori riportati in letteratura risultano di molto inferiori a quelli trovati durante il Progetto stesso, sia per i macroelementi, sia per i microelementi. C'è da dire che in entrambi i lavori presi in esame si faceva ricorso alla spettroscopia di assorbimento atomico e non si faceva menzione dell'impiego di materiali di riferimento sottoposti ad analisi contestuali per dare conforto ai dati sperimentali.

Quanto agli elementi tossici, occorre richiamarsi ai livelli soglia imposti dalla legislazione comunitaria [Reg. (CE) N. 1881/2006], che per la spigola sono, in mg/kg di polpa, 0,05 per il cadmio, 0,50 per il mercurio e 0,30 per il piombo, livelli che non venivano mai superati. Non sussistono limiti per l'arsenico, di cui comunque colpiva il tenore raggiunto nei cinque esemplari autunno-invernali della fonte atlantica (1,07÷2,30 mg/kg polpa).

II.5.1.iii Il profilo degli esemplari

provenienti da allevamenti estensivi e semi-intensivi

In questo gruppo trovano collocazione gli esemplari della fonte codificata come # 3, provenienti da una storica “valle da pesca” della provincia di Rovigo (dunque, allevamento estensivo), come pure quelli provenienti dalle fonti # 5 e # 10, denominati “semi-intensivi” dai fornitori stessi (vedi **Figura 1**). Entrambi i gruppi di semi-intensivi venivano mantenuti in vasche a terra, ma solo per la prima fonte si è venuti a conoscenza della densità praticata in allevamento; in merito alla seconda fonte l'informazione non è stata fornita. Di quest'ultimo gruppo non si può non rimarcare l'alto costo di acquisto, comparabile a quello degli esemplari selvaggi.

I semi-intensivi e gli estensivi facevano registrare pesi corporei e lunghezze superiori a quelli degli animali prodotti intensivamente. Il range coperto dalle rese di eviscerazione avvicinava i semi-intensivi agli intensivi, più che agli estensivi. Lo stesso poteva dirsi per l'ampio campo di variazione degli indici viscerosomatico, epatosomatico e gonadosomatico. La resa in filetti con pelle si presentava articolata in un campo di variazione analogo a quello dei soggetti estensivi, mentre la resa in filetti senza pelle oscillava fra estremi più bassi di un paio di punti percentuali.

Quando si passava a considerare il range coperto dai lipidi totali e dalla loro

composizione in acidi grassi, la polpa degli esemplari semi-intensivi si presentava ben più ricca in grassi di quella degli estensivi (7,66÷9,82 vs 3,78÷5,01). La composizione acidica dei lipidi della polpa degli esemplari semi-intensivi, inoltre, presentava tratti più prossimi a quella degli esemplari intensivi che non a quella degli estensivi (per esempio, un tenore piuttosto alto di PUFA n-6, in particolare di LA, connesso ad un tenore ben più modesto di PUFA n-3, in particolare DHA, e, conseguentemente, un riduzione nel valore del rapporto fra la somma degli n-3 e la somma degli n-6).

Entrando più nel dettaglio, colpiva la maggiore somiglianza fra la composizione acidica dei lipidi neutri e polari degli esemplari semi-intensivi e quella degli intensivi, laddove, sempre per queste frazioni lipidiche, gli estensivi si mostravano piuttosto simili agli esemplari selvaggi.

Per quanto concerne la componente elementale, in linea di massima gli esemplari estensivi sembravano approssimarsi ai soggetti selvaggi.

La possibilità di trovare riscontro in letteratura ai dati compositivi ricavati per la polpa di esemplari estensivi e semi-intensivi di fatto sussiste. I lavori di Orban et al. (2002 e 2003) possono fornire dati di riferimento per gli esemplari estensivi, mentre il lavoro di Trocino et al. (2012) dà modo di valutare le caratteristiche compositive di esemplari da allevamento semi-intensivo.

I tenori lipidici prospettati da Orban et al. (2002 e 2003), vale a dire 1,78÷2,15 g/100 g eduli, e da Trocino et al. (2012) per esemplari di taglia comparabile a quelli del Progetto, cioè 5,40÷5,86 g/100 g segnalavano la maggiore “vicinanza compositiva” degli esemplari estensivi a quelli selvaggi. Gli estensivi di letteratura rispetto a quelli del Progetto si connotavano per essere più ricchi in SFA e in MUFA, comparabili per il tenore in PUFA n-6, ma meno dotati in PUFA n-3. I semi-intensivi di letteratura, in funzione della dieta somministrata, permettevano di delineare una composizione acidica con campi di variazione effettivamente piuttosto simili a quelli qui osservati per le fonti #5 e #10.

Quanto alla composizione elementale, si dispone di dati di letteratura solo per esemplari estensivi (Orban et al., 2002). Rispetto alla polpa di questi esemplari, quella degli esemplari estensivi del Progetto presentavano tenori nel complesso comparabili di potassio, calcio, magnesio e selenio, tenori inferiori di sodio, fosforo e cromo, tenori superiori di zinco e ferro. Un discorso a parte meritano gli elementi tossici, in particolare il mercurio, che Orban et al. (2002) avevano rilevato in quantità molto elevata e ricondotto alle caratteristiche geologiche dell'area in cui si trovava la valle da pesca presa in considerazione.

II.5.1.iv Il profilo degli esemplari provenienti da allevamenti intensivi

Rientravano qui cinque fonti nazionali ed altrettante fonti estere. E' risultato interessante confrontare i dati delle prime con quelli delle seconde, per poi comparare entrambi i gruppi con i dati reperiti nella letteratura scientifica degli ultimi due decenni. Come per i gruppi precedenti, queste valutazioni hanno il solo scopo di prendere atto di quello che può essere stato il posizionamento reciproco delle diverse fonti, come pure della loro allocazione rispetto a quanto noto dalla letteratura.

Le fonti nazionali erano (vedi **Figura 1**):

- # 4 gabbie galleggianti, Mare Adriatico, acque antistanti Monfalcone (GO);
- # 6 gabbie sommergibili, Mar Ligure, acque antistanti Lavagna (GE);
- # 15 gabbie galleggianti, Mar Tirreno centrale, Golfo Aranci (OT), Sardegna;
- # 16 gabbie galleggianti in acciaio, Ionio meridionale, Capo Passero (SR), Sicilia;
- # 18 gabbie galleggianti in acciaio, Mar Tirreno Meridionale, acque antistanti Castellamare del Golfo (TP), Sicilia.

Le fonti estere erano (vedi **Figura 1**):

- # 2 gabbie galleggianti, Mar Adriatico centrale, acque della Croazia;
- # 9 gabbie galleggianti, Mar Egeo, acque antistanti Atene, Grecia;
- # 12 gabbie galleggianti, Mar Egeo, acque antistanti Koropiou, Grecia;
- # 7 gabbie galleggianti, Mar Egeo, acque antistanti Bodrum, Turchia;
- # 11 gabbie galleggianti, Mar Egeo, acque antistanti Izmir, Turchia.

Gli allevati intensivi italiani si spingevano a taglie leggermente superiori rispetto a quelle estere, con comparabili rese di eviscerazione. Negli allevati italiani l'incidenza di fegato e gonadi si spingeva a livelli superiori, mentre risultava minore l'incidenza del grasso periviscerale. Entro ranges comparabili ricadeva l'incidenza percentuale dei filetti con pelle e senza pelle.

Il tenore lipidico non era poi molto dissimile: il range coperto dalle spigole italiane (5,55÷9,01 g/100 g eduli) era di poco discosto da quello coperto dagli esemplari esteri (5,99÷10,10 g/100 g eduli). Comparabili erano gli intervalli di valore per la Σ SFA (nazionali 19,83÷22,78 vs esteri 18,82÷21,53, sempre in % FAME) e la Σ PUFA (nazionali 38,55÷45,92 vs esteri 35,50÷44,41). Gli esemplari provenienti da allevamenti italiani, rispetto agli esteri presentavano un range di valori dai confini un po' diversi per la Σ MUFA (27,30÷33,18 vs 28,73÷39,68), per la Σ PUFA n-6 (13,32÷24,62 vs 10,06÷19,03) e per la Σ PUFA n-3 (17,53÷28,13 vs 21,05÷28,28), sempre limitandosi in questa sede ai parametri più importanti. Per il rapporto fra PUFA n-3 e PUFA n-6, il prodotto nazionale si presentava con un range

leggermente spostato verso il basso rispetto a quello estero ($0,71 \div 2,00$ vs $1,13 \div 2,74$). Caratteristica degli allevati italiani qui esaminati era la sovrapposibilità fra il range di livello di presenza dell'EPA e quello del DHA; questa stessa situazione sembrava affermarsi negli allevati di Croazia e Grecia, mentre nel prodotto turco sembrava predominare il DHA.

La letteratura di riferimento per gli allevati intensivi senza distinzione di Paese di provenienza (vedi **DB-Farmed**), prospetta, come prevedibile, un più ampio campo di variazione per il tenore lipidico ($4,38 \div 13,41$ g/100 g eduli), la Σ SFA ($23,10 \div 34,50$ % FAME), la Σ MUFA ($20,09 \div 46,00$), la Σ PUFA ($28,37 \div 51,00$), nonché per la Σ PUFA n-6 ($4,70 \div 27,60$) e, meno marcatamente, per la Σ PUFA n-3 ($17,29 \div 35,00$). Entro i PUFA n-3, il range coperto dall'EPA è risultato $4,97 \div 10,20$ % FAME e quello coperto dal DHA è stato $7,36 \div 20,20$ % FAME, valore quest'ultimo più alto rispetto a tutte le fonti intensive analizzate nel Progetto.

La composizione acidica dei lipidi neutri dell'allevato intensivo nazionale si presentava meno ricca in MUFA, ma più dotata in PUFA n-6 (dunque anche in PUFA) rispetto a quella dell'allevato intensivo estero. Quanto al quadro acidico dei lipidi polari, i soggetti allevati intensivamente in Italia, rispetto agli intensivi esteri, presentavano un tenore alquanto inferiore in SFA e MUFA, ma superiore in PUFA n-3 (dunque anche in PUFA).

La letteratura di riferimento per la composizione acidica dei lipidi neutri e polari di spigola è scarsa. Sono però risultati utili in tal senso i dati di Chatelier et al. (2006) e di Skalli et al. (2006). Rispetto ai dati in questione, per la composizione acidica dei lipidi neutri, i dati emersi dagli allevati intensivi del Progetto, nazionali come pure esteri, hanno manifestato livelli superiori di PUFA n-6 e di PUFA n-3 (e dunque di PUFA *in toto*). Per quanto concerne i lipidi polari, i ranges desumibili da Chatelier et al. (2006) e da Skalli et al. (2006) ricomprendono i campi di variazione dei dati da noi ottenuti sugli allevati intensivi nazionali ed esteri.

Il tenore in macroelementi della polpa di spigole allevate intensivamente, in allevamenti nazionali come in quelli esteri presi in esame nel Progetto, ricadeva entro i ranges desumibili dalla letteratura scientifica (dove peraltro non si reperiscono informazioni per lo zolfo). La medesima considerazione si applicava agli oligoelementi, con l'unica eccezione del rame, più elevato in tutte le fonti esaminate nel Progetto. Per quanto concerne gli elementi tossici, a fronte dei livelli soglia sopra menzionati, in due esemplari sui cinque della fonte 02 (campionamento primaverile-estivo) è stato riscontrato un tenore in piombo anormalmente elevato, laddove nei restanti tre il livello si assestava sugli $0,10$ mg/kg, il che portava la media di macrostagione oltre il limite di legge ($0,30$ mg/kg). Quanto alla letteratura di riferimento,

da quella veniva scarso conforto, come è dato apprezzare dalla valutazione del Database di riferimento.

II.5.1.v Le abbondanze isotopiche relative nei profili delle tipologie di allevamento

I valori emersi dal Progetto sono paragonabili con quelli trovati in letteratura (Barnes et al., 2007; Bell et al., 2007; Sweeting et al., 2007; Fasolato et al., 2010) e confermano l'ipotesi che ha ispirato il lavoro, dal momento che i range per il valore $\delta^{13}\text{C}$ di esemplari selvaggi erano compresi tra -24,78 e -12,42, dunque molto diversi da quelli registrati negli esemplari allevati a livello intensivo, sia nazionali (con valori compresi fra -21,04 e -19,40), sia esteri (range da -22,04 e -19,94).

Una situazione analoga si produceva per il valore $\delta^{15}\text{N}$, compreso tra 11,06 e 19,22 per gli esemplari selvaggi, mentre si collocava fra 9,98 e 14,00 per gli allevati italiani e fra 8,96 e 11,36 per quelli esteri. Interessante è notare come i valori degli allevati estensivi e semi-intensivi si pongano in posizione intermedia tra il selvaggio e l'allevato intensivo.

Soprattutto, ci piace qui rimarcare come gli esemplari allevati estensivi siano stati correttamente distinti dagli intensivi, presentando valori di $\delta^{13}\text{C}$ compresi fra -18,36 e -18,08 e valori di $\delta^{15}\text{N}$ compresi fra 12,82 e 13,78.

II.5.2 Le possibilità di autenticazione come emerse dal progetto

Nell'espore i risultati ottenuti, si prenderanno in considerazione gli obiettivi prefissati, ovvero il verificare la possibilità di "prevedere" gli elementi chiave della etichettatura, secondo il Reg. (CE) N. 2065/2001 e come confermato nell'art. 58 del Reg. (CE) N. 1224/2009, che sono poi il metodo di produzione (dicotomia Selvaggio-Allevato), la zona di cattura FAO per i selvaggi e il Paese di origine per gli allevati, ai quali, per tutti gli esemplari, è stato aggiunto, come ipotesi la cui utilità era da sottoporre a verifica, il parametro "Intensità", secondo l'accezione già delineata.

I risultato di questa serie di elaborazioni statistiche è stato chiuso negli **Allegati n. 22, 23 e 24**. Come anticipato, entro fonte e per ciascun *pool* di parametri, i risultati ottenuti sono stati articolati nelle due macrostagioni considerate in sede di campionamento con l'unico scopo di fornire al Lettore un plus di informazioni, in particolare in merito al bilanciamento dei dati.

L'**Allegato n. 22** riporta, distintamente per ciascuna delle 18 fonti, la % di corretta allocazione degli esemplari entro ciascuna fonte, per l'appunto, in relazione al metodo di produzione Selvaggio *vs* Allevato (con qualsivoglia modalità di allevamento, da estensivo a

semi-intensivo, ad intensivo), facendo ricorso ai già menzionati (e caratterizzati) *pool* di parametri, vale a dire:

- parametri morfometrici;
- umidità della polpa, lipidi totali della polpa, composizione acidica della polpa (% FAME);
- composizione acidica dei lipidi neutri della polpa (% FAME);
- composizione acidica dei lipidi polari della polpa (% FAME);
- tenore in macroelementi, oligoelementi ed elementi tossici della polpa;
- abbondanze isotopiche relative della polpa.

L'**Allegato n. 23** illustra, sempre distintamente per ciascuna delle 18 fonti, la % di corretta allocazione degli esemplari entro ciascuna fonte in relazione alla zona FAO di cattura (per gli esemplari selvaggi), oppure entro il Paese di origine (per gli esemplari allevati), facendo ricorso ai medesimi *pool* di parametri sopra elencati.

L'**allegato n. 24**, costruito coi medesimi criteri dei precedenti due, rende la % di corretta allocazione degli esemplari entro ciascuna fonte alla pertinente “Intensità” di approccio produttivo, un parametro classificatorio che abbiamo voluto testare in aggiunta ai primi tre, che sono di “legge”.

Quando si prende in esame il Metodo di Produzione (**Allegato n. 22**), in relazione alla totalità degli esemplari ($n = 160$), da quanto riportato in prima colonna si ha modo di apprezzare come a fornire la percentuale più elevata di corretta allocazione fosse il set di variabili “Umidità della polpa + Lipidi totali della polpa + Composizione acidica dei lipidi totali” e il set di variabili “Composizione acidica dei lipidi neutri”. Entrambi i set, infatti, classificavano correttamente il 94% degli esemplari di spigola da noi esaminati. Una potenzialità classificatoria pressoché equivalente (93%) esprimeva la composizione acidica dei lipidi polari. Di fatto sono diversi i contributi in ambito ittico che confermano la fruibilità della composizione acidica dei lipidi per discriminare l'allevato dal selvaggio (Koizumi et al., 2009; Usydus et al., 2012), più efficacemente se tale profilo emerge da studi in NMR che in gascromatografia (Aursand et al., 2009; Standal et al., 2010). Non troppo lontana da quella del quadro acidico era la performance fornita dalle abbondanze isotopiche relative (89% di esemplari correttamente classificati); già meno efficace il set dei parametri morfometrici (82%), ma non disprezzabile se si considera che si tratta di dati di semplicissima rilevazione. Il gruppo di dati che, presi complessivamente, lavorava meno bene era rappresentato dalla composizione elementale, costituita, lo si ricorda, da sei macroelementi, otto oligoelementi (o

elementi traccia) e quattro elementi tossici, tutti rilevati mediante tecnica ICP-OES.

Di fatto, non erano poche le fonti che si vedevano allocare correttamente (per il 100%) i propri esemplari da cinque set di variabili, dai semplici parametri morfometrici alle ben più sofisticate abbondanze isotopiche relative (fonti # 2, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 15), ma che proprio con il set elementale vedevano calare drasticamente la % di esemplari correttamente allocati. La fonte i cui esemplari venivano più pesantemente misclassificati (li si interpretava sovente come selvaggi) era la # 3, l'unica rappresentativa della tipologia di allevamento estensiva (vallicoltura). I “connotati” degli esemplari di questa fonte erano piuttosto distintivi ed è per questo che li si è mantenuti distinguibili nelle figure PCA dirette a evidenziare, attraverso le prime due componenti principali, come “lavorassero” i sei gruppi di variabili rispetto al Metodo di Produzione (**Allegati n. 25÷30**).

Le separazioni graficamente più nette si apprezzavano negli **Allegati n. 26÷28** (composizioni acidiche) e nell'**Allegato n. 30** (abbondanze isotopiche), il che poteva anche suggerire l'idea di testare insieme i due set di variabili per discriminare proprio la fonte estensiva.

Si consideri ora la Zona FAO di cattura (per gli esemplari selvaggi, n = 45) e il Paese di origine (per quelli allevati, n = 115) (**Allegato n. 23**), vale a dire gli elementi qualificativi di complemento al Metodo di Produzione. In relazione ai selvaggi la percentuale più elevata di allocazione corretta, pari al 69%, era permessa dal set di variabili “Umidità della polpa + Lipidi totali della polpa + Composizione acidica dei lipidi totali”, seguito dalla “Composizione acidica dei lipidi polari”. La performance meno brillante, invece, veniva dalle abbondanze isotopiche relative, col 53% di allocazione corretta. Quanto agli allevati, emergeva su tutte la performance del gruppo di variabili “Composizione acidica dei lipidi polari”, col 91% di allocazioni corrette, mentre la performance meno soddisfacente era fornita dal quadro elementale, con la metà circa di risposte corrette (per la precisione, il 45%).

Nell'ambito degli esemplari allevati, in particolare colpiscono due fonti, la # 3 e la # 10. La fonte # 3 (estensiva), che così poco brillantemente veniva allocata quanto a metodo di produzione (in pratica connotandosi come “né selvaggia, né allevata”), era correttamente assegnata al proprio Paese di origine (il nostro, per inciso) da cinque dei sei gruppi di variabili impiegate. In un certo senso, le faceva da contraltare la fonte # 10 (semi-intensiva), anch'essa italiana, che veniva del tutto misclassificata quando si faceva ricorso al quadro elementale, come pure alle abbondanze isotopiche relative (pertinenti figure PCA negli **Allegati n. 31÷36** e **n. 37÷42**, rispettivamente per Zona FAO e Paese di origine).

Il parametro classificatorio ulteriore “Intensità”, in relazione alla totalità degli

esemplari (n = 160), viene esaminato per le sue performance nell'**Allegato n. 24**. Al pari di quanto apprezzato a proposito dell'assegnazione del Paese di origine, il gruppo di variabili che operava al meglio era la "Composizione acidica dei lipidi polari", qui al 94% di corretta allocazione, un'incidenza dell'ordine di grandezza di quella massima ottenuta per il metodo di produzione, ancora più rimarchevole se si tiene conto del fatto che in questo ambito i possibili gradini di classificazione erano quattro (contro i due del metodo di produzione). Quattro dei restanti cinque set di variabili manifestavano performance sensibilmente meno buone, ma abbastanza prossime fra di loro (dal 71 al 76% di corretta allocazione). Ancora una volta il quadro elementale deludeva, con una % di corretta allocazione pari al 41%.

Tra le diverse fonti, per quelle a Intensità 0 (esemplari selvaggi), si segnalava la % piuttosto elevata di corretta allocazione della fonte # 8, come pure quella della fonte # 16, nell'ambito degli esemplari allevati intensivamente (Intensità 3), per quanto entrambe caratterizzate dalla assenza di allocazioni corrette nel campionamento primaverile-estivo ad opera delle variabili del quadro elementale.

Le figure PCA relative a quest'ultimo parametro classificatorio (**Allegati n. 43÷48**) sono tra le più eloquenti dell'intero gruppo da noi prodotto. Con la sola eccezione dell'**Allegato n. 43**, relativo ai parametri morfometrici, dai restanti allegati si ricava chiara la non discriminabilità degli esemplari da allevamenti semi-intensivi rispetto a quelli intensivi (dunque a quale titolo esitare il prodotto a prezzi astronomici, come pure si è visto fare? Solo perché si presenta in taglie superiori? Non sembra poi una differenza dai contenuti così interessanti). Quanto agli esemplari estensivi, non sono risultati discriminabili dai selvatici per i lipidi totali e le relative frazioni. Per finire, molto interessante è l'**Allegato n. 48**, relativo alle abbondanze isotopiche, perché gli esemplari estensivi si collocano proprio nella zona di demarcazione fra i selvatici e gli allevati semi-intensivi + intensivi.

II.6 CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE E RIFLESSIONI PER IL FUTURO

Nel contesto sperimentale indagato dal Progetto, quello cui ci si è riferiti per mettere a punto i nostri modelli, le risultanze emerse configurano la possibilità di fare autenticazione di origine della spigola per quanto riguarda il metodo di produzione (Selvaggio vs Allevato), in sostanza basandosi sulla composizione acidica dei lipidi totali (più due parametri della composizione centesimale, vale a dire tenore in umidità e lipidi totali) o, in alternativa la composi-

zione acidica dei lipidi neutri o di quelli polari, pur ricordando che gli esemplari estensivi escono misclassificati da questo sistema (perché assimilati ai selvaggi).

L'ulteriore utilizzazione del quadro acidico per individuare gli altri due elementi probanti della etichettatura, la zona FAO per gli esemplari selvaggi, il Paese di provenienza per gli allevati, ha dato risultati interessanti se ci si concentrava sui lipidi polari, che fornivano la migliore performance anche quando utilizzati per la allocazione degli esemplari alla loro propria "intensità", come concettualmente introdotta in questo Progetto.

Le abbondanze isotopiche relative hanno performato a livelli non di molto inferiori per il metodo di produzione, ma non altrettanto soddisfacentemente per gli altri elementi probanti della etichettatura.

Infine, il quadro elementale ottenuto in ICP-OES è risultato sempre piuttosto lontano dal fornire percentuali soddisfacenti di corrette allocazioni, sia per il metodo di produzione, sia per la zona FAO o il Paese di origine.

In definitiva, dal Progetto è emerso come il quadro acidico, in particolare quello dei lipidi polari, rappresenti il gruppo di variabili con le maggiori potenzialità classificatorie. Il gruppo di ricerca ha deliberato di non sottoporre a verifica le performance classificatorie permesse da un doppio set di variabili di tipo "indipendente", quali, per indicare qui quelle individualmente più promettenti, il quadro acidico dei lipidi polari e le abbondanze isotopiche relative. Ci si è orientati in questo senso per non prospettare improbabili assemblaggi di strumenti e tecniche analitiche costosi, anche se in letteratura non mancano esempi di proposte in questo senso.

Di fatto, sembra fin troppo oneroso il pedaggio chiesto da lunghi tempi di preparazione ed analisi del campione quando ne sia in valutazione una connotazione, quale l'origine in senso lato, che ne può condizionare il prezzo di vendita. Tutto questo diventa ancora più percepibile quando si applica all'alimento ittico, la derrata deperibile per eccellenza, come fatto rimarcare recentemente da Martinsohn et al. (2011), che collocano molto in alto l'asticella quando scrivono (citando alla lettera): "*Traceability in the "ocean to fork" sense relies on **efficient, reliable, cost effective technologies**, enabling the independent control of compliance with rules. In the fisheries sector, this encompasses the ability to determine whether labels on fish and fish products identify the correct species, correct origin, and whether fish are derived from aquaculture or the wild. Ideally, such methods should be adapted to end-users such as staff of control authorities, be applicable on whole fish as well as processed products, and **swiftly** lead to results. Moreover, if they are to be utilized for enforcements, **these methods should be validated applying forensic standards***

and generate levels of confidence based on statistical analysis certainty, which are considerably higher than that required for purely scientific inference”.

Le ultime riflessioni che si intende sviluppare concernono l’opportunità di indagare ancor più approfonditamente, soprattutto alla luce del varo di un quadro normativo unico e ufficiale per l’acquacoltura biologica, ambiti quali le ripercussioni derivanti dalla gestione dell’allevamento sulla qualità del prodotto. In questi ambiti, peraltro, riflessioni accurate sono state autorevolmente intraprese e divulgate di recente da Poli (2009) e Marino et al. (2011), solo per citare contributi particolarmente articolati.

Nel corso di questo progetto, per esempio, è il fattore “Intensità” (di allevamento) si è segnalato come potenzialmente interessante. Questo fattore contiene in sé, evidentemente, più aspetti, e nondimeno ha colpito per il suo comportamento e la sua attitudine a separare nettamente i selvaggi dagli allevati (semi-intensivi e intensivi non facevano differenza), con gli estensivi talvolta “annegati” fra i selvaggi (come è stato per il quadro lipidico), talvolta a fare da strato di separazione fra selvaggi e allevati (come è stato per le abbondanze isotopiche).

Ancora, è interessante riflettere su come, in contesti di allevamento con tale variabilità di “ambientazione”, ragionare solo di densità “finale” in kg/m³ non abbia molto senso, se non dopo aver precisato l’entità del ricambio idrico. La cosiddetta “densità finale”, infatti, è un parametro alquanto dinamico. Infatti, una volta che gli esemplari di una gabbia sono pronti per la commercializzazione, la “portata” di queste gabbie è tale che possono occorrere mesi per svuotarle degli animali che vi sono contenuti, mesi durante i quali la densità in gabbia ovviamente evolve, oltre a non essere facilmente quantificabile.

Alla luce di quanto sopra, si è compreso per quale motivo i responsabili di molte delle fonti di spigola prese in esame in occasione di questo progetto siano stati evasivi nel comunicare la densità di allevamento, o non l’abbiano comunicata *tout court*, oppure, ancora, siano stati forse un po’ lontani dalla realtà (vedi **Allegato n. 1**). Se il già citato lavoro di Trocino et al. (2012) assegna l’appellativo di semi-intensivo ad un allevamento che pratica una densità finale di 15 kg/m³, ci si trova in difficoltà a comprendere perché, con densità comparabili o minori, diversi dei fornitori che hanno risposto al nostro questionario abbiano invece definito “intensivo” il loro allevamento, con un approccio commercialmente all’apparenza autolesionista: c’è forse sotto la consapevolezza della presenza di problemi di ricambio?

L'avvio di una regolamentazione ufficiale per l'ambito delle produzioni biologiche in acquacoltura e le crescenti istanze di sostenibilità ambientale per le produzioni zootecniche "acquicole" implicano sfide conoscitive che nei prossimi anni sarà necessario raccogliere.

Riassumendo, in relazione agli esemplari di spigola (*Dicentrarchus labrax* L.) presi in esame in occasione di questo Progetto è stata dimostrata la possibilità di servirsi della composizione in acidi grassi dei lipidi polari per assegnare, con buona approssimazione, il metodo di produzione per i 160 esemplari complessivamente considerati (93% di corretta allocazione) e il Paese di origine per i 115 esemplari allevati (91% di corretta allocazione), nonché, ma questo esula dalla etichettatura di legge, il parametro "intensità" di produzione, sempre per i 160 esemplari complessivamente considerati (94% di corretta allocazione). Meno soddisfacente, ma sempre, comunque, la migliore possibile coi parametri presi in considerazione in occasione del Progetto, la % di corretta allocazione permessa dal quadro acidico dei lipidi polari per la zona FAO di cattura dei 45 esemplari selvaggi (69%).

II.7 Bibliografia

(Le voci bibliografiche con asterisco iniziale si riferiscono alle metodiche menzionate nei Database 'Wild' e 'Farmed')

AA.VV. (2011). *Misurare la qualità in acquacoltura. Un approccio scientifico al servizio delle aziende e dei consumatori*. I Georgofili, Quaderni 2010-IV, Edizioni Polistampa, Firenze.

Adley E.A., Black K.D., Sawyer T., Shimmield T.M., Trueman C.N. (2009). Scale microchemistry as a tool to investigate the origin of wild and farmed *Salmo salar*. *Marine Ecology Progress Series*, **390**, 225–235.

Agostoni C., Bresson J.L. Fairweather-Tait S., Flynn A., Golly I., Korhonen H., Pagona L., Løvik M., Marchelli R., Martin A., Moseley B., Neuhäuser-Berthold M., Przyrembel H., Salminen S., Sanz Y., Strain S.J.J., Strobel S., Tetens I., Tomé D., van Loveren H., Verhagen H. (2010). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, trans fatty acids, and cholesterol. *EFSA Journal*, **8**(3), 1461 [107 pp.], DOI:10.2903/j.efsa.2010.1461.

Alasalvar C., Taylor K.D.A., Zubcov E., Shahidi F., Alexis M. (2002). Differentiation of cultured and wild sea bass (*Dicentrarchus labrax*): total lipid content, fatty acid and trace mineral composition. *Food Chemistry*, **79**, 145–150.

- Altintzoglou T., Verbeke W., Vanhonacker F., Luten J. (2010). The image of fish from aquaculture among Europeans: impact of exposure to balanced information. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 19, (2), 103–119, DOI:10.1080/10498850.2010.492093.
- Amerio M., Ruggi C., Badini C. (1996). Meat quality of reared fish: nutritional aspects. *Italian Journal of Food Science*, 8(3), 221–229.
- Anderson K.A., Hobbie K.A., Smith B.W. (2010). Chemical profiling with modeling differentiates wild and farm-raised salmon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 11768–11774, DOI:10.1021/jf102046b.
- Asensio L., González I., Fernández A., Rodríguez M.A., Lobo E., Hernández P.E., García T., Martín R. (2002). Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for identification of grouper (*Epinephelus guaza*), wreck fish (*Polyprion americanus*), and Nile perch (*Lates niloticus*) filets. *Journal of Food Protection*, 65(2), 432–435.
- AOAC (2000). *Official methods of analysis* (17th ed.). Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD, USA.
- Arvanitoyannis I.S., Tsitsika E.V., Panagiotaki P. (2005). Implementation of quality control methods (physico-chemical, microbiological and sensory) in conjunction with multivariate analysis towards fish authenticity. *International Journal of Food Science & Technology*, 40, 237–263, DOI:10.1111/j.1365-2621.2004.00917.x.
- Aursand M., Jørgensen L., Grasdalen H. (1995). Positional distribution of ω 3 Fatty acids in marine lipid triacylglycerols by high-resolution ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 72(3), 293–297, DOI:10.1007/BF02541085.
- Aursand M., Standal I.B., Axelson D.E. (2007). High-Resolution ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy pattern recognition of fish oil capsules. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 38–47.
- Aursand M., Standal I.B., Prael A., McEvoy L., Irvine J., Axelson D.E. (2009). $\delta^{13}\text{C}$ NMR pattern of recognition techniques for the classification of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) according to their wild, farmed, and geographical origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(9), 3444–3451.
- Axelson D.E., Standal I., Martinez I., Aursand M. (2009). Classification of wild and farmed salmon using Bayesian Belief Networks and gas chromatography-derived fatty acid distributions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(17), 7634–7639,

DOI:10.1021/jf9013235

- Barnes C., Sweeting C.J., Jennings S., Barry J. T., Polunin N. V. C. (2007). Effect of temperature and ration size on carbon and nitrogen stable isotope trophic fractionation. *Functional Ecology*, 21(2), 356–362.
- Bartlett G.R. (1959). Phosphorus assay in column chromatography. *The Journal of Biological Chemistry*, 234(3), 466–468.
- Bateman A.S., Kelly S.D., Jickells T.D. (2005). Nitrogen isotope relationships between crops and fertilizer: implications for using nitrogen isotope analysis as an indicator of agricultural regime. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(14), 5760–5765, DOI:10.1021/jf050374h.
- Bayir A., Sirkecioğlu A.N., Aras N.M., Aksakal E., Haliloğlu H.I., Bayir M. (2010). Fatty acids of neutral and phospholipids of three endangered trout: *Salmo trutta caspius* Kessler, *Salmo trutta labrax* Pallas and *Salmo trutta macrostigma* Dumeril. *Food Chemistry*, 119(3), 1050–1056.
- Bell J.G., Tocher D.R., Henderson R.J., Dick J.R., Crampton V.O. (2003). Altered fatty acid compositions in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets containing linseed and rapeseed oils can be partially restored by a subsequent fish oil finishing diet. *Journal of Nutrition*, 133, 2793-2801.
- Bell J.G., Henderson R.J., Tocher D.R., Sargent J.R. (2004). Replacement of dietary fish oil with increasing levels of linseed oil: modification of flesh fatty acid composition in Atlantic salmon (*Salmo salar*) using a fish oil finishing diet. *Lipids*, 39(3), 223–232, DOI: 10.1007/s11745-004-1223-5.
- Bell J. G., Preston T., Henderson R.J., Strachan F., Bron J.E., Cooper K., Morrison D.J. (2007). Discrimination of wild and cultured European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) using chemical and isotopic analyses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 5934–5941.
- Bergleiter S. (2008). Organic aquaculture, 83–87. In (H. Willer, M. Yussefi-Menzler, N. Sorensenthe Eds): *World of organic agriculture, statistics and emerging trends*. International Federation of Organic Agriculture Movements (IFOAM), Bonn, Germany and Research Institute of Organic Agriculture (FiBL), Frick, Switzerland, http://www.soel.de/fachthemen/downloads/s_74_10.pdf#page=85
- Blanchet C., Lucas M., Julien P., Morin R., Gingras S., Dewailly E. (2005). Fatty acid composition of wild and farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Lipids*, 40(5), 529-531, DOI:10.1007/s11745-005-1414-0.

- Bligh E.G., Dyer W.Y. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), 911–917.
- Bohlke J.K., Gwinn C.J., Coplen T.B. (1993). New reference materials for nitrogen-isotope-ratio measurements. *Geostandards Newsletter*, 17, 159–164, DOI:10.1111/j.1751-908X.1993.tb00131.x.
- Boselli E., Pacetti D., Lucci P., Frega N.G. (2012). Characterization of phospholipid molecular species in the edible parts of bony fish and shellfish. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(12), 3234–3245, DOI: 10.1021/jf205159a.
- Bousquet M., Calon F., Cicchetti F. (2011). Impact of omega-3 fatty acids in Parkinson's disease. *Ageing Research Reviews*, 10, 453–463, DOI:10.1016/j.arr.2011.03.001.
- Bremner G. (2009). Marine fish of disputed origin: can trace elements provide a forensic solution? A case study from southern New Zealand. Ministry of Fisheries, PO Box 19261, Dunedin, New Zealand, citato da Martinsohn et al. (2011).
- Bro R., van den Berg F., Thybo A., Andersen C.M., Jørgensen B.M., Andersen H. (2002). Multivariate data analysis as a tool in advanced quality monitoring in the food production chain. *Trends in Food Science & Technology*, 13(6–7), 235–244.
- Busetto M.L., Moretti V.M., Moreno-Rojas J.M., Caprino F., Giani I, Malandra R., Bellagamba F., Guillou C. (2008). Authentication of farmed and wild turbot (*Psetta maxima*) by fatty acid and isotopic analyses combined with chemometrics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 2742–2750, DOI: 10.1021/jf0734267.
- Chatelier A., McKenzie D. J., Prinnet A., Galois R., Robin J., Zambonino J., Claireaux G. (2006). Associations between tissue fatty acid composition and physiological traits of performance and metabolism in the seabass (*Dicentrarchus labrax*). *The Journal of Experimental Biology*, 209, 3429-3439.
- Chaudhry A.S., Jabeen, F. (2011). Examining the mineral profile in different tissues of *Cyprinus carpio* from upstream and downstream locations of the Indus River. *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fishery*, 15(3), 123-129.
- Chen H., He Y. (2007). Theory and application of near infrared reflectance spectroscopy in determination of food quality. *Trends in Food Science & Technology*, 18, 72–83.
- Chen S., Zhang J., Chen W., Zhang Y., Wang J., Xu D., Zhou Y. (2012). Quick method for grouper species identification using Real-Time PCR. *Food Control*, available online 23 March 2012, DOI:10.1016/j.foodcont.2012.03.011.
- Christie W.W. (1989). *Gas chromatography and lipids - A practical guide*, 67–69. The Oily Press, Ayr, UK.

- *Commissione per la Valutazione degli Alimenti (1980). *Valutazione degli alimenti di interesse zootecnico. I. Analisi chimica. Zootecnica e Nutrizione Animale*, 6, 19–34.
- Comesana, A. S., Abella, P., Sanjuan, A. (2003). Molecular identification of five commercial flatfish species by PCR-RFLP analysis of a 12S rRNA gene fragment. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 752–759.
- Cordier M., Brichon G., Weber J.M., Zwingelstein G. (2002). Changes in the fatty acid composition of phospholipids in tissues of farmed sea bass (*Dicentrarchus labrax*) during an annual cycle. Roles of environmental temperature and salinity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 133, 281–288.
- Costa C., D’Andrea S., Russo R., Antonucci F., Pallottino F., Menesatti P. (2011). Application of non-invasive techniques to differentiate sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L. 1758) quality cultured under different conditions. *Aquaculture International*, 19, 765–778, DOI:10.1007/s10499-010-9393-9.
- Costas M., Pena F., Gil S., Bendicho C., Lavilla, I. (2011). Use of Q-ICP-MS following microwave-assisted digestion in the determination of 40 elements for seafood origin authentication. *Atomic Spectroscopy*, 32(3), 114–126.
- Costas-Rodriguez M., Lavilla I., Bendicho C. (2010). Classification of cultivated mussels from Galicia (Northwest Spain) with European Protected Designation of Origin using trace element fingerprint and chemometric analysis. *Analytica Chimica Acta*, 664(2), 121–128.
- Cozzolino D., Murray I., Scafe J.R. (2002). Near Infrared Reflectance Spectroscopy in the prediction of chemical characteristics of minced raw fish. *Aquaculture Nutrition*, 8, 1–6.
- Cozzolino D., Chree A., Scaife J. R., Murray I. (2005). Usefulness of Near-Infrared Reflectance (NIR) Spectroscopy and chemometrics to discriminate fishmeal batches made with different fish species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4459–4463, DOI: 10.1021/jf050303i.
- Cozzolino D., Restaino E., La Manna A., Fernandez E., Fassio A. (2009). Usefulness of Near Infrared Reflectance (NIR) Spectroscopy and chemometrics to discriminate between fishmeal, meat meal and soya meal samples, *Ciencia e Investigacion Agraria*, 36(2), 209–214.
- Cubadda F., Raggi A., Coni E. (2006). Element fingerprinting of marine organisms by dynamic reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 384(4), 887–896, DOI: 10.1007/s00216-005-0256-6.

- Dalsgaard J., St. John M., Kattner G., Müller-Navarra D., Hagen W. (2003). Fatty acid trophic markers in the pelagic marine environment. *Advances in Marine Biology*, 46, 225–340, DOI:10.1016/S0065-2881(03)46005-7.
- Defrancesco E. (2003). The beginning of organic fish farming in Italy. Nota di lavoro 65.2003, in SIEV – Sustainability Indicators and Environmental Evaluation, in: <http://www.feem.it/Feem/Pub/Publications/WPapers/default.html>
- De Leonardis A., Macciola V. (2004). A study on the lipid fraction of Adriatic sardine fillets (*Sardina pilchardus*). *Nahrung/Food*, 48(3), 209–212.
- Delgado A., Estevez A., Hortelano P., Alejandro M.J. (1994). Analyses of fatty acids from different lipids in liver and muscle of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): influence of temperature and fasting. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 108(4), 673–680.
- Dempster T., Sanchez-Jerez P., Bayle-Sempere J.T., Giménez-Casalduero F., Valle C. (2002). Attraction of wild fish to sea-cage fish farms in the south-western Mediterranean Sea; spatial and short-term temporal variability. *Marine Ecology Progress Series*, 242, 237–252.
- Dennis M.J. (1998). Recent developments in food authentication. *Analyst*, 123, 151R–156R.
- Diraman H., Dibeklioglu H. (2009). Chemometric characterization and classification of selected freshwater and marine fishes from Turkey based on their fatty acid profiles. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 86(3), 235–246.
- Erdem M.E., Baki B., Samsun S. (2009). Fatty acid and amino acid compositions of cultured and wild sea bass (*Dicentrarchus labrax* L., 1758) from different regions in Turkey. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 8(10), 959–963.
- Erkan N., Özden Ö. (2007). Proximate composition and mineral contents in aquacultured seabass (*Dicentrarchus labrax*), sea bream (*Sparus aurata*) analyzed by ICP-MS. *Food Chemistry*, 102(3), 721–725.
- Fasolato L., Novelli E., Salmaso L., Corain L., Camin F., Perini M., Antonetti P., Balzan S. (2010). Application of nonparametric multivariate analyses to the authentication of wild and farmed European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Results of a survey on fish sampled in the retail trade. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 58(20), 10979–10988.
- Fernandez-Jover D., Lopez Jimenez J.A., Sanchez-Jerez P., Bayle-Sempere J., Gimenez Casalduero F., Martinez Lopez F.J., Dempster T. (2007). Changes in body condition

- and fatty acid composition of wild Mediterranean horse mackerel (*Trachurus mediterraneus*, Steindachner, 1868) associated to sea cage fish farms. *Marine Environmental Research*, 63(1), 1–18, DOI:10.1016/j.marenvres.2006.05.002.
- Fiske C.H., Subbarow Y. (1925). The colorimetric determination of phosphorus. *The Journal of Biological Chemistry*, 66(2), 375–400.
- Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226, 497–509.
- Fountoulaki E., Vasilaki A., Hurtado R., Grigorakis K., Karacostas I., Nengas I., Rigos G., Kotzamanis Y., Venou B., Alexis M.N. (2009). Fish oil substitution by vegetable oils in commercial diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.); effects on growth performance, flesh quality and fillet fatty acid profile. Recovery of fatty acid profiles by a fish oil finishing diet under fluctuating water temperatures. *Aquaculture*, 289, 317–326.
- Fuentes A., Fernández-Segovia I., Serra J.A., Barat J.M. (2010). Comparison of wild and cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) quality. *Food Chemistry*, 119, 1514–1518.
- Gil L.A. (2007). PCR-based methods for fish and fishery products authentication. *Trends in Food Science & Technology*, 18(11), 558–566, DOI:10.1016/j.tifs.2007.04.016.
- *Glass R.L., Christopherson S. W. (1969). A method for the differential analysis of mixtures of esterified and free fatty acids. *Chemistry and Physics of Lipids*, 3(4), 405–408.
- Gonfiantini R. (1978). Standards for stable isotope measurements in natural compounds. *Nature*, 271, 534–536.
- Gonfiantini R. (1984). Report on an advisory group meeting on stable isotope reference samples for geochemical and hydrochemical investigations, Vienna, 19-21 Settembre 1983. IAEA, Vienna, http://www-naweb.iaea.org/NAALIHL/docs/pub/IAEA-1984-Gonfiantini_AGMeeting-StableIsotopeRM.pdf
- Gonfiantini R., Stichler W., Rozanski K. (1995). Standards and intercomparison materials distributed by the International Atomic Energy Agency for stable isotope measurements. IAEA-TECDOC-825. IAEA, Vienna, 13-29.
- Gonzalez S., Flick G.J., O’Keefe S.F., Duncan S.E., McLean E., Craig S.R. (2006). Composition of farmed and wild yellow perch (*Perca flavescens*). *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 720–726, DOI:10.1016/S0044-8486(02)00191-6.

- Gokoglu N., Yerlikaya P., Cengiz E. (2004). Effects of cooking methods on the proximate composition and mineral contents of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Food Chemistry*, 84(1), 19–22, DOI:10.1016/S0308-8146(03)00161-4.
- Gracia A., de Magistris T. (2007). Organic food product purchase behaviour: a pilot study for urban consumers in the South of Italy. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 5(4), 439–451.
- Grigorakis K. (2007). Compositional and organoleptic quality of farmed and wild gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and factors affecting it: a review. *Aquaculture*, 272, 55–75.
- Gudjónsdóttir M., Jónsson Á., Bergsson A.B., Arason S., Rustad T. (2011). Shrimp processing assessed by low field nuclear magnetic resonance, near infrared spectroscopy, and physicochemical measurements—The effect of polyphosphate content and length of prebrining on shrimp muscle. *Journal of Food Science*, 76, E357–E367, DOI:10.1111/j.1750-3841.2011.02112.x.
- Guler G.O., Kiztanir B., Aktumsek A., Citil O.B., Ozparlak H. (2008). Determination of the seasonal changes on total fatty acid composition and $\omega 3/\omega 6$ ratios of carp (*Cyprinus carpio* L.) muscle lipids in Beysehir Lake (Turkey). *Food Chemistry*, 108(2), 689–694 DOI:10.1016/j.foodchem.2007.10.080
- Helland S., Denstadli V., Witten P.E., Hjelde K., Storebakken T., Skrede A., Åsgård T., Baevefjord G. (2006). Hyper dense vertebrae and mineral content in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed diets with graded levels of phytic acid. *Aquaculture*, 261, 603–614, doi:10.1016/j.aquaculture.2006.08.027.
- Herrero B., Lago F.C., Vieites J.M., Espiñeira M. (2012a). Real-time PCR method applied to seafood products for authentication of European sole (*Solea solea*) and differentiation of common substitute species. *Food Additives & Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 29(1), 12–18, DOI:10.1080/19440049.2011.623682.
- Herrero M., Simó C., García-Cañas V., Ibáñez E., Cifuentes A. (2012b), Foodomics: MS-based strategies in modern food science and nutrition. *Mass Spectrometry Reviews*, 31, 49–69, DOI:10.1002/mas.20335.
- Higgins R.M., Danilowicz B.S., Balbuena J.A., Danielsdottir A.K., Geffen A.J., Meijer W.G., Modin J., Montero F.E., Pampoulie C., Perdiguero-Alonso D., Schreiber A., Stefansson M., Wilson B. (2010). Multi-disciplinary fingerprints reveal the harvest location of cod *Gadus morhua* in the northeast Atlantic. *Marine Ecology Progress*

Series, 404, 197–206.

- Hubalkova Z., Kralik P., Kasalova J., Rencova E. (2008). Identification of gadoid species in fish meat by Polymerase Chain Reaction (PCR) on genomic DNA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(10), 3454–3459, DOI:10.1021/jf703684w.
- Hunt A.O., Ozkan F., Engin K., Tekelioglu N. (2011). The effects of freshwater rearing on the whole body and muscle tissue fatty acid profile of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture International*, 19, 51–61, DOI:10.1007/s10499-010-9340-9.
- Hut G. (1987). Consultants' group meeting on stable isotope reference samples for geochemical and hydrological investigations. International Atomic Energy Agency, Vienna, April 1987.
- Huynh M.D., Kitts D.D., Hu C., Trites A.W. (2007). Comparison of fatty acid profiles of spawning and non-spawning Pacific herring, *Clupea harengus pallasii*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 146, 504–511.
- *Ichihara K., Shibahara A., Yamamoto K., Nakayama T. (1996). An improved method for rapid analysis of the fatty acids of glycerolipids. *Lipids*, 31(5), 535–539.
- Jérôme M., Lemaire C., Bautista J.M., Fleurence J., Etienne M. (2003). Molecular phylogeny and species identification of sardines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(1), 43–50, DOI:10.1021/jf020713w.
- Jérôme M., Martinsohn J.T., Ortega D., Carreau P., Verrez-Bagnis V., Mouchel O. (2008). Toward fish and seafood traceability: anchovy species determination in fish products by molecular markers and support through a Public Domain Database. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (10), 3460–3469, DOI:10.1021/jf703704m.
- Jobling M. (2004). Are modifications in tissue fatty acid profiles following a change in diet the result of dilution? Test of a simple dilution model. *Aquaculture*, 232, 551–562.
- Jobling M., Larsen A., Andreassen B., Sigholt T., Olsen R. (2002). Influence of a dietary shift on temporal changes in fat deposition and fatty acid composition of Atlantic salmon post-smolt during the early phase of seawater rearing. *Aquaculture Research*, 33, 875–889, DOI:10.1046/j.1365-2109.2002.00727.x.
- Jordan F., Butler R., Prugger R. (Eds): *Food Chain Integrity – A Holistic Approach to Food Traceability, Safety; quality and Authenticity*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK.
- Jørgensen B.M. (2009). Data handling by multivariate data analysis, 444–457. In (H. Rehbein e J. Oehlenschläger Eds): *Fishery products: quality, safety and authenticity*. Wiley-

Blackwell, Oxford, UK, DOI:10.1002/9781444322668.ch21.

- *Joseph J.D., Ackman R.G. (1992). Capillary column gas chromatographic method for analysis of encapsulated fish oils and fish oil ethyl esters: collaborative study. *Journal of A.O.A.C.*, 75, 487–506.
- *Juaneda, P., Roquelin, G.. (1985). Rapid and convenient separation of phospholipids and non-phosphorus lipids from rat heart using silica cartridges. *Lipids*, 20, 40–41.
- Karoui R., Downey G., Blecker C. (2010). Mid-Infrared Spectroscopy coupled with chemometrics: a tool for the analysis of intact food systems and the exploration of their molecular structure-quality relationships - A review. *Chemical Reviews*, 110(10), 6144–6168, DOI: 10.1021/cr100090k.
- Kelly S. (2003). Using stable isotope ratio mass spectrometry, 156–183. In (M. Less ed): *Food Authenticity and Traceability*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK.
- Kelly S., Heaton K., Hoogewerff J. (2005). Tracing the geographical origin of food: the application of multi-element and multi-isotope analysis. *Trends in Food Science & Technology*, 16, 555–567, DOI:10.1016/j.tifs.2005.08.008.
- Kelly S., Brereton P., Guillou C., Broll H., Laube I., Downey G., Rossman A., Hőzl S., van der Veer G. (2011). New approaches to determining the origin of food, 238–258. In (J. Hoorfar, K. Jordan, F. Butler, R. Prugger Eds): *Food chain integrity – A holistic approach to food traceability, safety, quality and authenticity*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK.
- Khodabux K., L’Omelette M.S.S., Jhaumeer-Laulloo S., Ramasami S., Rondeau P. (2007). Chemical and near-infrared determination of moisture, fat and protein in tuna fishes. *Food Chemistry* 102, 669–675, DOI:10.1016/j.foodchem.2006.05.057.
- Knight J.G., Holdsworth D. K., Mather D.W. (2007). Country-of-origin and choice of food imports: an in-depth study of European distribution channel gatekeepers. *Journal of International Business Studies*, 38, 107–125.
- Koizumi K., Hiratsuka S. (2009). Fatty acid compositions in muscles of wild and cultured ocellate puffer *Takifugu rubripes*. *Fisheries Science*, 75(5), 1323–1328.
- Kole A.P.W., Altintzoglou T., Schelvis-Smit R.A.A.M., Luten J.B. (2009). The effects of different types of product information on the consumer product evaluation for fresh cod in real life settings, *Food Quality and Preference*, 20(3), 187–194.
- Krajnović-Ozretić M., Najdek M., Ozretić B. (1994). Fatty acids in liver and muscle of farmed and wild sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 109(3), 611–617.

- Lago F.C., Vieites J.M., Espiñeira M. (2012). Authentication of the most important species of freshwater eels by means of FINS. *European Food Research and Technology*, 234, 689–694, DOI 10.1007/s00217-012-1672-4.
- Lambert J., Klieb L., Weber M. (2008). Regional influences upon the selection of imported versus domestic seafood. *Academy of Marketing Studies Journal*, 12(1), 17–42.
- Lees M., Thomas F. (2008). Confirming the origin of wild and farmed fish, 565–584 In (Ø. Lie ed): *Improving farmed fish quality and safety*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK,.
- Lei L., Li J., Li G., Hu J., Tang L., Liu R., Fan Y., Deng Z. (2012). Stereospecific analysis of triacylglycerol and phospholipid fractions of five wild freshwater fish from Poyang Lake. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 1857–1864, DOI:10.1021/jf204584t.
- Lenas D., Loghothetis P., Kanlis G., Nathanailides C. (2010). Comparison of fatty acids in the brains of wild and reared sea bass *Dicentrarchus labrax* L. and sea bream *Sparus aurata* L., and living in the same natural environment. *International Aquatic Research*, 2, 135–141.
- Luykx D.M.A.M., van Ruth S.M. (2008). An overview of analytical methods for determining the geographical origin of food products. *Food Chemistry*, 107, 897–911.
- Majolini D., Trocino A., Xiccato G., Santulli A. (2010). Near Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS) characterization of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) from different rearing systems. *Italian Journal of animal Science*, 8(2), 860–862, DOI:10.4081/ijas.2009.s2.860.
- Mannina L., Sobolev A.P., Capitani D., Iaffaldano N., Rosato M.P., Ragni P., Reale A., Sorrentino E., D'Amico I., Coppola R. (2008). NMR metabolic profiling of organic and aqueous sea bass extracts: implications in the discrimination of wild and cultured sea bass. *Talanta*, 77, 433–444, DOI:10.1016/j.talanta.2008.07.006.
- Marinetti G.V. (1962). Chromatographic separation, identification, and analysis of phosphatides. *Journal of Lipid Research*, 3(1), 1–20.
- Marino G., Di Marco P., Petochi T. (2011). Il benessere animale negli schemi di certificazione per l'acquacoltura, biologica inclusa, 67–92. In AA.VV.: *Misurare la qualità in acquacoltura. Un approccio scientifico al servizio delle aziende e dei consumatori*. I Georgofili, Quaderni 2010-IV, Edizioni Polistampa, Firenze.
- Martinez I. (2009). Other principles: analysis of lipids, stable isotopes and trace elements, 388–409. In (H. Rehbein and J. Oehlenschläger eds): *Fishery products: quality, safety*

- and authenticity*. Wiley-Blackwell, Oxford, UK. DOI:10.1002/9781444322668.ch18.
- Martinez I., Standal I.B., Axelson D.E., Finstad B., Aursand M. (2009). Identification of the farm origin of salmon by fatty acid and HR ^{13}C NMR profiling. *Food Chemistry*, 116(3), 766–773, DOI:10.1016/j.foodchem.2009.03.026.
- Martínez I., Standal I.B., Aursand M., Yamashita Y., Yamashita M. (2010). Analytical methods to differentiate farmed from wild seafood, 215–232, In (L.M.L. Nollet e F. Toldrá Eds): *Handbook of Seafood and Seafood Products Analysis*. CSC press, Taylor & Francis group, Boca Raton, US DOI: 10.1201/9781420046359-c14.
- Martinez I., Aursand M., Erikson U., Singstad T.E., Veliyulin E., van der Zwaag C. (2003). Destructive and non-destructive analytical techniques for authentication and composition analyses of foodstuffs. *Trends in Food Science & Technology*, 14, 489–498.
- Martinez I., Bathen T., Standal I.B., Halvorsen J., Aursand M., Gribbestad I.S., Axelson D.E. (2005). Bioactive compounds in cod (*Gadus morhua*) products and suitability of ^1H NMR metabolite profiling for classification of the products using multivariate data analyses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(17), 6889–6895, DOI:10.1021/jf0507902.
- Martinsohn J.T., Geffen A.J., Maes G.E., Nielsen E.E., Ogden R., Waples R.S., Carvalho G.R. (2011). Tracing fish and fish products from ocean to fork using advanced molecular technologies, 259–282. In (J. Hoorfar, K. Jordan, F. Butler, R. Prugger Eds): *Food Chain Integrity – A holistic approach to food traceability, safety, quality and authenticity*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK.
- Medina I., Sacchi R. (1994). Acyl stereospecific analysis of tuna phospholipids via high resolution ^{13}C -NMR spectroscopy. *Chemistry and Physics of Lipids*, 70(1), 53–61.
- Medina I., Aubourg S.P., Perez Martin R. (1997). Species differentiation by multivariate analysis of phospholipids from canned atlantic tuna. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2495–2499.
- Molkentin J., Meisel H., Lehmann I., Rehbein H. (2007). Identification of organically farmed Atlantic salmon by analysis of stable isotopes and fatty acids. *European Food Research and Technology*, 224: 535–543, DOI:10.1007/s00217-006-0314-0.
- Montero D., Robaina L., Caballero M.J., Gines R., Izquierdo M.S. (2005). Growth, feed utilization and flesh quality of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed diets containing vegetable oils: a time-course study on the effect of a re-feeding period with

- a 100% fish oil diet. *Aquaculture*, 248, 121–134.
- Moreira A.B., Visentainer J.H.V., de Souza N.E., Matsushita M. (2001). Fatty acids profile and cholesterol contents of three Brazilian Brycon freshwater fishes. *Journal of Food Composition and Analysis*, 14, 565–574, DOI:10.1006/jfca.2001.1025.
- *Morrison W.R., Smith L.M. (1964). Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride–methanol. *The Journal of Lipid Research*, 5, 600–608.
- Morrison D.J., Preston T., Bron J.E., Henderson R.J., Cooper K., Strachen, F., Bell J.G. (2007). Authenticating production origin of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) by chemical and isotopic fingerprinting. *Lipids*, 42(6), 537–545.
- Mourente G., Bell J.G. (2006). Partial replacement of dietary fish oil with blends of vegetable oils (rapeseed, linseed and palm oils) in diets for European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) over a long term growth study: Effects on muscle and liver fatty acid composition and effectiveness of a fish oil finishing diet. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 145, 389–399.
- Mourente G., Good J.E., Bell J.G. (2005). Partial substitution of fish oil with rapeseed, linseed and olive oils in diets for European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): effects on flesh fatty acid composition, plasma prostaglandins E2 and F2 α , immune function and effectiveness of fish oil finishing diet. *Aquaculture Nutrition*, 11(1), 25–40.
- Mnari A., Bouhlel I., Chraief I., Hammami M., Romdhane M.S., El Cafsi M., Chaouch A. (2007). Fatty acids in muscles and liver of Tunisian wild and farmed gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *Food Chemistry*, 100, 1393–1397.
- Natarajan M.V., Sreenivasan A. (2011). Proximate and mineral composition of freshwater fishes. *Indian Journal of Fisheries*, 422–429,
<http://epubs.icar.org.in/ejournal/index.php/IJF/article/download/13558/6775>.
- Nicolosi Asmundo C., Scerra V., Cataldi Lupo M.C., Arculeo M., Sinatra M.C., Campisi S. (1993). Composizione e aspetti nutrizionali di *Dicentrarchus labrax* in relazione all'accrescimento. *La Rivista di Scienza dell'Alimentazione*, 22(4), 459–467.
- Nortvedt R., Torrissen O.J., Tuene S. (1998). Application of near infrared transmittance spectroscopy in the determination of fat, protein, dry matter in Atlantic halibut fillets. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 42, 199–207.
- Orban E., Navigato T., Di Lena G., Casini I., Marzetti A. (2003). Differentiation in the lipid quality of wild and farmed seabass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream

- (*Sparus aurata*). *Journal of Food Science*, 68(1), 128–132.
- Orban E., Di Lena G., Nevigato T., Casini I., Santaroni G., Marzetti A., Caproni R. (2002). Quality characteristics of sea bass intensively reared and from lagoon as affected by growth conditions and the aquatic environment. *Journal of Food Science*, 67(2), 542–546.
- Ostermeyer U., Schmidt T. (2004). Differentiation of wild salmon, conventionally and organically farmed salmon. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 100(11), 437–444.
- Ötles, Y., Ozden O., Ötles S. (2010). Organic fish production and the standards. *Acta Scientiarum Polorum Technologia Alimentaria*, 9(2), 125–131.
- Ottavian M., Facco P., Fasolato L., Novelli E., Mirisola M., Perini M., Barolo M. (2012). Use of Near-Infrared Spectroscopy for fast fraud detection in seafood: application to the authentication of wild European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(2), 639–648, DOI: 10.1021/jf203385e.
- Özden Ö. (2005). Changes in amino acid and fatty acid composition during shelf-life of marinated fish. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 2015–2020, DOI:10.1002/jsfa.2207.
- Özogul Y., Özogul F. (2007). Fatty acid profiles of commercially important fish species from the Mediterranean, Aegean and Black Seas. *Food Chemistry*, 100, 1634–1638.
- Özogul Y., Özogul F., Alagoz S. (2007). Fatty acid profiles and fat contents of commercially important seawater and freshwater fish species of Turkey: a comparative study. *Food Chemistry*, 103(1), 217–223.
- Özogul F., Gökbulut C., Özyurt G., Özogul Y., Dural M. (2005). Quality assessment of gutted wild sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in ice, cling film and aluminium foil. *European Food Research and Technology*, 220, 292–298.
- Özyurt G., Polat A. (2006). Amino acid and fatty acid composition of wild sea bass (*Dicentrarchus labrax*): a seasonal differentiation. *European Food Research Technology*, 222, 316–320.
- Özyurt G., Polat A., Tokur B. (2007). Chemical and sensory changes in frozen (-18°C) wild sea bass (*Dicentrarchus labrax*) captured at different fishing seasons. *International Journal of Food Science and Technology*, 42, 887–893.
- Panchaud A., Sauty A., Kernen Y., Decosterd L.A., Buclin T., Boulat O., Huga C., Pileta M., Roulet M. (2006). Biological effects of a dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids supplementation in cystic fibrosis patients: a randomized, crossover placebo-controlled trial. *Clinical Nutrition*, 25, 418–427.

- *Park, P. W., Goins, R. A. (1994). In-situ preparation of fatty acid methyl esters for analysis of fatty acid composition in foods. *Journal of Food Science*, 59, 1262–1266.
- *Passi S., Cataudella S., Di Marco P., De Simone F., Rastrelli L. (2002). Fatty acid composition and antioxidant levels in muscle tissue of different Mediterranean marine species of fish and shellfish. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 7314-7322.
- Passi S., Ricci R., Cataudella S., Ferrante I., De Simone F., Rastrelli L. (2004). Fatty acid pattern, oxidation product development and antioxidant loss in muscle tissue of rainbow trout and *Dicentrarchus labrax* during growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 2587–2592.
- Pepe T., Trotta M., Di Marco I., Cennamo P., Anastasio A., Cortesi M.L. (2005). Mitochondrial cytochrome b DNA sequence variations: an approach to fish species identification in processed fish products. *Journal of Food Protection*, 68(2), 421–425.
- Pepe T., Trotta M., Di Marco I., Cennamo P., Anastasio A., Bautista J.M., Cortesi M.L. (2007). Fish species identification in surimi-based products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(9), 3681–3685, DOI:10.1021/jf063321o.
- Peres B., Barlet N., Loiseau G., Montet D. (2007). Review of the current methods of analytical traceability allowing determination of the origin of foodstuffs. *Food Control*, 18, 228–235.
- Periago J., Ayala D., Lopez-Albors O., Abdel I., Martinez C., Garcia-Alcazar A., Ros G., Gilb F. (2005). Muscle cellularity and flesh quality of wild and farmed sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *Aquaculture*, 249, 175–188.
- Person-Le Ruyet J., Mahé K., Le Bayon N., Le Delliou H. (2004). Effects of temperature on growth and metabolism in a Mediterranean population of European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*, 237, 269–280.
- Poli B.M. (2009). Farmed fish welfare – Suffering assessment and impact on product quality. *Italian Journal of Animal Science*, 8(Suppl. 1), 139–160.
- Regost C., Arzel J., Robin J., Rosenlund G., Kaushik S.J. (2003). Total replacement of fish oil by soybean or linseed oil with a return to fish oil in turbot (*Psetta maxima*) 1. Growth performance, flesh fatty acid profile and lipid metabolism. *Aquaculture*, 217, 465–482.
- Rehbein, H. (2009). DNA-based methods, 363–387. In (H. Rehbein e J. Oehlenschläger Eds): *Fishery products: quality, safety and authenticity*. Wiley-Blackwell, Oxford, UK, DOI:10.1002/9781444322668.ch17.
- Rehbein, H., Schiefenhövel K. (2012). Evaluation of a rapid PCR-based method for species

- identification of raw and processed fish and shrimps. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 21, 86–96, DOI: 10.1080/10498850.2011.584017.
- Reida L.M., O'Donnell C.P., Downey G. (2006). Recent technological advances for the determination of food authenticity, *Trends in Food Science & Technology*, 17, 344–353.
- Renon P., Mortari A., Mortarino M., Biondi P.A. (1991). Contenuto di acidi grassi polinsaturi in pesci marini consumati in Italia. *Industrie alimentari*, 30(299), 1066–1071.
- Rezzi S., Guillou C., Reniero F. (2003). The application of NMR in the implementation of European policies on consumer protection, 62–69. In (P.S. Belton, A.M. Gil, G.A. Webb, D. Rutledge Eds): *Magnetic resonance in food science: latest developments*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.
- Rezzi S., Giani I., Héberger K., Axelson D.E., Moretti V.M., Reniero F., Guillou C. (2007). Classification of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) from ¹H NMR lipid profiling combined with Principal Component and Linear Discriminant Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(24), 9963–9968, DOI:10.1021/jf070736g.
- Roncarati A., Sirri F., di Domenico A., Brambilla G., Iamiceli A.L., Melotti P., Meluzzi A. (2010). Survey of qualitative traits of European sea bass cultivated in different rearing systems. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112(7), 770–779.
- Rooker J.R., Secor D.H., Zdanowicz V.S., De Metro G., Relini L.O. (2003). Identification of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) stocks from putative nurseries using otolith chemistry. *Fisheries Oceanography*, 12, 75–84, DOI:10.1046/j.1365-2419.2003.00223.x
- Sacchi R., Medina I., Paolillo L., Addeo F. (1994). High-resolution ¹³C-NMR olefinic spectra of DHA and EPA acids, methyl esters and triacylglycerols. *Chemistry and Physics of Lipids*, 69(1), 65–73.
- Sacchi R., Medina I., Aubourg S.P., Addeo F., Paolillo L. (1993a). Proton nuclear magnetic resonance rapid and structure-specific determination of ω -3 polyunsaturated fatty acids in fish lipids. *Journal of The American Oil Chemists' Society*, 70(3), 225–228, DOI:10.1007/BF02545299.
- Sacchi R., Medina I., Aubourg S.P., Giudicianni I., Paolillo L., Addeo F. (1993b). Quantitative high-resolution carbon-13 NMR analysis of lipids extracted from the white muscle of Atlantic tuna (*Thunnus alalunga*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(8), 1247–1253, DOI: 10.1021/jf00032a016.
- SantAna L.S., Ducatti C., Ramires D.G. (2010). Seasonal variation in chemical composition

- and stable isotopes of farmed and wild Brazilian freshwater fish. *Food Chemistry*, 122(1), 74–77.
- Saravanan P., Davidson N.C., Schmidt E.B., Calder P.C. (2010). Cardiovascular effects of marine omega-3 fatty acids. *Lancet*, 375, 540–50, DOI:10.1016/S0140-6736(10)60445-X.
- Sargent J.R., Bell J.G., Bell M.V., Henderson R.J., Tocher, D.R. (1995). Requirement criteria for essential fatty acids. *Journal of Applied Ichthyology*, 11, 183–198, DOI:10.1111/j.1439-0426.1995.tb00018.x
- Scotlandi K., Remondini D., Castellani G., Manara M.C., Nardi F., Cantiani L., Francesconi M., Mercuri M., Caccuri A.M., Serra M., Knuutila S., Picci P. (2009). Overcoming resistance to conventional drugs in Ewing sarcoma and identification of molecular predictors of outcome. *Journal of Clinical Oncology*, 27(13), 2209–2216.
- Senso L., Suarez M.D., Ruiz-Cara T., Garcia-Gallego M. (2007). On the possible effects of harvesting season and chilled storage on the fatty acid profile of the fillet of farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Food Chemistry*, 101, 298–307.
- Shirai N., Suzuki H., Toukairin S., Wada S. (2001). Spawning and season affect lipid content and fatty acid composition of ovary and liver in Japanese catfish (*Silurus asotus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 129(1), 185–195.
- Siddiqui R.A., Harvey K.A., Zaloga G.P. (2008). Modulation of enzymatic activities by n-3 polyunsaturated fatty acids to support cardiovascular health. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 19, 417–437, DOI:10.1016/j.jnutbio.2007.07.001.
- Silverman S.R. (1964). Investigations of petroleum origin and evolution mechanisms by carbon isotope studies, 92–102. In (H. Craig, S.L. Miller, G.J. Wasserburg Eds): *Isotopic and Cosmic Chemistry*, North-Holland Pub. Co., Amsterdam, The Netherlands.
- Singh M. (2005). Essential Fatty Acids, DHA and human brain. *Indian Journal of Pediatrics*, 72(3), 239–242, DOI: 10.1007/BF02859265.
- Skalli A., Robin J.H., Le Bayon N., Le Delliou H., Person-Le Ruyet J. (2006). Impact of essential fatty acid deficiency and temperature on tissues' fatty acid composition of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 255, 223–232.
- Smith P.J., McVeagh S.M., Steinke, D. (2008). DNA barcoding for the identification of smoked fish products. *Journal of Fish Biology*, 72, 464–471. DOI:10.1111/j.1095-8649.2007.01745.x.

- Smith R.G., Watts C.A. (2009). Determination of the country of origin of farm-raised shrimp (family *Penaeidae*) using trace metal profiling and multivariate statistics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(18), 8244–8249.
- Solberg C., Fredriksen G. (2001). Analysis of fat and dry matter in capelin by near infrared transmission spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 9, 221–228.
- Standal I.B., Axelson D.E., Aursand M. (2009). Differentiation of fish oils according to species by ¹³C-NMR regiospecific analyses of triacylglycerols. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 86, 401–407, DOI 10.1007/s11746-009-1370-y.
- Standal I.B., Axelson D.E., Aursand M. (2010). $\delta^{13}\text{C}$ NMR as a tool for authentication of different gadoid fish species with emphasis on phospholipid profiles. *Food Chemistry*, 121(2), 608–615.
- Standal I.B., Axelson D.E., Aursand M. (2011). Authentication of marine oils using ¹³C NMR spectroscopy. *Lipid Technology*, 23, 152–154, DOI:10.1002/lite.201100123.
- Standal I.B., Prael A., McEvoy L., Axelson D.E., Aursand M. (2008). Discrimination of cod liver oil according to wild/farmed and geographical origins by GC and ¹³C NMR. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 85, 105–112, DOI:10.1007/s11746-007-1174-x.
- Sweeting C. J., Barry J., Barnes C., Polunin N.V.C., Jennings S. (2007). Effects of body size and environment on diet-tissue $\delta^{15}\text{N}$ fractionation in fishes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 340(1), 1-10.
- Testi S., Bonaldo A., Gatta P.P., Badiani A. (2006). Nutritional traits of dorsal and ventral fillets from three farmed fish species. *Food Chemistry*, 98(1), 104–111.
- Thomas F., Jamin E., Wietzerbin K., Guérin R., Lees M., Morvan E., Billault I., Derrien S., Rojas J.M.M., Serra F., Guillou C., Aursand M., McEvoy L., Prael A., Robinsand R.J. (2008). Determination of origin of Atlantic salmon (*Salmo salar*): the use of multiprobe and multielement analyses in combination with fatty acid composition to assess wild or farmed origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(3), 989–997, DOI: 10.1021/jf072370d.
- Toppe J., Albrektsen S., Hope B., Aksnes A. (2007). Chemical composition, mineral content and amino acid and lipid profiles in bones from various fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 146(3), 395–401, DOI:10.1016/j.cbpb.2006.11.020.
- Torstensen B., Frøyland L., Lie Ø. (2004). Replacing dietary fish oil with increasing levels of

- rapeseed oil and olive oil – effects on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) tissue and lipoprotein lipid composition and lipogenic enzyme activities. *Aquaculture Nutrition*, 10, 175–192, DOI:10.1111/j.1365-2095.2004.00289.x.
- Trocino A., Xiccato G., Majolini D., Tazzoli M., Bertotto D., Pascoli F., Palazzi R. (2012). Assessing the quality of organic and conventionally-farmed European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Food Chemistry*, 131, 427–433.
- Turchini G.M., Torstensen B.E. Ng W.K. (2009a). Fish oil replacement in finfish nutrition. *Reviews in Aquaculture*, 1, 10–57, DOI:10.1111/j.1753-5131.2008.01001.x.
- Turchini G.M., Quinn G.P., Jones P.L., Palmeri G., Gooley G. (2009b). Traceability and discrimination among differently farmed fish: a case study on Australian Murray cod. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(1), 274–281.
- Turner N., Else P.L., Hulbert A.J. (2003). Docosahexaenoic acid (DHA) content of membranes determines molecular activity of the sodium pump: implications for disease states and metabolism. *Naturwissenschaften*, 90(11), 521–523, DOI:10.1007/s00114-003-0470-z.
- US-EPA (2000). *Guidance for assessing chemical contaminant data for use in fish advisories. Vol. 1 – Fish sampling and analysis*, 3rd Edition. United States Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA.
- Usydus Z., Szlifder-Richert J., Adamczyk M. (2012). Variations in proximate composition and fatty acid profiles of Baltic sprat (*Sprattus sprattus balticus*). *Food Chemistry*, 130(1), 97–103.
- Valentini M., Ritota M., Cafiero C., Cozzolino S., Leita L., Sequi P. (2011). The HRMAS–NMR tool in foodstuff characterisation. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 49, S121–S125, DOI:10.1002/mrc.2826.
- Verlegh P. (2007). Home country bias in product evaluation: the complementary roles of economic and socio-psychological motives. *Journal of International Business Studies* 38, 361–373, DOI:10.1057/palgrave.jibs.8400269.
- Visentainer J.V., D’Addio Noffs M., de Oliveira Carvalho P., de Almeida V.V., de Oliveira C.C., de Souza N.E. (2007). Lipid content and fatty acid composition of 15 marine fish species from the Southeast coast of Brazil, *Journal of American Oil Chemists' Society*, 84, 543–547, DOI:10.1007/s11746-007-1070-4.
- *Weilmeier D.M., Regenstein J.M. (2004). Cooking enhances the antioxidant properties of polyphosphates. *Journal of Food Science*, 69(1), FCT16–FCT20.
- Xiccato G., Trocino A., Tulli F., Tibaldi E. (2004). Prediction of chemical composition and

- origin identification of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) by Near Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS). *Food Chemistry*, **86**(2), 275–278.
- Yamashita M., Namikoshi A., Iguchi J., Takashima Y., Hossain M.A., Yabu T., Yamashita Y. (2008). Molecular identification of species and the geographic origin of seafood. fisheries for global welfare and environment, 297–306. In (K. Tsukamoto, T. Kawamura, T. Takeuchi, T.D. Beard, Jr. e M.J. Kaiser Eds): Fisheries for global welfare and environmen. Memorial book of the 5th World Fisheries Congress, TERRAPUB, Tokyo, Giappone.
<http://www.vliz.be/imisdocs/publications/145943.pdf>.
- Yanar Y., Çelik M. (2006). Seasonal amino acid profiles and mineral contents of green tiger shrimp (*Penaeus semisulcatus* De Haan, 1844) and speckled shrimp (*Metapenaeus monoceros* Fabricus, 1789) from the Eastern Mediterranean. *Food Chemistry*, **94**(1), 33–36.
- Yanes-Roca C., Rhody N., Nystrom M., Main K.L. (2009). Effects of fatty acid composition and spawning season patterns on egg quality and larval survival in common snook (*Centropomus undecimalis*). *Aquaculture*, **287**, 335–340.
- Yildiz M. (2008). Mineral composition in fillets of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and sea bream (*Sparus aurata*): a comparison of cultured and wild fish. *Journal of Applied Ichthyology*, **24**, 589–594.
- Yildiz M., Sener E., Timur M. (2008). Effects of differences in diet and seasonal changes on the fatty acid composition in fillets from farmed and wild sea bream (*Sparus aurata* L.) and seabass (*Dicentrarchus labrax* L.). *International Journal of Food Science and Technology*, **43**, 853–858.
- Yue G.H., Orban L. (2001). Rapid isolation of DNA from fresh and preserved fish scales for Polymerase Chain Reaction. *Marine Biotechnology*, **3**(3), 199–204, DOI:10.1007/s10126-001-0010-9.
- Wasko A.P., Martins C., Oliveira C., Foresti F. (2003). Non-destructive genetic sampling in fish. An improved method for DNA extraction from fish fins and scales. *Hereditas*, **138**, 161–165, DOI:10.1034/j.1601-5223.2003.01503.x.
- Weber J., Bochi V.C., Ribeiro C.P., Victorio A.M., Emanuelli T. (2008). Effect of different cooking methods on the oxidation, proximate and fatty acid composition of silver catfish (*Rhamdia quelen*) fillets. *Food Chemistry*, **106**, 140–146.
- Withler R.E., Candy J.R., Beacham T.D., Miller K.M. (2004). Forensic DNA Analysis of Pacific salmonid samples for species and stock identification. *Environmental*

Biology of Fishes, 69(1-4), 275-285, DOI: 10.1023/B:EBFI.0000022901.26754.0b.

Zamora R., Hidalgo F.J. (2006). Determination of fatty acid composition and oxidation in fish oils by High Resolution Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Modern Magnetic Resonance*, 3, 925–931, DOI: 10.1007/1-4020-3910-7_106.

Zhu F., Zhang D., He Y., Liu F., Sun D. (2012). Application of visible and near infrared hyperspectral imaging to differentiate between fresh and frozen–thawed fish fillets. *Food Bioprocess Technology*, DOI:10.1007/s11947-012-0825-6 (in press).

ESPOSTI DI LEGGE:

Disegno di legge n. 2483, comunicato alla presidenza del Senato il 17 settembre 2003.

Disciplina dell'acquacoltura biologica.

<http://www.senato.it/service/PDF/PDFServer/BGT/00091757.pdf>.

Decreto Ministeriale n. 11954 del 30.7.2010. Disposizioni per l'attuazione del Regolamento (CE) n. 710/2009 che modifica il regolamento (CE) n. 889/2008 recante modalità di applicazione del regolamento (CE) n. 834/2007 del Consiglio per quanto riguarda l'introduzione di modalità di applicazione relativa alla produzione di animali e di alghe marine dell'acquacoltura biologica (con decreto per la notifica e relativo modello).

http://old.politicheagricole.it/Normativa/20100707_DM_PQ_PA_11954_acquacoltura_biologica.htm (ultimo accesso 11.10.2011)

Reg. (CE) N. 2092/91 del Consiglio del 24 giugno 1991 relativo al metodo di produzione biologico di prodotti agricoli è alla indicazione di tale metodo sui prodotti agricoli e sulle derrate alimentari. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, L 198 del 22.7.1991, 1–103.

Regolamento (CE) N. 104/2000 del Consiglio del 17 dicembre 1999 relativo all'organizzazione comune dei mercati nel settore dei prodotti della pesca e dell'acquacoltura. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, L 17 del 21.1.2000, 22–52.

Reg. (CE) N. 2065/2001. Regolamento della Commissione del 22 ottobre 2001 che stabilisce le modalità d'applicazione del Regolamento (CE) N. 104/2000 del Consiglio per quanto concerne l'informazione dei consumatori nel settore dei prodotti della pesca e dell'acquacoltura. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, L 278 del 23.10.2001, 6–8.

Reg. (CE) N. 1881/2006. Regolamento della Commissione del 19 dicembre 2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, L 364 del 20.12.2006, 5–24.

- Reg. (CE) N. 834/2007 del Consiglio del 28 giugno 2007 relativo alla produzione biologica e all'etichettatura dei prodotti biologici e che abroga il regolamento (CEE) n. 2092/91. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, L 189 del 20.7.2007, 1–23.
- Regolamento (CE) N. 629/2008 della Commissione del 2 luglio 2008 che modifica il regolamento (CE) n. 1881/2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, L173 del 3.7.2008, 6–9.
- Reg. (CE) N. 710/2009. Regolamento della Commissione del 5 agosto 2009 che modifica il regolamento (CE) n. 889/2008 recante modalità di applicazione del regolamento (CE) n. 834/2007 del Consiglio per quanto riguarda l'introduzione di modalità di applicazione relative alla produzione di animali e di alghe marine dell'acquacoltura biologica. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, L 204 del 6.8.2009, 15–34.
- Reg. (CE) N. 1224/2009. Regolamento del Consiglio del 20 novembre 2009 che istituisce un regime di controllo comunitario per garantire il rispetto delle norme della politica comune della pesca, che modifica i regolamenti (CE) n. 847/96, (CE) n. 2371/2002, (CE) n. 811/2004, (CE) n. 768/2005, (CE) n. 2115/2005, (CE) n. 2166/2005, (CE) n. 388/2006, (CE) n. 509/2007, (CE) n. 676/2007, (CE) n. 1098/2007, (CE) n. 1300/2008, (CE) n. 1342/2008 e che abroga i regolamenti (CEE) n. 2847/93, (CE) n. 1627/94 e (CE) n. 1966/2006. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, L 343 del 22.12.2009, 1–50.

DOCUMENTO ALLEGATO N. II.1

ULTERIORI INFORMAZIONI OTTENUTE DAI FORNITORI DEI LOTTI DI SPIGOLA PRESI IN ESAME NEL PROGETTO 7 C 11 (n.a. = non applicabile)

Allegato 1 - Caratterizzazione delle Fonti di esemplari di Spigola										
Fonte	Tipologia (allevato/selvaggio)	Identificazione Fornitore	Prezzo (€/kg) comprensivo di IVA (20%) (AI - PE)	Località	Caratteristiche impianto	Densità d'allevamento	Data pesca AI	Data pesca PE	Esemplari AI	Esemplari PE
1	Selvaggio (reti d'imbrocco)	ADLER - Cesenatico (FC)	36,00 - 27,50	ATLANTICO nord-orientale	n.a.	n.a.	20-nov-09	17-mag-10	n. 1-10	n. 201-208
2	Allevato	S.E.A. - Gabicce Mare (PU)	4,00 - 5,50	CROAZIA	Gabbie galleggianti	Intensivo (12 kg/m3)	23-nov-09	08-mag-10	n. 11-20	n. 181-190
3	Allevato	Valle Ca' Zuliani - Pila di Porto Tolle (RO)	7,60 - 8,00	Porto Tolle (RO)	Valle	Estensivo (0,10 kg/m3)	10-dic-09	28-dic-10	n. 21-30	n. 321-330
4	Allevato	Valle Ca' Zuliani - Pila di Porto Tolle (RO)	6,80 - 7,10	Monfalcone (GO)	Gabbie galleggianti	Intensivo (16 kg/m3)	09-dic-09	20-lug-10	n. 31-40	n. 251-260
5	Allevato	Valle Ca' Zuliani - Pila di Porto Tolle (RO)	7,50	Porto Tolle (RO)	Vasche a terra	Semi-intensivo (0,72 kg/m3)	09-dic-09	19-lug-10	n. 41-50	n. 261-270
6	Allevato	AQUA - Lavagna (GE)	7,00 - 7,50	Lavagna (GE)	Gabbie galleggianti sommergibili	Intensivo (10-15 kg/m3)	12-dic-09	21-giu-10	n. 51-60	n. 221-230
7	Allevato	Ditta Mare - Rimini (RN)	4,40 - 5,50	TURCHIA (loc. Broduh)	Gabbie galleggianti	Intensivo	09-dic-09	28-ago-10	n. 61-70	n. 291-300
8	Selvaggio (reti d'imbrocco)	ADLER - Cesenatico (FC)	29,70 - 34,10	Ravenna	n.a.	n.a.	28-dic-09	06-lug-10	n. 71-80	n. 241-247
9	Allevato	Ditta Mare - Rimini (RN)	4,40 - 4,40	GRECIA (loc. Atene)	Gabbie galleggianti	Intensivo	10-gen-10	---	n. 81-90	---
10	Allevato	COO.P.A.M. - Orbetello (GR)	31,90 (800 - 900 g) - 19,80	Follonica (GR)	Vasche a terra	Semi-intensivo	13-gen-10	11-mag-10	n. 91-98	n. 191-200
11	Allevato	Ditta Mare - Rimini (RN)	4,40 - 4,40	TURCHIA (loc. Izmir)	Gabbie galleggianti	Intensivo	13-gen-10	---	n. 101-110	---
12	Allevato	Ditta Mare - Rimini (RN)	4,40 - 5,50	GRECIA (Koropiu)	Gabbie galleggianti	Intensivo	15-gen-10	18-giu-10	n. 111-120	n. 231-240
13	Selvaggio (reti) + Ingrassio 2 mesi in gabbia	ADLER - Cesenatico (FC)	38,5	CROAZIA	n.a.	n.a.	---	28-lug-10	---	n. 271-277
14	Selvaggio (reti divergenti)	Giò Mare - Cesenatico (FC)	12,70 - 29,70	FRANCIA - Golfo del Leone (Sète)	n.a.	n.a.	27-gen-10	15-giu-10	n. 131-140	n. 211-217
15	Allevato	C.I.R. (Compagnie Ittiche Riunite) - Golfo Aranci (OT)	5,00 - 5,50	Golfo Aranci - Isola Figarolo (OT)	Gabbie galleggianti in polietilene	Intensivo (15 kg/m3)	02-feb-10	10-ago-10	n. 141-150	n. 281-290
16	Allevato	Acqua Azzurra - Pachino (SR)	6,00 - 6,50	Pachino - Capo Passero (SR)	Gabbie galleggianti in acciaio	Intensivo	04-feb-10	07-set-10	n. 151-160	n. 301-310
17	Selvaggio	ADLER - Cesenatico (FC)	36,30 - 36,30	Tirreno	n.a.	n.a.	16-feb-10	13-set-10	n. 161-170	n. 311-319
18	Allevato	Ittica Trappeto - Trappeto (PA)	8,00	Castellamare del Golfo (TP)	Gabbie galleggianti in acciaio	Intensivo (18 kg/m3)	18-feb-10	---	n. 171-180	---

n.a. = non applicabile; AI = autunno-inverno; PE = primavera-estate

DOCUMENTO ALLEGATO N. II.2a

QUESTIONARIO DA SOTTOPORRE AI FORNITORI

PROGETTO AUTENTIFICAZIONE BRANZINO BIOLOGICO

Dati relativi ai campioni inviati

- * Sito di allevamento :
- * Tipologia di allevamento :
 - Gabbie galleggianti sommergibili
 - Gabbie galleggianti
 - Gabbie galleggianti in acciaio
 - Vasche in terra
 - Vallicoltura
- * Distanza dell' allevamento dalla costa : nmi (miglia)
- * Profondità delle gabbie rispetto al fondale : m
- * Densità di allevamento : kg / m³
 - Intensivo
 - Semi-intensivo
 - Estensivo
- * Temperatura dell'acqua (al momento del prelievo): ° C
- * Salinità dell'acqua (al momento del prelievo): ‰
- * Data di semina relativa ai campioni:/...../.....
- * Mangime utilizzato durante il periodo di ingrasso (se possibile specificare il nome dell' Azienda e del mangime):

Cogliamo l'occasione per ringraziare gli Operatori per la disponibilità nel compilare la presente, facendo notare che le informazioni fornite saranno per noi di notevole valore.

Il Responsabile Scientifico

(Prof. Massimo Trentini)
e-mail: massimo.trentini@unibo.it

DOCUMENTO ALLEGATO N. II.2b

SUPPLIERS' FORM

“EUROPEAN SEA BASS AUTHENTICATION” PROJECT

Batch features

- * Farming site:
- * Farmings type :
 - Submersible cages
 - Floating cages
 - Steel floating cages
 - Ground tanks
 - Lagoons

- * Farm-to-coast distance :nmi (miles)
- * Cages bottom-to-seabed distance :..... m
- * Rearing density: kg / m³
 - Intensive
 - Semi-intensive
 - Extensive
- * Water temperature (at sampling): ° C
- * Water salinity (at sampling): ‰
- * Rearing start date:/...../.....
- * Feed (s) used during the fattening period [if only possible, both the name of the feed(s) and the manufactures(s)] :.....

The Compiler

Date ____/____/_____

(Name and Surname)

The information provided will be treated as strictly confidential.
Thank you for cooperating to the project.

The Project Leader

(Prof. Massimo Trentini)
e-mail address: massimo.trentini@unibo.it

DOCUMENTO ALLEGATO N. II.3a

CAMPI CONTEMPLATI PER LA CARATTERIZZAZIONE GENERALE DI OGNI ESEMPLARE

Identifi	Codice alfanumerico identificativo di ogni singolo esemplare, composto da stagione, fonte, natura e numero
Stagione	Codice alfabetico relativo alla stagione di campionamento degli esemplari: AI per autunno-inverno; PE per primavera-estate
Fonte	Codice numerico da 01 a 18 relativo alla fonte di campionamento: nella stagione PE sono state campionate solo 15 fonti
Fao Zone	Codice alfanumerico relativo alla Zona Fao di provenienza degli esemplari selvaggi: 27 per zona di pesca in Oceano Atlantico; 37 per zona di pesca nel Mare Mediterraneo, con relative sottozone
Country	Codice alfabetico relativo al paese di origine degli esemplari allevati: C per Croazia, G per Grecia, I per Italia e T per Turchia
Tipo	Codice alfabetico relativo alla natura degli esemplari: A per allevati; S per selvatici
Prezzo	Prezzo del prodotto espresso in euro/chilo, IVA al 20% inclusa
FarmType	Codice alfabetico relativo alla tipologia di allevamento: VL per valle; VT per vasche in terra; GG per gabbie galleggianti; GS per gabbie sommergibili. Nel database il valore 0 designa gli esemplari selvaggi
Intensit	Codice numerico relativo alla "intensità di pressione umana": vale 0 per gli esemplari selvatici; 1 per l'allevamento estensivo; 2 per gli allevamenti semi-intensivi; 3 per gli allevamenti intensivi
Naz-Est	Codice alfabetico relativo alla provenienza nazionale o non degli esemplari allevati: NZ per nazionale; ES per estero Ai selvatici si applica valore 0

DOCUMENTO ALLEGATO N. II.3b

CARATTERIZZAZIONE PIENA DEGLI ESEMPLARI LA CUI POLPA È ANDATA ALLE ANALISI

Identifi	Stagione	Fonte	FAO Zone	Country	Tipo	Prezzo	FarmType	Intensit	Naz-Est
AI01S001	AI	01	27	n.a.	S	36,00	0	0	0
AI01S005	AI	01	27	n.a.	S	36,00	0	0	0
AI01S006	AI	01	27	n.a.	S	36,00	0	0	0
AI01S009	AI	01	27	n.a.	S	36,00	0	0	0
AI01S010	AI	01	27	n.a.	S	36,00	0	0	0
AI02A011	AI	02	37.2.1	C	A	4,00	GG	3	ES
AI02A013	AI	02	37.2.1	C	A	4,00	GG	3	ES
AI02A014	AI	02	37.2.1	C	A	4,00	GG	3	ES
AI02A017	AI	02	37.2.1	C	A	4,00	GG	3	ES
AI02A020	AI	02	37.2.1	C	A	4,00	GG	3	ES
AI03A022	AI	03	37.2.1	I	A	7,60	VL	1	NZ
AI03A025	AI	03	37.2.1	I	A	7,60	VL	1	NZ
AI03A026	AI	03	37.2.1	I	A	7,60	VL	1	NZ
AI03A028	AI	03	37.2.1	I	A	7,60	VL	1	NZ
AI03A029	AI	03	37.2.1	I	A	7,60	VL	1	NZ
AI04A031	AI	04	37.2.1	I	A	6,80	GG	3	NZ
AI04A036	AI	04	37.2.1	I	A	6,80	GG	3	NZ
AI04A037	AI	04	37.2.1	I	A	6,80	GG	3	NZ
AI04A038	AI	04	37.2.1	I	A	6,80	GG	3	NZ
AI04A040	AI	04	37.2.1	I	A	6,80	GG	3	NZ
AI05A041	AI	05	37.2.1	I	A	7,50	VT	2	NZ
AI05A042	AI	05	37.2.1	I	A	7,50	VT	2	NZ
AI05A043	AI	05	37.2.1	I	A	7,50	VT	2	NZ
AI05A048	AI	05	37.2.1	I	A	7,50	VT	2	NZ
AI05A050	AI	05	37.2.1	I	A	7,50	VT	2	NZ
AI06A054	AI	06	37.1.3	I	A	7,00	GS	3	NZ
AI06A055	AI	06	37.1.3	I	A	7,00	GS	3	NZ
AI06A057	AI	06	37.1.3	I	A	7,00	GS	3	NZ
AI06A058	AI	06	37.1.3	I	A	7,00	GS	3	NZ
AI06A060	AI	06	37.1.3	I	A	7,00	GS	3	NZ
AI07A062	AI	07	37.3.1	T	A	4,40	GG	3	ES
AI07A064	AI	07	37.3.1	T	A	4,40	GG	3	ES
AI07A067	AI	07	37.3.1	T	A	4,40	GG	3	ES
AI07A069	AI	07	37.3.1	T	A	4,40	GG	3	ES
AI07A070	AI	07	37.3.1	T	A	4,40	GG	3	ES
AI08S072	AI	08	37.2.1	n.a.	S	29,70	0	0	0
AI08S074	AI	08	37.2.1	n.a.	S	29,70	0	0	0
AI08S075	AI	08	37.2.1	n.a.	S	29,70	0	0	0

AI08S077	AI	08	37.2.1	n.a.	S	29,70	0	0	0
AI08S080	AI	08	37.2.1	n.a.	S	29,70	0	0	0
AI09A082	AI	09	37.3.1	G	A	4,40	GG	3	ES
AI09A085	AI	09	37.3.1	G	A	4,40	GG	3	ES
AI09A086	AI	09	37.3.1	G	A	4,40	GG	3	ES
AI09A088	AI	09	37.3.1	G	A	4,40	GG	3	ES
AI09A089	AI	09	37.3.1	G	A	4,40	GG	3	ES
AI10A091	AI	10	37.1.3	I	A	31,90	VT	2	NZ
AI10A094	AI	10	37.1.3	I	A	31,90	VT	2	NZ
AI10A096	AI	10	37.1.3	I	A	31,90	VT	2	NZ
AI10A097	AI	10	37.1.3	I	A	31,90	VT	2	NZ
AI10A098	AI	10	37.1.3	I	A	31,90	VT	2	NZ
AI11A101	AI	11	37.3.1	T	A	4,40	GG	3	ES
AI11A102	AI	11	37.3.1	T	A	4,40	GG	3	ES
AI11A104	AI	11	37.3.1	T	A	4,40	GG	3	ES
AI11A106	AI	11	37.3.1	T	A	4,40	GG	3	ES
AI11A108	AI	11	37.3.1	T	A	4,40	GG	3	ES
AI12A112	AI	12	37.3.1	G	A	4,40	GG	3	ES
AI12A113	AI	12	37.3.1	G	A	4,40	GG	3	ES
AI12A116	AI	12	37.3.1	G	A	4,40	GG	3	ES
AI12A119	AI	12	37.3.1	G	A	4,40	GG	3	ES
AI12A120	AI	12	37.3.1	G	A	4,40	GG	3	ES
AI14S133	AI	14	37.1.2	n.a.	S	12,70	0	0	0
AI14S135	AI	14	37.1.2	n.a.	S	12,70	0	0	0
AI14S136	AI	14	37.1.2	n.a.	S	12,70	0	0	0
AI14S139	AI	14	37.1.2	n.a.	S	12,70	0	0	0
AI14S140	AI	14	37.1.2	n.a.	S	12,70	0	0	0
AI15A144	AI	15	37.1.3	I	A	5,00	GG	3	NZ
AI15A146	AI	15	37.1.3	I	A	5,00	GG	3	NZ
AI15A147	AI	15	37.1.3	I	A	5,00	GG	3	NZ
AI15A148	AI	15	37.1.3	I	A	5,00	GG	3	NZ
AI15A150	AI	15	37.1.3	I	A	5,00	GG	3	NZ
AI16A152	AI	16	37.2.2	I	A	6,00	GG	3	NZ
AI16A153	AI	16	37.2.2	I	A	6,00	GG	3	NZ
AI16A154	AI	16	37.2.2	I	A	6,00	GG	3	NZ
AI16A158	AI	16	37.2.2	I	A	6,00	GG	3	NZ
AI16A159	AI	16	37.2.2	I	A	6,00	GG	3	NZ
AI17S161	AI	17	37.1.3	n.a.	S	36,30	0	0	0
AI17S162	AI	17	37.1.3	n.a.	S	36,30	0	0	0
AI17S168	AI	17	37.1.3	n.a.	S	36,30	0	0	0
AI17S169	AI	17	37.1.3	n.a.	S	36,30	0	0	0
AI17S170	AI	17	37.1.3	n.a.	S	36,30	0	0	0

AI18A173	AI	18	37.1.3	I	A	8,00	GG	3	NZ
AI18A174	AI	18	37.1.3	I	A	8,00	GG	3	NZ
AI18A177	AI	18	37.1.3	I	A	8,00	GG	3	NZ
AI18A179	AI	18	37.1.3	I	A	8,00	GG	3	NZ
AI18A180	AI	18	37.1.3	I	A	8,00	GG	3	NZ
PE02A182	PE	02	37.2.1	C	A	5,50	GG	3	ES
PE02A185	PE	02	37.2.1	C	A	5,50	GG	3	ES
PE02A186	PE	02	37.2.1	C	A	5,50	GG	3	ES
PE02A188	PE	02	37.2.1	C	A	5,50	GG	3	ES
PE02A189	PE	02	37.2.1	C	A	5,50	GG	3	ES
PE10A192	PE	10	37.1.3	I	A	19,80	VT	2	NZ
PE10A193	PE	10	37.1.3	I	A	19,80	VT	2	NZ
PE10A195	PE	10	37.1.3	I	A	19,80	VT	2	NZ
PE10A199	PE	10	37.1.3	I	A	19,80	VT	2	NZ
PE10A200	PE	10	37.1.3	I	A	19,80	VT	2	NZ
PE01S202	PE	01	27	n.a.	S	27,50	0	0	0
PE01S203	PE	01	27	n.a.	S	27,50	0	0	0
PE01S204	PE	01	27	n.a.	S	27,50	0	0	0
PE01S207	PE	01	27	n.a.	S	27,50	0	0	0
PE01S208	PE	01	27	n.a.	S	27,50	0	0	0
PE14S211	PE	14	37.1.2	n.a.	S	29,70	0	0	0
PE14S212	PE	14	37.1.2	n.a.	S	29,70	0	0	0
PE14S214	PE	14	37.1.2	n.a.	S	29,70	0	0	0
PE14S216	PE	14	37.1.2	n.a.	S	29,70	0	0	0
PE14S217	PE	14	37.1.2	n.a.	S	29,70	0	0	0
PE06A221	PE	06	37.1.3	I	A	7,50	GS	3	NZ
PE06A222	PE	06	37.1.3	I	A	7,50	GS	3	NZ
PE06A223	PE	06	37.1.3	I	A	7,50	GS	3	NZ
PE06A226	PE	06	37.1.3	I	A	7,50	GS	3	NZ
PE06A229	PE	06	37.1.3	I	A	7,50	GS	3	NZ
PE12A231	PE	12	37.3.1	G	A	5,50	GG	3	ES
PE12A234	PE	12	37.3.1	G	A	5,50	GG	3	ES
PE12A235	PE	12	37.3.1	G	A	5,50	GG	3	ES
PE12A237	PE	12	37.3.1	G	A	5,50	GG	3	ES
PE12A238	PE	12	37.3.1	G	A	5,50	GG	3	ES
PE08S241	PE	08	37.2.1	n.a.	S	34,10	0	0	0
PE08S243	PE	08	37.2.1	n.a.	S	34,10	0	0	0
PE08S244	PE	08	37.2.1	n.a.	S	34,10	0	0	0
PE08S246	PE	08	37.2.1	n.a.	S	34,10	0	0	0
PE08S247	PE	08	37.2.1	n.a.	S	34,10	0	0	0
PE04A252	PE	04	37.2.1	I	A	7,10	GG	3	NZ
PE04A253	PE	04	37.2.1	I	A	7,10	GG	3	NZ
PE04A254	PE	04	37.2.1	I	A	7,10	GG	3	NZ
PE04A255	PE	04	37.2.1	I	A	7,10	GG	3	NZ

PE04A258	PE	04	37.2.1	I	A	7,10	GG	3	NZ
PE05A264	PE	05	37.2.1	I	A	7,50	VT	2	NZ
PE05A265	PE	05	37.2.1	I	A	7,50	VT	2	NZ
PE05A266	PE	05	37.2.1	I	A	7,50	VT	2	NZ
PE05A267	PE	05	37.2.1	I	A	7,50	VT	2	NZ
PE05A269	PE	05	37.2.1	I	A	7,50	VT	2	NZ
PE13S272	PE	13	37.2.1	n.a.	S	38,50	0	0	0
PE13S274	PE	13	37.2.1	n.a.	S	38,50	0	0	0
PE13S275	PE	13	37.2.1	n.a.	S	38,50	0	0	0
PE13S276	PE	13	37.2.1	n.a.	S	38,50	0	0	0
PE13S277	PE	13	37.2.1	n.a.	S	38,50	0	0	0
PE15A281	PE	15	37.1.3	I	A	5,50	GG	3	NZ
PE15A282	PE	15	37.1.3	I	A	5,50	GG	3	NZ
PE15A283	PE	15	37.1.3	I	A	5,50	GG	3	NZ
PE15A285	PE	15	37.1.3	I	A	5,50	GG	3	NZ
PE15A289	PE	15	37.1.3	I	A	5,50	GG	3	NZ
PE07A291	PE	07	37.3.1	T	A	5,50	GG	3	ES
PE07A293	PE	07	37.3.1	T	A	5,50	GG	3	ES
PE07A295	PE	07	37.3.1	T	A	5,50	GG	3	ES
PE07A296	PE	07	37.3.1	T	A	5,50	GG	3	ES
PE07A298	PE	07	37.3.1	T	A	5,50	GG	3	ES
PE16A301	PE	16	37.2.2	I	A	6,50	GG	3	NZ
PE16A302	PE	16	37.2.2	I	A	6,50	GG	3	NZ
PE16A303	PE	16	37.2.2	I	A	6,50	GG	3	NZ
PE16A308	PE	16	37.2.2	I	A	6,50	GG	3	NZ
PE16A309	PE	16	37.2.2	I	A	6,50	GG	3	NZ
PE17S311	PE	17	37.1.3	n.a.	S	36,30	0	0	0
PE17S313	PE	17	37.1.3	n.a.	S	36,30	0	0	0
PE17S314	PE	17	37.1.3	n.a.	S	36,30	0	0	0
PE17S315	PE	17	37.1.3	n.a.	S	36,30	0	0	0
PE17S319	PE	17	37.1.3	n.a.	S	36,30	0	0	0
PE03A321	PE	03	37.2.1	I	A	8,00	VL	1	NZ
PE03A323	PE	03	37.2.1	I	A	8,00	VL	1	NZ
PE03A324	PE	03	37.2.1	I	A	8,00	VL	1	NZ
PE03A327	PE	03	37.2.1	I	A	8,00	VL	1	NZ
PE03A330	PE	03	37.2.1	I	A	8,00	VL	1	NZ

DOCUMENTO ALLEGATO N. II.4

DOCUMENTAZIONE FOTOGRAFICA RELATIVA ALLA PROCEDURA OPERATIVA STANDARD SEGUITA PER LA LAVORAZIONE DELLE SPIGOLE E LA PREPARAZIONE DEI CAMPIONI DI ANALISI (in 13 steps)

1. Rilevazione del peso e della lunghezza



2. Eviscerazione

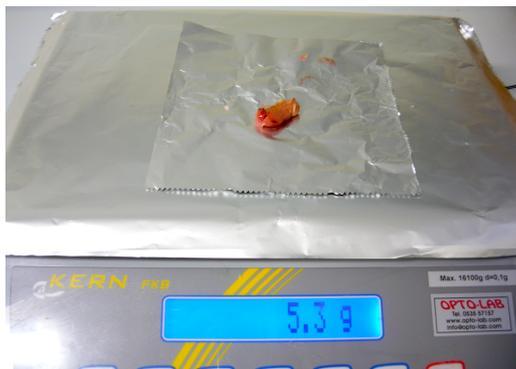


3. Rilevazione del peso del pacchetto viscerale



(continua)

4. Rilevazione del peso del fegato



5. Rilevazione del peso delle gonadi (se presenti)



6. Rilevazione del grasso periviscerale



(continua Documento Allegato n. II.4)

7. Rilevazione del peso del pesce eviscerato



8. Ottenimento dei filetti con pelle (1)



9. Ottenimento dei filetti con pelle (2)

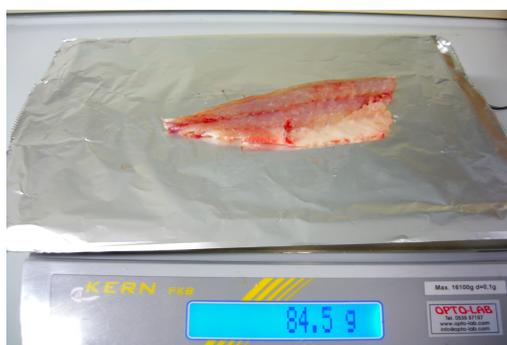


(continua)

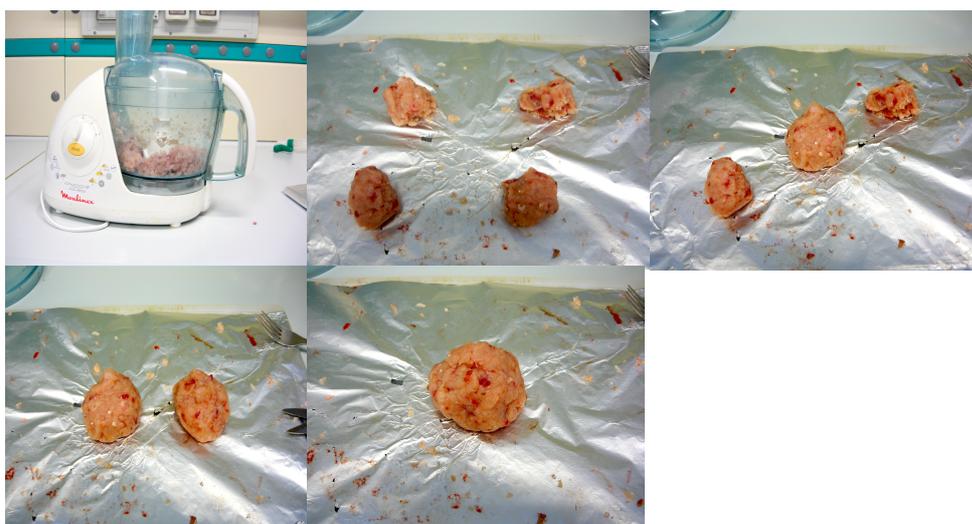
10. Rilevazione del peso dei filetti con pelle



11. Rilevazione del peso dei filetti senza pelle



12. Macinazione e *quartering* dell'omogenato



13. Preparazione di aliquote e identificazione dei campioni di analisi



DOCUMENTO ALLEGATO N. II.5a

Concentrazione certificata (o di riferimento) in nutrienti dello Standard Reference Material (SRM) noto come **Lake Superior Fish Tissue** (NIST 1946) e livelli di presenza di quegli stessi nutrienti accertati in questo studio (dati espressi sul tal quale, $n = 3$, analisi effettuate in doppio, media ± 95 % intervallo di confidenza, CI).

Nutriente	Unità di misura	Valore certificato o (di riferimento)	Questo studio
<i>Sostanza secca</i>	<i>g/100 g (sul tal quale)</i>	<i>(28,6 \pm 0,1)</i>	<i>28,63 \pm 0,08</i>
<i>Protidi grezzi</i>	“	<i>(17,8 \pm 0,2)</i>	<i>17,91 \pm 0,50</i>
<i>Lipidi</i>	“	<i>10,17 \pm 0,48</i>	<i>10,41 \pm 0,25</i>
<i>Ceneri</i>	“	<i>(1,10 \pm 0,04)</i>	<i>1,12 \pm 0,14</i>
<i>C14:0</i>	<i>% (come trigliceridi)</i>	<i>0,316 \pm 0,009</i>	<i>0,217 \pm 0,023</i>
<i>C15:0</i>	“	<i>(0,0285 \pm 0,0016)</i>	<i>0,0259 \pm 0,023</i>
<i>C16:0</i>	“	<i>1,22 \pm 0,04</i>	<i>1,20 \pm 0,081</i>
<i>C16:1</i>	“	<i>0,816 \pm 0,026</i>	<i>0,717 \pm 0,054</i>
<i>C18:0</i>	“	<i>0,263 \pm 0,011</i>	<i>0,265 \pm 0,021</i>
<i>C18:1 n-9</i>	“	<i>2,64 \pm 0,08</i>	<i>2,67 \pm 0,188</i>
<i>C18:1 n-7</i>	“	<i>(0,373 \pm 0,005)</i>	<i>0,376 \pm 0,026</i>
<i>C18:2 n-6</i>	“	<i>0,348 \pm 0,023</i>	<i>0,367 \pm 0,024</i>
<i>C18:3 n-3</i>	“	<i>0,221 \pm 0,025</i>	<i>0,217 \pm 0,015</i>
<i>C18:4 n-3</i>	“	<i>(0,106 \pm 0,013)</i>	<i>0,094 \pm 0,007</i>
<i>C20:1 n-9</i>	“	<i>0,132 \pm 0,012</i>	<i>0,138 \pm 0,012</i>
<i>C20:2 n-6</i>	“	<i>0,0990 \pm 0,0043</i>	<i>0,111 \pm 0,011</i>
<i>C20:4 n-6</i>	“	<i>(0,212 \pm 0,019)</i>	<i>0,224 \pm 0,016</i>
<i>C20:5 n-3 (EPA)</i>	“	<i>0,296 \pm 0,019</i>	<i>0,327 \pm 0,026</i>
<i>C22:1 n-9</i>	“	<i>(0,0266 \pm 0,0060)</i>	<i>0,0188 \pm 0,002</i>
<i>C22:2 n-6</i>	“	<i>(0,0369 \pm 0,0011)</i>	<i>0,0337 \pm 0,0035</i>
<i>C22:5 n-3 (DPA)</i>	“	<i>0,335 \pm 0,026</i>	<i>0,336 \pm 0,028</i>
<i>C22:6 n-3 (DHA)</i>	“	<i>0,92 \pm 0,10</i>	<i>0,99 \pm 0,10</i>
<i>Sodio (Na)</i>	<i>mg/kg (sul tal quale)</i>	<i>(458 \pm 25)</i>	<i>446 \pm 5</i>
<i>Potassio (K)</i>	“	<i>(3330 \pm 180)</i>	<i>3336 \pm 4</i>
<i>Magnesio (Mg)</i>	“	<i>(226 \pm 18)</i>	<i>230 \pm 2</i>
<i>Calcio (Ca)</i>	“	<i>(59,1 \pm 1,5)</i>	<i>60,4 \pm 0,1</i>
<i>Fosforo (P)</i>	“	<i>(1980 \pm 40)</i>	<i>2000 \pm 12</i>
<i>Ferro (Fe)</i>	“	<i>4,00 \pm 0,32</i>	<i>4,03 \pm 0,22</i>
<i>Zinco (Zn)</i>	“	<i>(3,10 \pm 0,18)</i>	<i>3,17 \pm 0,05</i>

Nella pagina successiva si riportano i risultati emersi dalle analisi dello Standard Reference Material *Meat Homogenate* (NIST 1546) (Allegato n. 5 b) e da quelle del Certified Reference Material *Dogfish Muscle* (DORM-2) (Allegato n. 5 c)

DOCUMENTO ALLEGATO n. II.5b

Concentrazione certificata (o di riferimento) in nutrienti dello Standard Reference Material (SRM) noto come *Meat Homogenate* (NIST 1546) e livelli di presenza di quegli stessi nutrienti accertati in questo studio (dati espressi sul tal quale, n = 3, analisi effettuate in doppio, media \pm 95 % intervallo di confidenza, CI).

<i>Nutriente</i>	Unità di misura	Valore certificato o (di riferimento)	<i>Questo studio</i>
<i>Sodio (Na)</i>	<i>mg/kg (sul tal quale)</i>	9990 \pm 716	9991 \pm 0,98
<i>Potassio (K)</i>	“	(2460 \pm 160)	2459 \pm 0,51
<i>Magnesio (Mg)</i>	“	(165 \pm 12)	165 \pm 0,11
<i>Calcio (Ca)</i>	“	323 \pm 28	322 \pm 1,25
<i>Fosforo (P)</i>	“	(1540 \pm 110)	1540 \pm 0,39
<i>Ferro (Fe)</i>	“	11,4 \pm 1,0	11,3 \pm 0,18
<i>Zinco (Zn)</i>	“	(18,5 \pm 1,6)	18,5 \pm 0,48
<i>Rame (Cu)</i>	“	(0,93 \pm 0,18)	0,91 \pm 0,01
<i>Manganese (Mn)</i>	“	(0,292 \pm 0,044)	0,294 \pm 0,05

DOCUMENTO ALLEGATO n. II.5c

Concentrazione certificata in nutrienti del Certified Reference Material (CRM) noto come *Dogfish Muscle* (DORM-2) e livelli di presenza di quegli stessi nutrienti accertati in questo studio (dati espressi sul tal quale, n = 3, analisi effettuate in doppio, media \pm 95 % intervallo di confidenza, CI).

<i>Nutriente</i>	Unità di misura	Valore certificato	<i>Questo studio</i>
<i>Ferro (Fe)</i>	<i>mg/kg (sul tal quale)</i>	142 \pm 10	133 \pm 16)
<i>Zinco (Zn)</i>	“	25,6 \pm 2,3	25,1 \pm 0,36)
<i>Rame (Cu)</i>	“	2,34 \pm 5,5	2,34 \pm 0,05)
<i>Manganese (Mn)</i>	“	3,66 \pm 0,34	3,61 \pm 0,11
<i>Selenio (Se)</i>	“	1,40 \pm 0,09	1,42 \pm 0,05
<i>Cromo (Cr)</i>	“	34,7 \pm 5,5	34,4 \pm 0,65
<i>Nickel (Ni)</i>	“	19,4 \pm 3,1	18,8 \pm 0,57
<i>Cobalto (Co)</i>	“	0,182 \pm 0,031	0,177 \pm 0,01
<i>Arsenico (As)</i>	“	18,0 \pm 1,1	18,9 \pm 0,53
<i>Cadmio (Cd)</i>	“	0,043 \pm 0,008	0,044 \pm 0,002
<i>Mercurio (Hg)</i>	“	4,64 \pm 0,26	5,56 \pm 0,09
<i>Piombo (Pb)</i>	“	0,065 \pm 0,007	0,064 \pm 0,004

DOCUMENTO ALLEGATO N. II.6

VARIABILI CONTEMPLATE PER LA CARATTERIZZAZIONE MORFOMETRICA DI OGNI ESEMPLARE

Lunghe	Valore numerico relativo alla lunghezza totale dell'esemplare espressa in cm e calcolato come la distanza dall'estremità anteriore della testa, all'estremità posteriore del lobo dorsale della pinna caudale
PesoCorp	Valore numerico relativo al peso corporeo dell'esemplare, espresso in g
PesoEvis	Valore numerico relativo al peso dell'esemplare eviscerato, espresso in g
Visceri	Valore numerico relativo al peso dei visceri, espresso in g
Fegato	Valore numerico relativo al peso del fegato, espresso in g
Gonadi	Valore numerico relativo al peso delle gonadi, espresso in g
GrassoPV	Valore numerico relativo al peso del grasso periviscerale, espresso in g
Sesso	Codice alfabetico relativo al sesso dell'esemplare: M per machio; F per femmina. Lo 0 indica un esemplare di cui non è stato possibile determinare il sesso
FilSkiSn	Valore numerico relativo al peso del filetto sinistro con pelle, espresso in g
FilSkiDx	Valore numerico relativo al peso del filetto destro con pelle, espresso in g
FilPulSn	Valore numerico relativo al peso del filetto sinistro senza pelle, espresso in g
FilPulDx	Valore numerico relativo al peso del filetto destro senza pelle, espresso in g
Pellex2	Valore numerico relativo al peso della pelle di entrambi i filetti, espresso in g
<i>Frame</i>	Valore numerico relativo al peso della carcassa (i.e., quanto rimane dopo l'asportazione dei filetti), espresso in g
CondFact	Indice di condizione: rapporto percentuale tra il peso corporeo dell'esemplare e la sua lunghezza totale elevata al cubo
ResaEvisc	Resa di eviscerazione: rapporto percentuale tra il peso dell'esemplare eviscerato e il suo peso corporeo
ViscInd	Indice viscerico-somatico: rapporto percentuale tra il peso dei visceri e il peso corporeo
EpatoInd	Indice epato-somatico: rapporto percentuale tra il peso del fegato e il peso corporeo
GonadInd	Indice gonado-somatico: rapporto percentuale tra il peso delle gonadi e il peso corporeo
FatPC	Indice grasso periviscerale: rapporto percentuale tra il peso del grasso periviscerale e il peso corporeo
FilSkiYi	Incidenza percentuale della somma dei filetti con pelle sul peso corporeo
FilPulYi	Incidenza percentuale della somma dei filetti senza pelle sul peso corporeo
<i>Frame</i> PC	Incidenza percentuale del <i>frame</i> sul peso corporeo
PellePC	Incidenza percentuale della pelle dei due filetti sul peso corporeo

(continua Documento Allegato N.II. 6)

CaloEvis	Calo peso percentuale connesso alle operazioni di eviscerazione = $[\text{Peso corporeo} - (\text{peso eviscerato} + \text{visceri}) * 100] / \text{peso corporeo}, \%$
CaloSfil	Calo peso percentuale connesso alle operazioni di sfiletta mento = $[\text{Peso eviscerato} - (\text{Filetto sinistro con pelle e lische} + \text{Filetto destro con pelle e lische} + \text{Frame}) * 100] / \text{peso eviscerato}, \%$
CalSpeDe	Calo peso percentuale connesso alle operazioni di asportazione della pelle e delle lische = $\{[(\text{Filetto sinistro con pelle e lische} + \text{Filetto destro con pelle e lische}) - (\text{Filetto sinistro senza pelle né lische} + \text{Filetto destro senza pelle né lische})] * 100\} / (\text{Filetto sinistro con pelle e lische} + \text{Filetto destro con pelle e lische}), \%$

DOCUMENTO ALLEGATO N. II.7

VARIABILI CONTEMPLETE PER LA CARATTERIZZAZIONE DI OGNI ESEMPLARE IN BASE AL TENORE IN UMIDITÀ E IN LIPIDI TOTALI DELLA POLPA, NONCHÉ ALLA LORO COMPOSIZIONE ACIDICA

Umidità = tenore in acqua della polpa (% t.q. = % tal quale polpa = g/100 g eduli)

Lipidi totali = tenore medio in lipidi totali (% t.q.)

C 14:0 = tenore medio in acido miristico della polpa (% LT)

C 16:0 = tenore medio in acido palmitico della polpa (% LT)

C 17:0 = tenore medio in acido margarico della polpa (% LT)

C 18:0 = tenore medio in acido stearico della polpa (% LT)

Σ a.g. saturi (Σ SFA) = tenore in acidi grassi saturi della polpa (% LT)

C 16:1 n-7 = tenore medio in acido palmitoleico della polpa (% LT)

C 18:1 n-9 = tenore medio in acido palmitoleico della polpa (% LT)

C 18:1 n-7 = tenore medio in acido vaccenico della polpa (% LT)

C 20:1 n-9 = tenore medio in acido gondoico della polpa (% LT)

C 20:1 n-7 = tenore medio in acido 13-eicosanoico della polpa (% LT)

C 22:1 n-11 = tenore medio di acido cetoleico della polpa (% LT)

Σ a.g. monoinsaturi (Σ MUFA) = tenore in acidi grassi monoinsaturi della polpa (% LT)

C 18:2 n-6 (LA) = tenore medio in acido linoleico (LA) della polpa (% LT)

C 20:2 n-6 = tenore medio in acido 11,14-eicosadienoico della polpa (% LT)

C 20:4 n-6 (ARA) = tenore medio in acido arachidonico della polpa (% LT)

C 22:4 n-6 = tenore medio in acido docosatetraenoico della polpa (% LT)

C 22:5 n-6 = tenore medio in acido 4,7,10,13,16-docosapentaenoico della polpa (% LT)

C 18:3 n-3 (ALA) = tenore medio in acido linolenico (ALA) della polpa (% LT)

C 18:4 n-3 = tenore medio in acido stearidonico della polpa (% LT)

C 20:4 n-3 = tenore medio in acido eicosatetraenoico della polpa (% LT)

C 20:5 n-3 (EPA) = tenore medio in acido eicosapentaenoico (EPA) della polpa (% LT)

C 22:5 n-3 = tenore medio in acido docosapentaenoico (DPA) della polpa (% LT)

C 22:6 n-3 (DHA) = tenore medio in acido docosaesaenoico (DHA) della polpa (% LT)

Σ a.g. polinsaturi (Σ PUFA) = tenore in acidi grassi polinsaturi della polpa (% LT)

N.I. = tenore di acidi grassi non identificati della polpa (% LT)

EPA + DHA = somma del tenore in EPA e in DHA nei lipidi totali della polpa

EPA / DHA = rapporto fra il tenore in EPA e in DHA nei lipidi totali della polpa

DHA / EPA = rapporto fra il tenore in DHA e in EPA nei lipidi totali della polpa

Σ C 20:1 + Σ C 22:1 = somma del tenore in monoinsaturi a 20 e a 22 C nei lipidi totali della polpa

ARA / EPA = rapporto fra il tenore in ARA e in EPA nei lipidi totali della polpa

EPA / ARA = rapporto fra il tenore in EPA e in DHA nei lipidi totali della polpa

DOCUMENTO ALLEGATO N. II.8

VARIABILI CONTEMPLATE PER LA CARATTERIZZAZIONE DI OGNI ESEMPLARE IN BASE ALLA COMPOSIZIONE ACIDICA DEI LIPIDI NEUTRI

- N 14:0 = tenore medio in acido miristico della polpa (% LN)
- N 16:0 = tenore medio in acido palmitico della polpa (% LN)
- N 17:0 = tenore medio in acido margarico della polpa (% LN)
- N 18:0 = tenore medio in acido stearico della polpa (% LN)
- N_Σ SFA = tenore in acidi grassi saturi della polpa (% LN)
- N 16:1 n-7 = tenore medio in acido palmitoleico della polpa (% LN)
- N 18:1 n-9 = tenore medio in acido palmitoleico della polpa (% LN)
- N 18:1 n-7 = tenore medio in acido vaccenico della polpa (% LN)
- N 20:1 n-9 = tenore medio in acido gondoico della polpa (% LN)
- N 20:1 n-7 = tenore medio in acido 13-eicosanoico della polpa (% LN)
- N 22:1 n-11 = tenore medio di acido cetoleico della polpa (% LN)
- N_Σ MUFA = tenore in acidi grassi monoinsaturi della polpa (% LN)
- N 18:2 n-6 (LA) = tenore medio in acido linoleico (LA) della polpa (% LN)
- N 20:2 n-6 = tenore medio in acido 11,14-eicosadienoico della polpa (% LN)
- N 20:4 n-6 (ARA) = tenore medio in acido arachidonico della polpa (% LN)
- N 22:4 n-6 = tenore medio in acido docosatetraenoico della polpa (% LN)
- N 22:5 n-6 = tenore medio in acido 4,7,10,13,16-docosapentaenoico della polpa (% LN)
- N_Σ PUFA n-6 = tenore in acidi grassi polinsaturi della serie n-6 della polpa (% LN)
- N 18:3 n-3 (ALA) = tenore medio in acido linolenico (ALA) della polpa (% LN)
- N 18:4 n-3 = tenore medio in acido stearidonico della polpa (% LN)
- N 20:4 n-3 = tenore medio in acido eicosatetraenoico della polpa (% LN)
- N 20:5 n-3 (EPA) = tenore medio in acido eicosapentaenoico (EPA) della polpa (% LN)
- N 22:5 n-3 = tenore medio in acido docosapentaenoico (DPA) della polpa (% LN)

(continua Documento Allegato N. II.8)

N_{22:6 n-3} (DHA) = tenore medio in acido docosaesaenoico (DHA) della polpa (% LN)

N_{Σ PUFA n-3} = tenore in acidi grassi polinsaturi della serie n-3 della polpa (% LN)

N_{Σ PUFA} = tenore in acidi grassi polinsaturi della polpa (% LN)

N_{N.I.} = tenore di acidi grassi non identificati della polpa (% LN)

N_{Σ PUFA} / Σ SFA = rapporto tra acidi grassi polinsaturi e acidi grassi saturi nei lipidi neutri della polpa

N_{Σ MUFA} / Σ SFA = rapporto tra acidi grassi monoinsaturi e saturi nei lipidi neutri della polpa

N_{Σ n-3} / Σ n-6 = rapporto tra acidi grassi polinsaturi della serie n-3 e acidi grassi polinsaturi della serie n-6 nei lipidi neutri della polpa

N_{Σ n-6} / Σ n-3 = rapporto tra acidi grassi polinsaturi della serie n-6 e acidi grassi polinsaturi della serie n-3 nei lipidi neutri della polpa

N_{EPA + DHA} = somma del tenore in EPA e in DHA nei lipidi neutri della polpa

N_{EPA} / DHA = rapporto fra il tenore in EPA e in DHA nei lipidi neutri della polpa

N_{DHA} / EPA = rapporto fra il tenore in DHA e in EPA nei lipidi neutri della polpa

N_{Σ C 20:1 + Σ C 22:1} = somma del tenore in monoinsaturi a 20 e a 22 C nei lipidi neutri della polpa

N_{ARA} / EPA = rapporto fra il tenore in ARA e in EPA nei lipidi neutri della polpa

N_{EPA} / ARA = rapporto fra il tenore in EPA e in DHA nei lipidi neutri della polpa

N_{LA} / ARA = rapporto fra il tenore in LA e ARA nei lipidi neutri della polpa

N_{LA} / ALA = rapporto fra il tenore in LA e ALA nei lipidi neutri della polpa

DOCUMENTO ALLEGATO N. II.9

VARIABILI CONTEMPLETE PER LA CARATTERIZZAZIONE DI OGNI ESEMPLARE IN BASE ALLA COMPOSIZIONE ACIDICA DEI LIPIDI POLARI

- P 14:0 = tenore medio in acido miristico della polpa (% LP)
- P 16:0 = tenore medio in acido palmitico della polpa (% LP)
- P 17:0 = tenore medio in acido margarico della polpa (% LP)
- P 18:0 = tenore medio in acido stearico della polpa (% LP)
- P_Σ SFA = tenore in acidi grassi saturi della polpa (% LP)
- P 16:1 n-7 = tenore medio in acido palmitoleico della polpa (% LP)
- P 18:1 n-9 = tenore medio in acido palmitoleico della polpa (% LP)
- P 18:1 n-7 = tenore medio in acido vaccenico della polpa (% LP)
- P 20:1 n-9 = tenore medio in acido gondoico della polpa (% LP)
- P 20:1 n-7 = tenore medio in acido 13-eicosaenoico della polpa (% LP)
- P 22:1 n-11 = tenore medio di acido cetoleico della polpa (% LP)
- P_Σ MUFA = tenore in acidi grassi monoinsaturi della polpa (% LP)
- P 18:2 n-6 (LA) = tenore medio in acido linoleico (LA) della polpa (% LP)
- P 20:2 n-6 = tenore medio in acido 11,14-eicosadienoico della polpa (% LP)
- P 20:4 n-6 (ARA) = tenore medio in acido arachidonico della polpa (% LP)
- P 22:4 n-6 = tenore medio in acido docosatetraenoico della polpa (% LP)
- P 22:5 n-6 = tenore medio in acido 4,7,10,13,16-docosapentaenoico della polpa (% LP)
- P_Σ PUFA n-6 = tenore in acidi grassi polinsaturi della serie n-6 della polpa (% LP)
- P 18:3 n-3 (ALA) = tenore medio in acido linolenico (ALA) della polpa (% LP)
- P 18:4 n-3 = tenore medio in acido stearidonico della polpa (% LP)
- P 20:4 n-3 = tenore medio in acido eicosatetraenoico della polpa (% LP)
- P 20:5 n-3 (EPA) = tenore medio in acido eicosapentaenoico (EPA) della polpa (% LP)

P_{22:5 n-3} = tenore medio in acido docosapentaenoico (DPA) della polpa (% LP)

P_{22:6 n-3 (DHA)} = tenore medio in acido docosaesaenoico (DHA) della polpa (% LP)

P_{Σ PUFA n-3} = tenore in acidi grassi polinsaturi della serie n-3 della polpa (% LP)

P_{Σ PUFA} = tenore in acidi grassi polinsaturi della polpa (% LP)

P_{N.I.} = tenore di acidi grassi non identificati della polpa (% LP)

P_{Σ PUFA / Σ SFA} = rapporto tra acidi grassi polinsaturi e acidi grassi saturi nei lipidi polari della polpa

P_{Σ MUFA / Σ SFA} = rapporto tra acidi grassi monoinsaturi e acidi grassi saturi nei lipidi polari della polpa

P_{Σ n-3 / Σ n-6} = rapporto tra acidi grassi polinsaturi della serie n-3 e acidi grassi polinsaturi della serie n-6 nei lipidi polari della polpa

P_{Σ n-6 / Σ n-3} = rapporto tra acidi grassi polinsaturi della serie n-6 e acidi grassi polinsaturi della serie n-3 nei lipidi polari della polpa

P_{EPA + DHA} = somma del tenore in EPA e in DHA nei lipidi polari della polpa

P_{EPA / DHA} = rapporto fra il tenore in EPA e in DHA nei lipidi polari della polpa

P_{DHA / EPA} = rapporto fra il tenore in DHA e in EPA nei lipidi polari della polpa

P_{Σ C 20:1 + Σ C 22:1} = somma del tenore in monoinsaturi a 20 e a 22 C nei lipidi polari della polpa

P_{ARA / EPA} = rapporto fra il tenore in ARA e in EPA nei lipidi polari della polpa

P_{EPA / ARA} = rapporto fra il tenore in EPA e in DHA nei lipidi polari della polpa

P_{LA / ARA} = rapporto fra il tenore in LA e ARA nei lipidi polari della polpa

P_{LA / ALA} = rapporto fra il tenore in LA e ALA nei lipidi polari della polpa

DOCUMENTO ALLEGATO N. II.10

VARIABILI CONTEMPLETE PER LA CARATTERIZZAZIONE DI OGNI ESEMPLARE IN BASE ALLA COMPOSIZIONE ELEMENTALE E ALLE ABBONDANZE ISOTOPICHE RELATIVE

Macroelementi

Sodio	=	tenore in sodio contenuto nella polpa (mg/kg t.q.)
Potassio	=	tenore in potassio contenuto nella polpa (mg/kg t.q.)
Calcio	=	tenore in calcio contenuto nella polpa (mg/kg t.q.)
Magnesio	=	tenore in magnesio contenuto nella polpa (mg/kg t.q.)
Fosforo	=	tenore in fosforo contenuto nella polpa (mg/kg t.q.)
Zolfo	=	tenore in zolfo contenuto nella polpa (mg/kg t.q.)

Elementi traccia

Zinco	=	tenore in zinco contenuto nella polpa (mg/kg t.q.)
Ferro	=	tenore in ferro contenuto nella polpa (mg/kg t.q.)
Rame	=	tenore in rame contenuto nella polpa (mg/kg t.q.)
Manganese	=	tenore in manganese contenuto nella polpa (mg/kg t.q.)
Selenio	=	tenore in selenio contenuto nella polpa (mg/kg t.q.)
Cromo	=	tenore in cromo contenuto nella polpa (mg/kg t.q.)
Cobalto	=	tenore in cobalto contenuto nella polpa (mg/kg t.q.)
Nickel	=	tenore in nickel contenuto nella polpa (mg/kg t.q.)

Elementi tossici

Arsenico	=	tenore in arsenico contenuto nella polpa (mg/kg t.q.)
Cadmio	=	tenore in cadmio contenuto nella polpa (mg/kg t.q.)
Mercurio	=	tenore in mercurio contenuto nella polpa (mg/kg t.q.)
Piombo	=	tenore in piombo contenuto nella polpa (mg/kg t.q.)

(continua)

(continua allegato II.10)

Incidenza % di:

Carbonio = concentrazione di carbonio nella polpa (g/100 g)

Azoto = concentrazione di azoto nella polpa (g/100 g)

Rapporti isotopici stabili

$\delta^{13}\text{C}$ ‰ vs V-PDB = tenore in isotopo stabile ^{13}C espressa in ‰

$\delta^{15}\text{N}$ ‰ vs air = tenore in isotopo stabile ^{15}N espressa in ‰

DOCUMENTO ALLEGATO N. II.11

Significatività statistica (P-value) del contributo predittivo fornito da ciascun parametro morfometrico (in peso e in % peso corporeo) in relazione al metodo di produzione per tutti gli esemplari (Met_Prod, n = 160), alla zona FAO di cattura per gli esemplari selvaggi (FAO zone, n = 45), al Paese di origine per gli esemplari allevati (Country, n = 115), alla "Intensità" per tutti gli esemplari (Intensity, n = 160)

Parametro	Met_Prod	FAO_zone	Country	Intensity
Lunghezza, cm	2,23E-15	0.16084	5,24E-03	2,45E-18
Peso corporeo, g	2,11E-11	0.0150875	1,10E-01	1,06E-15
Peso eviscerato, g	3,68E-11	0.0268466	4,29E-02	6,03E-15
Visceri, g	3,13E-05	0.00464313	0.00105622	5,47E-10
Fegato, g	0.00865584	0.0149079	0.011072	1,27E-05
Gonadi, g	0.0599014	0.907319	0.00923959	0.00110849
Grasso periviscerale, g	0.82094	0.00111702	0.000250785	0.038129
Filetto con pelle, sinistro, g	1,51E-11	0.0218632	1,15E-01	2,22E-14
Filetto con pelle, destro, g	2,69E-12	0.0320583	9,67E-02	3,75E-14
Filetto spellato , sinistro, g	2,11E-13	0.0217862	1,05E-01	7,50E-15
Filetto spellato , destro, g	1,35E-11	0.033771	9,00E-02	2,63E-14
Pelle dei filetti, g	2,52E-05	0.0179059	0.00105916	1,50E-08
"Frame" (scheletro, pinne, ecc.), g	1,38E-11	0.0340166	1,03E-02	2,28E-15
Fattore di condizione, g/cm ³	0.455872	5,79E-05	0.0531227	0.000212296
Resa di eviscerazione, %	0.813997	0.103241	0.0148675	0.403204
Indice viscerale, %	0.807634	0.111783	0.00534227	0.65908
Indice epatosomatico, %	1,09E-02	0.216989	0.348263	7,05E-01
Indice gonadosomatico, %	0.698104	0.708288	0.0553297	0.267278
Grasso periviscerale, %	4,79E-05	0.039602	2,33E-04	0.000151203
Resa in filetti con pelle, %	0.09254	0.00608971	0.0477787	1,98E-02
Resa in filetti senza pelle, %	0.525105	0.000602652	0.0737086	5,43E-03
Frame, %	0.0281393	0.180473	0.0723667	7,80E-03
Pelle dei filetti, %	7,30E-01	0.207676	0.0806966	1,49E-05
Calo peso di eviscerazione, %	0.978576	0.109187	0.985592	0.165226
Calo peso di sfilettamento, %	0.142635	0.22668	0.42667	0.0668385
Calo per elimin. pelle e lische, %	0.000588606	0.0891301	0.725495	6,75E-03

DOCUMENTO ALLEGATO N. II.12

Significatività statistica (P-value) del contributo predittivo fornito individualmente dalla umidità della polpa (g/100 g eduli), dal tenore in lipidi totali della stessa (g/100 g eduli) e da ciascuna voce della composizione acidica dei lipidi totali (% FAME) in relazione al metodo di produzione per tutti gli esemplari (Met_Prod, n = 160), alla zona FAO di cattura per gli esemplari selvaggi (FAO zone, n = 45), al Paese di origine per gli esemplari allevati (Country, n = 115), alla "Intensità" per tutti gli esemplari (Intensity, n = 160)

Parametro	Met_Prod	FAO_zone	Country	Intensity
Umidità, %	0	3,66E-07	0.000472748	1,31E-18
Lipidi, %	0	8,55E-07	0.000247596	1,88E-16
C14:00	3,35E-27	5,63E-05	0.013067	3,16E-25
C15:0	1,05E-05	0.00293258	0.145724	1,23E-46
C16:0	2,85E-39	0.00256987	2,43E-05	6,12E-46
C16:1 n-7	0,000388632	0.000613419	0.00012338	1,66E-15
C17:0	0	2,42E-05	0.000143332	4,65E-15
C18:0	5,98E-35	3,22E-05	3,69E-05	3,50E-32
C18:1 n-9	0,131778	0.182399	3,05E-09	7,12E-05
C18:1 n-7	0,00272086	0.373721	0.0828487	3,83E-06
C18:2 n-6 (LA)	2,15E-37	5,98E-11	0.0328305	3,69E-52
C18:3 n-3 (ALA)	6,18E-35	0.153985	1,44E-04	5,25E-43
C18:4 n-3	1,34E-10	0.0662214	0.00148302	1,23E-04
C20:1 n-9	1,11E-05	0.00898117	4,52E-09	2,23E-04
C20:1 n-7	2,11E-06	0.0916148	0.27469	5,24E-04
C20:2 n-6	0	1,86E-05	0.0189447	6,62E-18
C20:4 n-6 (ARA)	5,48E-26	0.00156813	0.178435	1,28E-29
C20:4 n-3	1,15E-12	0.414902	4,56E-10	2,03E-08
C20:5 n-3 (EPA)	0,746585	0.442918	1,12E-04	0.00403756
C22:1 n-11	0,0126988	0.0284529	6,49E-03	0.00109977
C22:4 n-6	1,00E-29	0.0059056	0.358872	1,85E-35
C22:5 n-6	4,41E-27	0.00184809	0.247636	4,34E-42
C22:5 n-3	0,020654	0.726291	0.712063	7,65E-05
C22:6 n-3 (DHA)	6,75E-10	0.0206346	0.225735	1,73E-07
Somma acidi grassi saturi (SFA)	1,12E-37	0.00353734	5,80E-03	1,68E-43
Somma a.g. monoinsaturi (MUFA)	0,20849	0.206786	1,19E-19	0.0188514
Somma a.g. polinsaturi (PUFA)	3,66E-12	0.176117	1,18E-03	1,16E-06
PUFA/SFA	9,49E-29	0.0637478	0.294286	1,22E-28
MUFA/SFA	1,53E-13	0.0760412	7,08E-20	3,71E-13
Somma PUFA n-3	8,41E-07	0.0249549	0.0054461	1,33E-03
Somma PUFA n-6	2,61E-29	5,60E-07	0.0053272	1,99E-35
Rapporto n-3/n-6	0	7,58E-05	0.0759459	2,85E-17
Rapporto n-6/n.3	0	2,13E-05	0.0337632	2,07E-25
EPA+DHA	3,14E-09	0.00778466	2,86E-01	1,02E-04
EPA/DHA	0,146772	0.588392	4,39E-05	0.543167
DHA/EPA	6,00E-08	0.119217	0.0315505	1,30E-10
20:1+22:1	0,00777196	0.0020665	1,10E-07	0.000179527
ARA/EPA	0	0.05749	0.401134	1,62E-23
EPA/ARA	6,47E-32	0.0188071	0.146498	2,33E-44
Non identificati (N.I.)	7,50E-09	0.153235	0.00133505	6,89E-09

DOCUMENTO ALLEGATO N. II.12

Significatività statistica (P-value) del contributo predittivo fornito individualmente dalla umidità della polpa (g/100 g eduli), dal tenore in lipidi totali della stessa (g/100 g eduli) e da ciascuna voce della composizione acidica dei lipidi totali (% FAME) in relazione al metodo di produzione per tutti gli esemplari (Met_Prod, n = 160), alla zona FAO di cattura per gli esemplari selvaggi (FAO zone, n = 45), al Paese di origine per gli esemplari allevati (Country, n = 115), alla “Intensità” per tutti gli esemplari (Intensity, n = 160)

Parametro	Met_Prod	FAO_zone	Country	Intensity
Umidità, %	0	3,66E-07	0.000472748	1,31E-18
Lipidi, %	0	8,55E-07	0.000247596	1,88E-16
C14:00	3,35E-27	5,63E-05	0.013067	3,16E-25
C15:0	1,05E-05	0.00293258	0.145724	1,23E-46
C16:0	2,85E-39	0.00256987	2,43E-05	6,12E-46
C16:1 n-7	0,000388632	0.000613419	0.00012338	1,66E-15
C17:0	0	2,42E-05	0.000143332	4,65E-15
C18:0	5,98E-35	3,22E-05	3,69E-05	3,50E-32
C18:1 n-9	0,131778	0.182399	3,05E-09	7,12E-05
C18:1 n-7	0,00272086	0.373721	0.0828487	3,83E-06
C18:2 n-6 (LA)	2,15E-37	5,98E-11	0.0328305	3,69E-52
C18:3 n-3 (ALA)	6,18E-35	0.153985	1,44E-04	5,25E-43
C18:4 n-3	1,34E-10	0.0662214	0.00148302	1,23E-04
C20:1 n-9	1,11E-05	0.00898117	4,52E-09	2,23E-04
C20:1 n-7	2,11E-06	0.0916148	0.27469	5,24E-04
C20:2 n-6	0	1,86E-05	0.0189447	6,62E-18
C20:4 n-6 (ARA)	5,48E-26	0.00156813	0.178435	1,28E-29
C20:4 n-3	1,15E-12	0.414902	4,56E-10	2,03E-08
C20:5 n-3 (EPA)	0,746585	0.442918	1,12E-04	0.00403756
C22:1 n-11	0,0126988	0.0284529	6,49E-03	0.00109977
C22:4 n-6	1,00E-29	0.0059056	0.358872	1,85E-35
C22:5 n-6	4,41E-27	0.00184809	0.247636	4,34E-42
C22:5 n-3	0,020654	0.726291	0.712063	7,65E-05
C22:6 n-3 (DHA)	6,75E-10	0.0206346	0.225735	1,73E-07
Somma acidi grassi saturi (SFA)	1,12E-37	0.00353734	5,80E-03	1,68E-43
Somma a.g. monoinsaturi (MUFA)	0,20849	0.206786	1,19E-19	0.0188514
Somma a.g. polinsaturi (PUFA)	3,66E-12	0.176117	1,18E-03	1,16E-06
PUFA/SFA	9,49E-29	0.0637478	0.294286	1,22E-28
MUFA/SFA	1,53E-13	0.0760412	7,08E-20	3,71E-13
Somma PUFA n-3	8,41E-07	0.0249549	0.0054461	1,33E-03
Somma PUFA n-6	2,61E-29	5,60E-07	0.0053272	1,99E-35
Rapporto n-3/n-6	0	7,58E-05	0.0759459	2,85E-17
Rapporto n-6/n.3	0	2,13E-05	0.0337632	2,07E-25
EPA+DHA	3,14E-09	0.00778466	2,86E-01	1,02E-04
EPA/DHA	0,146772	0.588392	4,39E-05	0.543167
DHA/EPA	6,00E-08	0.119217	0.0315505	1,30E-10
20:1+22:1	0,00777196	0.0020665	1,10E-07	0.000179527
ARA/EPA	0	0.05749	0.401134	1,62E-23
EPA/ARA	6,47E-32	0.0188071	0.146498	2,33E-44
Non identificati (N.I.)	7,50E-09	0.153235	0.00133505	6,89E-09

DOCUMENTO ALLEGATO N. II.13

Significatività statistica (P-value) del contributo predittivo fornito individualmente da ciascuna voce della composizione acidica dei lipidi neutri (% FAME) in relazione al metodo di produzione per tutti gli esemplari (Met_Prod, n = 145), alla zona FAO di cattura per gli esemplari selvaggi (FAO zone, n = 45), al Paese di origine per gli esemplari allevati (Country, n = 100), alla "Intensità" per tutti gli esemplari (Intensity, n = 145)

Parametro	Met_Prod	FAO_zone	Country	Intensity
N14:00	2,89E-023	0,00219247	0,0102986	8,97E-025
N15:0	8,04E-007	0,0685825	0,312377	4,44E-047
N16:0	3,39E-035	6,95E-005	0,000218644	1,02E-042
N16:1 n-7	1,55E-008	0,526249	0,00487474	1,98E-029
N17:0	2,67E-015	0,0679019	0,00401514	5,48E-026
N18:0	9,12E-033	0,000165848	0,000388839	5,34E-033
N18:1 n-9	0,0561585	0,826397	1,65E-014	0,000362748
N18:1 n-7	2,00E-016	0,000144661	0,596353	4,50E-038
N18:2 n-6 (LA)	7,30E-036	3,79E-005	0,0630965	2,05E-057
N18:3 n-3 (ALA)	5,25E-029	0,0331488	5,16E-006	6,23E-041
N18:4 n-3	7,00E-006	0,0636745	0,0341441	3,78E-005
N20:1 n-9	0,0504398	0,00317009	7,19E-015	0,00421495
N20:1 n-7	1,01E-020	0,0287933	0,0934817	1,55E-019
N20:2 n-6	3,44E-015	8,65E-006	0,00478011	1,13E-017
N20:4 n-6 (ARA)	4,48E-020	0,00140838	0,243236	1,84E-036
N20:4 n-3	9,30E-007	0,249399	1,39E-010	2,55E-006
N20:5 n-3 (EPA)	0,439843	0,933284	1,57E-006	0,0282017
N22:1 n-9	0,210808	0,00130118	5,78E-008	0,00771056
N22:4 n-6	5,55E-026	0,0161427	0,435068	5,68E-034
N22:5 n-6	3,15E-019	0,000107246	0,315782	2,32E-040
N22:5 n-3	0,207635	0,0152307	0,329814	9,20E-028
N22:6 n-3 (DHA)	2,69E-006	0,0205481	0,127619	2,33E-009
Somma acidi grassi saturi (N_SFA)	8,59E-033	0,000479111	7,50E-006	2,27E-040
Somma a.g. monoinsaturi (N_MUFA)	1,48E-008	0,707747	3,51E-029	3,19E-008
Somma a.g. polinsaturi (N_PUFA)	6,48E-031	0,865033	9,95E-008	7,42E-033
N_PUFA/SFA	2,56E-038	0,193806	0,923417	1,14E-046
N_MUFA/SFA	9,43E-005	0,00351152	5,84E-028	1,59E-007
Somma N_PUFA n-3	0,089904	0,108536	0,0632459	1,25E-045
Somma N_PUFA n-6	4,06E-032	1,33E-005	0,0164477	0,000934592
Rapporto N_n-3/n-6	3,80E-020	0,00119756	0,176704	2,99E-020
Rapporto N_n-6/n.3	5,26E-022	8,75E-005	0,0802745	6,51E-033
N_EPA+DHA	5,63E-005	0,0332809	0,0091248	1,55E-005
N_EPA/DHA	0,0509647	0,0322633	1,91E-006	2,66E-005
N_DHA/EPA	1,86E-005	0,0417354	0,000364017	2,75E-010
N_20:1+22:1	0,487936	0,00149694	4,48E-011	0,022396
N_ARA/EPA	9,34E-014	0,0995504	0,451862	2,26E-026
N_EPA/ARA	5,79E-026	0,0887852	0,179723	3,53E-053
N_LA/ARA	2,63E-028	0,358109	0,449973	3,16E-049
N_LA/ALA	6,97E-033	0,115055	4,59E-006	7,88E-043

DOCUMENTO ALLEGATO N. II.14

Significatività statistica (P-value) del contributo predittivo fornito individualmente da ciascuna voce della composizione acidica dei lipidi polari (% FAME) in relazione al metodo di produzione per tutti gli esemplari (Met_Prod, n = 145), alla zona FAO di cattura per gli esemplari selvaggi (FAO zone, n = 45), al Paese di origine per gli esemplari allevati (Country, n = 100), alla "Intensità" per tutti gli esemplari (Intensity, n = 145)

Parametro	Met_Prod	FAO_zone	Country	Intensity
P 14:0	1,65E-06	0,00136157	0,869513	2,25E-009
P 15:0	1,49E-07	0,0253969	0,506734	1,23E-019
P 16:0	0,000158114	0,998486	0,000671084	3,35E-005
P 16:1 n-7	0,000199094	0,534086	0,338111	6,89E-010
P 17:0	4,97E-18	9,23E-007	0,0242904	1,45E-027
P 18:0	0,757993	0,000763252	0,778514	0,295607
P 18:1 n-9	0,000451489	0,168372	9,92E-011	5,91E-006
P 18:1 n-7	0,327806	0,0120164	0,290325	2,86E-005
P 18:2 n-6 (LA)	8,45E-33	1,87E-007	0,283056	1,30E-053
P 18:3 n-3 (ALA)	2,91E-17	0,138775	5,07E-014	1,22E-018
P 18:4 n-3	0,0019516	0,0249764	0,950904	0,000301503
P 20:1 n-9	0,721348	0,00558699	1,33E-018	0,0383023
P 20:2 n-6	8,18E-19	0,000211633	0,0818353	2,38E-018
P 20:4 n-6 (ARA)	3,11E-22	0,000651713	0,0993673	1,50E-029
P 20:4 n-3	5,84E-15	0,00400933	1,65E-018	9,35E-015
P 20:5 n-3 (EPA)	0,937576	0,011036	0,00199481	1,03E-007
P 22:1 n-9	0,0167897	0,000830221	3,73E-016	0,000179224
P 22:4 n-6	1,77E-25	0,020671	0,419148	4,36E-030
P 22:5 n-6	6,29E-20	1,86E-005	0,235201	3,96E-032
P 22:5 n-3	0,794589	0,000901366	0,405841	1,45E-012
P 22:6 n-3 (DHA)	0,276509	0,000314902	0,0167267	4,40E-009
Somma acidi grassi saturi (P_SFA)	0,000881208	0,000245688	5,59E-006	5,74E-005
Somma a.g. monoinsaturi (P_MUFA)	0,0102989	0,875637	1,14E-013	0,00997688
Somma a.g. polinsaturi (P_PUFA)	0,255372	9,76E-007	0,000118137	0,00219788
P_PUFA/SFA	0,0110754	1,20E-006	0,00132283	9,31E-006
P_MUFA/SFA	0,000323631	0,132263	9,15E-014	0,00102717
Somma P_PUFA n-3	0,535218	8,64E-007	0,00254518	0,000159062
Somma P_PUFA n-6	0,000933877	1,79E-005	0,0105603	1,14E-005
Rapporto P_n-3/n-6	1,72E-05	6,00E-006	0,00539195	2,30E-005
Rapporto P_n-6/n.3	0,0457968	5,44E-005	0,0195162	8,39E-006
P_EPA+DHA	0,261601	1,32E-006	0,000592672	0,00124638
P_EPA/DHA	0,818961	0,0620647	0,0342991	6,66E-011
P_DHA/EPA	0,411857	0,0954581	0,175056	1,59E-020
P_20:1+22:1	0,302074	0,00194445	1,19E-020	0,0169042
P_ARA/EPA	6,71E-09	0,00890697	0,208916	5,93E-019
P_EPA/ARA	5,57E-14	3,90E-005	0,00166289	2,39E-024
P_LA/ARA	1,38E-28	0,0029197	0,218713	3,53E-044
P_LA/ALA	2,69E-31	0,181968	0,00115813	3,51E-047

DOCUMENTO ALLEGATO N. II.15

Significatività statistica (P-value) del contributo predittivo fornito individualmente da ciascun elemento minerale (mg/kg eduli) in relazione al metodo di produzione per tutti gli esemplari (Met_Prod, n = 160), alla zona FAO di cattura per gli esemplari selvaggi (FAO zone, n = 45), al Paese di origine per gli esemplari allevati (Country, n = 115), alla "Intensità" per tutti gli esemplari (Intensity, n = 160)

Parametro	Met_Prod	FAO_zone	Country	Intensity
Macroelementi				
Sodio	0,00494142	0.0326883	0,740399	6,80E-005
Potassio	0,039756	0.0911833	1,14E-005	0,000863207
Calcio	0,180144	0.193552	1,32E-005	0,112747
Magnesio	0,106147	0.000690359	0,00197909	0,0342702
Fosforo	0,00166884	0.242091	3,29E-007	3,71E-005
Zolfo	0,728373	3,47E-08	0,000699605	0,0711149
Elementi traccia				
Zinco	0,00673021	0.0212393	0,510517	0,0502442
Ferro	0,936608	0.314234	0,000321471	0,924351
Rame	0,00152364	0.0208786	0,0136102	7,53E-005
Manganese	0,0120784	0.0641159	0,319941	0,0157258
Selenio	0,00016914	0.149128	0,0177023	6,96E-005
Cromo	0,652434	0.000470607	0,039265	0,790271
Cobalto	0,23393	1,28E-05	0,152855	0,0288974
Nickel	0,503325	0.128949	0,0325669	0,89121
Elementi tossici				
Arsenico	0,475325	0.000132907	0,142481	0,234285
Cadmio	0,0882527	7,77E-02	0,0927714	0,166553
Mercurio	0,579521	0.303878	2,53E-005	0,363948
Piombo	0,785312	0.580454	0,00325988	0,569673

DOCUMENTO ALLEGATO N. II.16

Significatività statistica (P-value) del contributo predittivo fornito individualmente da ciascun rapporto isotopico stabile (% specifico materiale di riferimento) in relazione al metodo di produzione per tutti gli esemplari (Met_Prod, n = 160), alla zona FAO di cattura per gli esemplari selvaggi (FAO zone, n = 45), al Paese di origine per gli esemplari allevati (Country, n = 115), alla "Intensità" per tutti gli esemplari (Intensity, n = 160)

Parametro	Met_Prod	FAO_zone	Country	Intensity
Incidenza % di:				
Carbonio	1,94E-29	0.000223863	0,0213954	4,72E-019
Azoto	3,15E-21	0.114624	0,000488169	2,24E-017
Rapporti isotopici stabili				
$\delta^{13}\text{C} \text{‰ vs V-PDB}$	3,24E-13	0.534684	1,61E-007	1,43E-010
$\delta^{15}\text{N} \text{‰ vs air}$	2,28E-24	0.141134	0,125003	2,30E-026

DOCUMENTO ALLEGATO N. II.17

Gli esemplari di spigola del Progetto suddivisi in base alla Intensità – Parametri morfometrici

Parametro	Selvaggi (n = 45)		Estensivi (n = 10)		Semi-intensivi (n = 20)		Intensivi italiani (n = 45)		Intensivi esteri (n = 40)	
	min	MAX	min	MAX	min	MAX	min	MAX	min	MAX
Lunghezza	34,7	50,7	37,2	38,5	35,9	39,9	32,5	35,8	30,7	33,4
Peso corporeo	441,4	1418,6	616,4	701,3	526,0	740,1	346,4	502,9	334,6	419,9
Peso eviscerato	404,0	1324,5	547,6	618,1	470,1	641,5	317,3	447,4	297,0	361,6
Visceri	36,3	142,5	66,0	78,3	39,4	94,8	26,5	66,6	23,7	56,6
Fegato	4,5	27,6	14,0	15,8	7,1	24,1	3,7	16,2	4,5	11,1
Gonadi	1,1	45,5	16,8	21,3	0,1	22,3	0,3	28,6	0,1	10,0
Grasso celomatico	0,0	31,7	12,9	17,6	14,9	32,9	2,3	22,8	7,3	33,1
Filetto sinistro con pelle	113,8	362,5	155,1	163,0	121,4	171,3	86,1	126,4	84,1	99,4
Filetto destro con pelle	114,3	357,9	154,6	164,4	119,7	170,9	86,1	126,7	85,2	99,4
Filetto sinistro senza pelle	103,3	324,2	140,1	140,8	103,4	146,5	73,5	114,2	74,3	88,7
Filetto destro senza pelle	103,6	319,1	140,1	143,5	104,9	148,9	75,5	115,3	75,7	87,8
Pelle dei due filetti	18,1	69,6	25,9	37,8	24,7	42,2	15,9	22,8	16,9	21,6
Residuo sfilettato	172,8	588,0	234,6	285,9	224,4	291,5	135,9	198,3	125,4	161,7
Fattore di condizione	0,98	1,35	1,20	1,22	1,07	1,30	1,01	1,17	1,01	1,28
Resa di eviscerazione	84,71	93,38	88,17	88,91	86,67	92,99	85,78	91,60	86,13	92,47
Indice viscerosomatico	5,92	14,82	10,62	11,12	7,40	12,81	7,67	13,62	7,00	13,47
Indice epatosomatico	1,02	2,38	2,24	2,27	1,16	3,31	1,07	3,32	1,25	2,67
Indice gonadosomatico	0,07	3,94	2,62	3,02	0,02	4,09	0,08	5,84	0,02	2,53
Grasso celomatico	0,00	4,00	2,11	2,50	2,80	4,81	0,58	5,40	2,11	7,88
Resa in filetti con pelle	46,65	51,61	46,71	50,32	45,03	50,15	45,95	53,78	46,75	54,11
Resa in filetti senza pelle	41,62	47,04	40,49	45,49	38,93	43,95	40,98	48,76	41,10	48,65
Incidenza residuo sfilettato	36,31	41,66	38,09	40,78	39,26	43,21	36,21	41,23	35,07	39,60
Incidenza pelle dei filetti	3,40	5,48	4,20	5,44	4,71	5,69	4,20	5,92	4,61	5,34
Calo di eviscerazione	0,25	0,75	0,47	0,71	-0,39	0,52	0,22	0,80	0,34	0,83
Calo di sfilettamento	0,08	5,19	0,55	0,77	0,73	1,78	0,41	1,47	0,52	1,11
Calo spellatura e deliscatura	8,88	12,48	9,58	13,25	11,08	13,66	9,32	12,99	10,11	12,10

DOCUMENTO ALLEGATO N. II.18

Gli esemplari di spigola del Progetto suddivisi in base alla Intensità – Umidità e lipidi totali della polpa, con relativa composizione acidica

Parametro	Selvaggi (n = 45)		Estensivi (n = 10)		Semi-intensivi (n = 20)		Intensivi italiani (n = 45)		Intensivi esteri (n = 40)	
	min	MAX	min	MAX	min	MAX	min	MAX	min	MAX
Umidità	72,80	78,62	75,23	75,72	70,40	72,26	70,76	73,62	69,85	73,57
Lipidi totali	2,06	7,63	3,78	5,01	7,66	9,82	5,55	9,01	5,99	10,10
C 14:0	1,08	2,27	1,83	2,03	2,29	3,67	2,30	3,35	2,15	3,59
C 16:0	16,99	21,37	17,48	17,96	14,19	14,61	13,51	15,48	13,12	14,91
C 17:0	0,43	0,75	0,35	0,60	0,30	0,40	0,29	0,48	0,23	0,52
C 18:0	4,03	5,95	3,88	4,22	2,99	3,85	3,12	3,93	2,63	3,67
Σ SFA	24,37	28,61	24,64	25,06	20,09	22,04	19,83	22,78	18,82	21,53
C 16:1 n-7	3,83	6,44	6,95	7,10	4,03	5,57	4,00	4,91	3,44	5,69
C 18:1 n-9	15,18	24,71	14,72	16,27	17,12	22,70	16,80	22,65	18,68	27,64
C 18:1 n-7	2,80	3,90	4,25	4,29	2,54	3,51	2,36	3,83	2,51	3,87
C 20:1 n-9	0,80	2,75	0,70	0,97	1,31	2,12	1,33	3,16	1,54	3,49
C 20:1 n-7	0,17	0,85	0,52	0,65	0,19	0,26	0,13	0,50	0,15	0,37
C 22:1 n-11	0,00	2,80	0,07	0,14	0,30	1,14	0,38	1,79	0,40	1,71
Σ MUFA	26,04	36,23	27,34	29,29	29,15	31,79	27,30	33,18	28,73	39,68
C 18:2 n-6 (LA)	0,64	3,82	3,16	3,93	11,94	21,50	11,76	23,07	8,21	17,59
C 20:2 n-6	0,29	0,69	0,45	0,56	0,64	0,82	0,55	0,95	0,55	0,83
C 20:4 n-6 (ARA)	1,38	4,50	2,69	3,00	0,56	0,75	0,47	0,75	0,54	0,92
C 22:4 n-6	0,17	1,09	0,55	0,68	0,05	0,08	0,03	0,07	0,06	0,12
C 22:5 n-6	0,39	1,00	0,74	0,76	0,16	0,22	0,14	0,24	0,18	0,27
Σ PUFA n-6	3,27	10,37	7,90	8,62	13,64	23,10	13,32	24,62	10,06	19,03
C 18:3 n-3 (ALA)	0,36	1,33	1,01	1,05	1,78	2,66	1,52	2,73	1,93	3,05
C 18:4 n-3	0,26	1,05	0,69	0,91	0,63	1,30	0,77	1,26	0,69	1,33
C 20:4 n-3	0,23	0,52	0,55	0,64	0,43	0,71	0,35	0,57	0,49	0,83
C 20:5 n-3 (EPA)	5,38	10,69	5,42	7,76	6,48	10,75	7,42	11,61	5,26	10,40
C 22:5 n-3	1,66	6,53	4,63	4,79	1,33	2,27	1,14	2,12	1,74	2,33
C 22:6 n-3 (DHA)	7,55	24,71	15,10	17,15	7,07	9,87	7,60	11,70	8,69	13,16
Σ PUFA n-3	20,25	35,83	27,56	31,77	19,53	26,68	17,53	28,13	21,05	28,28
Σ PUFA	27,54	41,22	36,18	40,03	40,32	44,90	38,55	45,92	35,50	44,41
N.I.	6,08	9,39	7,54	8,95	4,91	7,98	5,05	7,37	5,15	7,57
Σ PUFA / Σ SFA	0,98	1,61	1,45	1,63	1,83	2,17	1,75	2,16	1,76	2,10
Σ MUFA / Σ SFA	0,95	1,34	1,11	1,17	1,32	1,52	1,28	1,63	1,35	2,10
Σ n-3 / Σ n-6	2,78	11,18	3,43	4,13	0,88	1,96	0,71	2,00	1,13	2,74
Σ n-6 / Σ n-3	0,09	0,36	0,25	0,31	0,51	1,16	0,51	1,41	0,37	0,89
EPA + DHA	16,97	32,00	20,52	24,91	14,41	20,62	15,21	22,30	14,65	22,03
EPA / DHA	0,33	18,52	0,36	0,46	0,84	1,13	0,82	1,20	0,56	1,11
DHA / EPA	0,84	3,52	2,33	2,81	0,90	1,23	0,84	1,24	0,91	1,79
Σ C 20:1 + Σ C 22:1	1,24	6,40	1,41	1,63	1,82	3,52	1,87	5,33	2,15	5,54
ARA / EPA	0,17	0,77	0,41	0,49	0,07	0,10	0,06	0,09	0,07	0,11
EPA / ARA	1,32	6,46	2,67	5,09	10,07	14,32	11,48	15,91	8,95	15,02

DOCUMENTO ALLEGATO N. II.19

Gli esemplari di spigola del Progetto suddivisi in base alla Intensità – Composizione acidica dei lipidi neutri della polpa

Parametro	Selvaggi (n = 45)		Estensivi (n = 10)		Semi-intensivi (n = 20)		Intensivi italiani (n = 40)		Intensivi esteri (n = 30)	
	min	MAX	min	MAX	min	MAX	min	MAX	min	MAX
N 14:0	1,65	2,95	2,72	2,78	2,76	4,51	2,91	4,18	2,97	4,19
N 15:0	0,36	0,54	0,70	0,90	0,21	0,32	0,22	0,33	0,24	0,30
N 16:0	16,64	21,48	17,73	17,89	14,42	15,17	13,43	15,68	12,88	15,27
N 17:0	0,25	0,65	0,49	0,57	0,19	0,26	0,22	0,27	0,16	0,33
N 18:0	3,96	5,99	3,45	3,84	2,61	3,34	2,59	3,47	2,49	3,53
N_Σ SFA	24,68	29,31	25,23	25,84	20,57	22,51	19,78	23,19	19,25	22,87
N 16:1 n-7	6,62	8,03	8,81	9,31	4,63	6,79	4,90	6,20	4,09	6,65
N 18:1 n-9	17,51	27,25	16,59	17,11	16,79	22,52	18,11	22,66	18,62	27,77
N 18:1 n-7	3,27	4,49	4,07	4,40	2,13	2,65	2,46	3,00	2,50	2,95
N 20:1 n-11	0,00	0,82	0,00	0,35	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
N 20:1 n-9	0,93	4,25	0,97	1,63	1,51	2,06	1,36	3,22	1,68	3,74
N 20:1 n-7	0,26	0,80	0,00	0,50	0,00	0,18	0,00	0,26	0,00	0,20
N 22:1 n-9	0,10	3,24	0,15	0,15	0,40	1,15	0,33	2,16	0,47	2,22
N_Σ MUFA	30,36	41,46	31,97	32,84	29,62	32,44	29,32	34,27	30,19	40,62
N 18:2 n-6 (LA)	0,86	4,71	3,66	4,89	12,68	21,80	12,81	21,18	8,66	18,03
N 20:2 n-6	0,31	0,71	0,45	0,56	0,59	0,80	0,54	0,87	0,54	0,80
N 20:4 n-6 (ARA)	1,01	3,15	2,41	2,71	0,45	0,65	0,49	0,65	0,48	0,88
N 22:4 n-6	0,18	1,13	0,47	0,67	0,08	0,11	0,07	0,10	0,09	0,12
N 22:5 n-6	0,33	0,76	0,64	0,65	0,16	0,21	0,15	0,21	0,16	0,25
N_Σ PUFA n-6	3,18	9,94	7,63	9,48	14,24	23,36	14,22	22,80	10,45	19,63
N 18:3 n-3 (ALA)	0,46	1,51	1,13	1,40	1,95	2,90	2,09	3,18	2,08	3,33
N 18:4 n-3	0,32	1,37	0,90	1,25	0,72	1,56	0,93	1,58	0,84	1,61
N 20:4 n-3	0,27	0,73	0,63	0,76	0,48	0,79	0,48	0,69	0,53	0,91
N 20:5 n-3 (EPA)	5,13	11,06	5,95	8,53	6,58	11,95	8,39	11,44	5,41	10,33
N 22:5 n-3	1,32	3,41	3,95	4,68	1,61	2,31	1,50	1,90	1,57	2,39
N 22:6 n-3 (DHA)	5,29	20,33	12,49	13,32	6,24	9,15	6,19	9,79	6,70	10,55
N_Σ PUFA n-3	16,57	33,33	25,79	29,21	18,72	27,70	20,08	26,05	20,38	27,87
N_Σ PUFA	22,99	36,51	35,26	36,84	41,11	43,42	38,53	43,89	35,44	41,94
N_N.I.	4,68	7,84	5,25	7,54	4,27	5,93	4,70	5,72	4,04	5,93
N_Σ PUFA / Σ SFA	0,79	1,31	1,40	1,43	1,86	2,12	1,73	2,16	1,74	1,88
N_Σ MUFA / Σ SFA	1,08	1,55	1,24	1,27	1,32	1,53	1,37	1,66	1,32	2,06
N_Σ n-3 / Σ n-6	2,33	10,63	2,83	3,93	0,84	1,95	0,92	1,83	1,10	2,67
N_Σ n-6 / Σ n-3	0,10	0,43	0,26	0,37	0,51	1,20	0,55	1,09	0,38	0,93
N_EPA + DHA	13,62	28,91	18,44	21,85	13,33	21,10	14,72	19,83	13,54	20,88
N_EPA / DHA	0,43	1,94	0,48	0,66	0,99	1,31	1,03	1,51	0,67	1,49
N_DHA / EPA	0,57	2,47	1,64	2,11	0,77	1,04	0,67	0,97	0,67	1,50
N_Σ C 20:1 + Σ C 22:1	1,90	8,10	1,78	1,98	1,94	3,39	1,97	5,63	2,20	5,96
N_ARA / EPA	0,12	0,56	0,30	0,46	0,05	0,07	0,05	0,07	0,06	0,09
N_EPA / ARA	1,82	8,78	2,22	3,65	14,54	18,37	15,30	18,25	11,38	17,99
N_LA / ARA	0,55	1,52	1,53	1,88	19,48	46,61	20,96	41,59	9,88	36,31
N_LA / ALA	1,06	3,39	2,62	4,24	6,50	9,02	5,60	8,74	3,47	7,84

DOCUMENTO ALLEGATO N. II.20

Gli esemplari di spigola del Progetto suddivisi in base alla Intensità – Composizione acidica dei lipidi polari della polpa

Parametro	Selvaggi (n = 45)		Estensivi (n = 10)		Semi-intensivi (n = 20)		Intensivi italiani (n = 40)		Intensivi esteri (n = 30)	
	min	MAX	min	MAX	min	MAX	min	MAX	min	MAX
Fosfolipidi / Lipidi totali	8,93	44,18	9,70	15,66	6,30	7,86	6,78	11,77	5,70	9,70
P 14:0	0,36	0,76	0,42	0,59	0,69	1,00	0,38	1,12	0,59	0,91
P 15:0	0,10	0,24	0,16	0,32	0,11	0,18	0,07	0,14	0,09	0,14
P 16:0	14,10	19,71	12,19	15,11	11,95	20,41	8,82	16,25	11,04	20,17
P 17:0	0,42	0,82	0,53	0,73	0,30	0,47	0,30	0,43	0,25	0,39
P 18:0	7,05	21,36	7,93	10,24	7,26	15,03	8,01	16,35	8,18	14,76
P_Σ SFA	23,83	36,76	23,74	24,48	27,93	29,18	23,41	30,14	26,35	35,52
P 16:1 n-7	1,15	1,99	1,61	2,05	0,97	1,59	0,75	1,85	0,79	1,67
P 18:1 n-9	6,42	10,63	7,57	7,95	9,47	11,64	5,20	10,64	8,07	15,17
P 18:1 n-7	1,76	2,95	3,31	3,68	1,54	2,32	1,72	4,18	1,76	2,44
P 20:1 n-9	0,36	1,30	0,67	0,95	0,54	0,72	0,60	0,98	0,60	1,69
P 22:1 n-11	0,06	0,40	0,05	0,07	0,09	0,23	0,11	0,34	0,08	0,50
P_Σ MUFA	10,79	16,24	13,61	14,32	13,39	16,27	10,85	15,09	11,93	21,09
P 18:2 n-6 (LA)	0,40	2,04	1,63	1,91	4,93	10,52	4,79	8,84	3,47	8,11
P 20:2 n-6	0,15	0,66	0,34	0,57	0,39	0,68	0,39	0,76	0,40	0,61
P 20:4 n-6 (ARA)	3,35	8,81	5,33	5,91	2,16	3,40	1,70	3,14	1,64	2,68
P 22:4 n-6	0,13	1,03	0,38	0,50	0,06	0,09	0,06	0,09	0,05	0,11
P 22:5 n-6	0,72	1,86	1,25	1,26	0,45	0,48	0,44	0,66	0,41	0,67
P_Σ PUFA n-6	4,89	11,99	8,95	10,14	8,11	14,16	8,12	12,23	7,00	11,90
P 18:3 n-3 (ALA)	0,22	0,67	0,55	0,56	0,65	1,08	0,56	1,05	0,64	1,44
P 18:4 n-3	0,10	0,29	0,14	0,24	0,20	0,34	0,12	0,25	0,16	0,26
P 20:4 n-3	0,11	0,29	0,27	0,30	0,26	0,36	0,25	0,35	0,26	0,53
P 20:5 n-3 (EPA)	4,60	13,59	4,60	6,88	7,89	13,65	7,54	12,25	6,18	12,53
P 22:5 n-3	0,83	4,07	4,43	4,76	1,74	2,74	1,61	3,12	1,85	2,55
P 22:6 n-3 (DHA)	20,50	37,80	34,73	34,88	20,97	25,10	26,76	35,31	21,62	32,39
P_Σ PUFA n-3	32,23	50,58	45,23	47,11	33,08	41,23	37,32	48,82	32,08	45,87
P_Σ PUFA	43,93	56,39	55,37	56,06	47,24	53,42	49,23	56,95	43,98	54,79
P_N.I.	5,00	8,52	5,14	7,29	5,02	9,34	4,71	9,08	4,42	8,26
P_Σ PUFA / Σ SFA	1,23	2,37	2,30	2,34	1,68	1,90	1,64	2,43	1,37	2,02
P_Σ MUFA / Σ SFA	0,30	0,60	0,57	0,59	0,48	0,59	0,40	0,61	0,34	0,79
P_Σ n-3 / Σ n-6	2,76	10,10	4,47	5,30	2,34	5,09	3,12	6,03	2,70	6,57
P_Σ n-6 / Σ n-3	0,10	0,37	0,19	0,22	0,20	0,43	0,17	0,32	0,15	0,37
P_EPA + DHA	30,45	48,27	39,48	41,61	29,86	38,21	34,29	45,48	27,79	42,16
P_EPA / DHA	0,18	0,64	0,13	0,20	0,36	0,59	0,28	0,43	0,29	0,44
P_DHA / EPA	1,68	5,68	5,14	7,71	1,71	2,79	2,35	3,63	2,31	3,50
P_Σ C20:1 + Σ C22:1	0,44	1,71	0,75	1,01	0,63	0,90	0,71	1,32	0,69	2,19
P_ARA / EPA	0,33	1,91	0,80	1,29	0,17	0,43	0,15	0,34	0,15	0,44
P_EPA / ARA	0,53	3,13	0,78	1,32	2,34	5,80	2,97	6,62	2,31	6,59
P_LA / ARA	0,08	0,31	0,30	0,34	2,19	5,04	1,53	4,58	1,41	3,69
P_LA / ALA	1,14	3,79	2,99	3,42	7,66	11,22	7,26	11,96	5,33	9,11

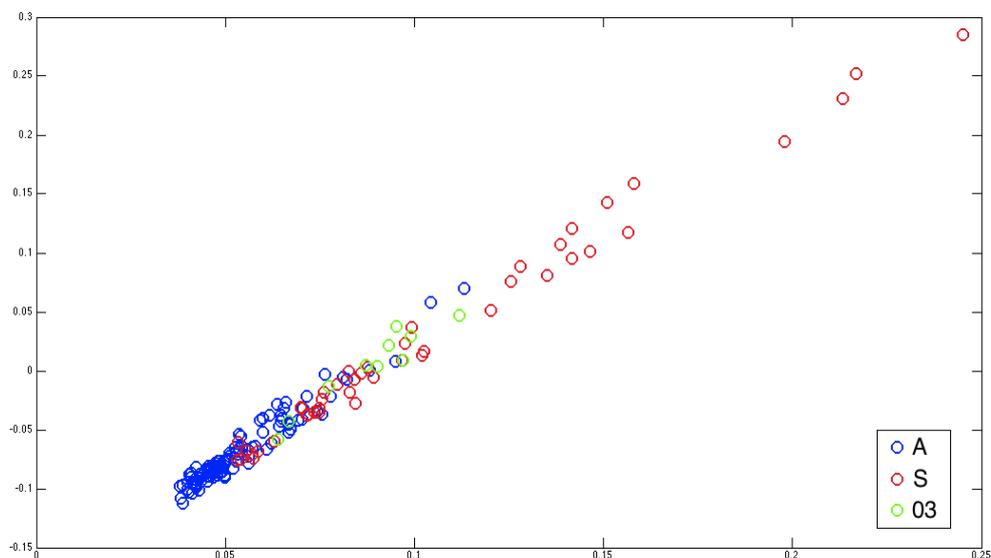
DOCUMENTO ALLEGATO N. II.21

Gli esemplari di spigola del Progetto suddivisi in base alla Intensità – Composizione elementale e abbondanze isotopiche relative della polpa

Parametro	Selvaggi (n = 45)		Estensivi (n = 10)		Semi-intensivi (n = 20)		Intensivi italiani (n = 45)		Intensivi esteri (n = 40)	
	min	MAX	min	MAX	min	MAX	min	MAX	min	MAX
Macroelementi										
Sodio	467	835	351	523	311	589	377	746	377	706
Potassio	2837	3481	3605	3871	2880	3586	3206	3769	2915	3835
Calcio	110	193	175	328	91	256	145	199	111	583
Magnesio	280	418	323	430	318	360	300	475	306	463
Fosforo	2397	2879	2986	3165	2563	2855	2606	3394	2475	3195
Zolfo	3545	10766	8441	9825	3840	9572	7171	10660	4289	11442
Elementi traccia										
Zinco	4,844	6,579	6,228	6,527	5,544	8,266	5,661	7,545	5,796	6,874
Ferro	2,886	5,220	3,838	4,150	3,490	5,100	3,232	6,065	2,618	4,667
Rame	0,352	0,846	0,542	0,822	0,592	0,727	0,559	0,951	0,737	0,951
Manganese	0,098	0,244	0,159	0,178	0,154	0,236	0,162	0,287	0,155	0,241
Selenio	0,198	0,416	0,169	0,371	0,211	0,353	0,196	0,280	0,114	0,246
Cromo	0,187	0,260	0,190	0,258	0,211	0,230	0,189	0,289	0,131	0,245
Cobalto	0,003	0,022	0,003	0,018	0,006	0,015	0,004	0,018	0,005	0,027
Nickel	0,015	0,046	0,027	0,032	0,022	0,040	0,022	0,041	0,019	0,050
Elementi tossici										
Arsenico	0,223	1,597	0,553	0,891	0,351	0,886	0,348	0,767	0,340	0,926
Cadmio	0,002	0,012	0,002	0,011	0,008	0,013	0,002	0,016	0,006	0,015
Mercurio	0,042	0,141	0,111	0,116	0,044	0,085	0,003	0,089	0,043	0,204
Piombo	0,024	0,156	0,078	0,118	0,042	0,079	0,045	0,124	0,057	0,370
Incidenza % di:										
Carbonio	42,86	48,82	45,72	47,62	48,68	52,40	46,42	51,94	47,84	52,24
Azoto	11,52	13,72	12,24	12,92	10,18	11,26	10,46	12,04	9,78	11,36
Rapporti isotopici stabili										
$\delta^{13}\text{C} \text{‰ vs V-PDB}$	-24,78	-12,42	-18,36	-18,08	-21,82	-20,12	-21,04	-19,40	-22,04	-19,94
$\delta^{15}\text{N} \text{‰ vs air}$	11,06	19,22	12,82	13,78	9,68	10,20	9,98	14,00	8,96	11,36

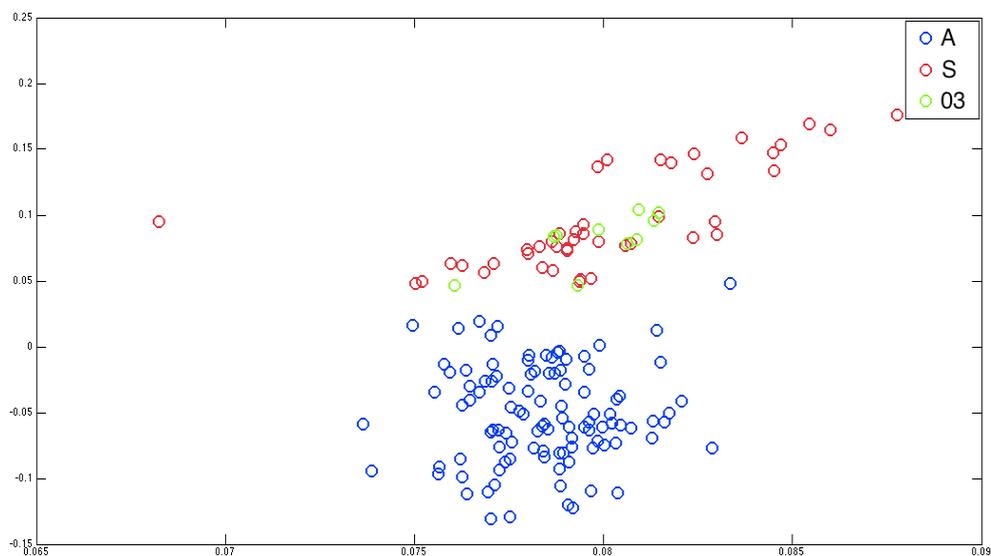
DOCUMENTO ALLEGATO N. II.25

Parametri morfometrici vs Metodo di produzione: grafico delle prime due componenti principali per la totalità delle spigole prese in esame (n = 160) (A = allevato; S = selvaggio; 03 = prodotto estensivo)



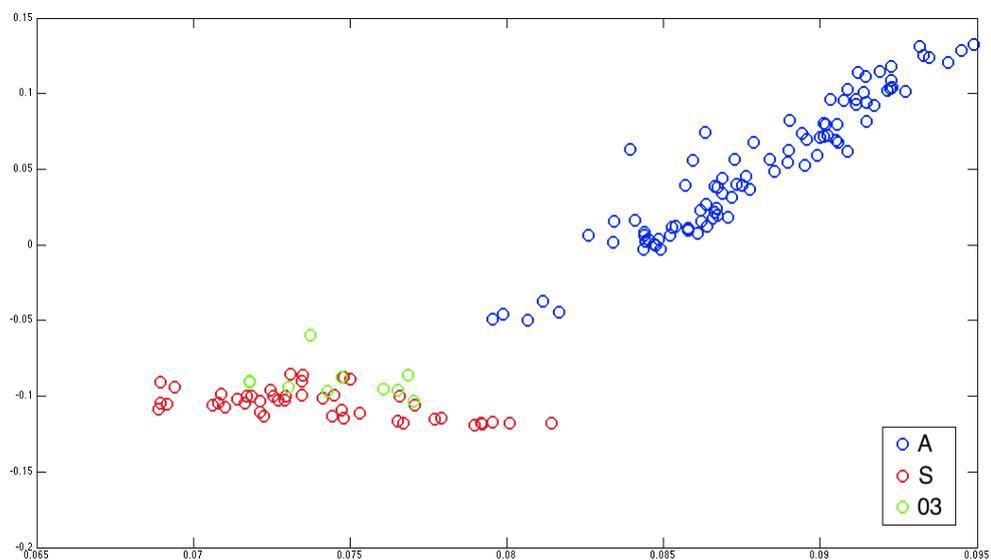
DOCUMENTO ALLEGATO N. II.26

Lipidi totali della polpa vs Metodo di produzione: grafico delle prime due componenti principali in relazione a umidità, tenore in lipidi totali e composizione acidica dei lipidi totali della polpa per la totalità delle spigole prese in esame (n = 160) (Legenda come in Documento Allegato N. 25)



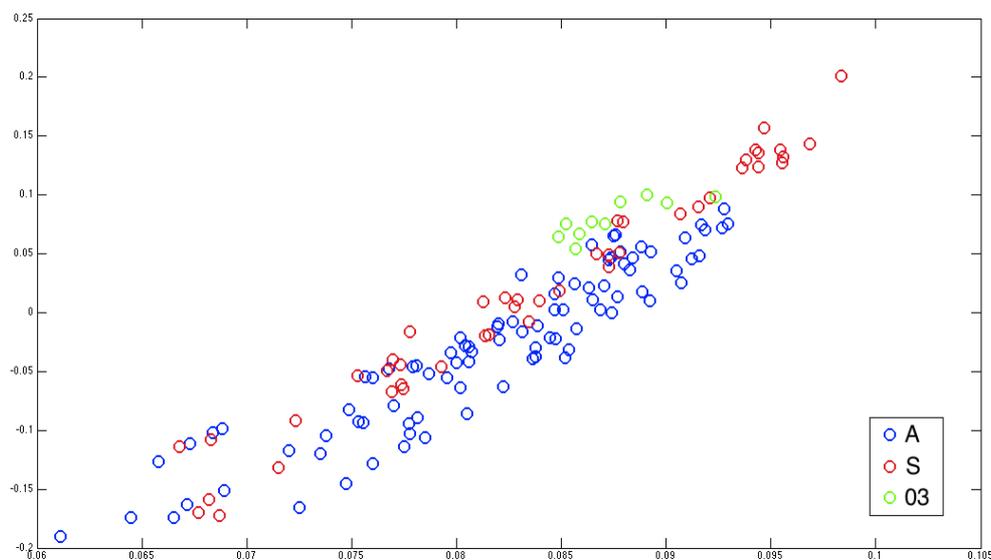
DOCUMENTO ALLEGATO N. II.27

Lipidi neutri della polpa vs Metodo di produzione: grafico delle prime due componenti principali in relazione alla composizione acidica dei lipidi neutri della polpa per la totalità delle spigole prese in esame e sottoposte a questa analisi (n = 145) (Legenda come in Documento Allegato N. 25)



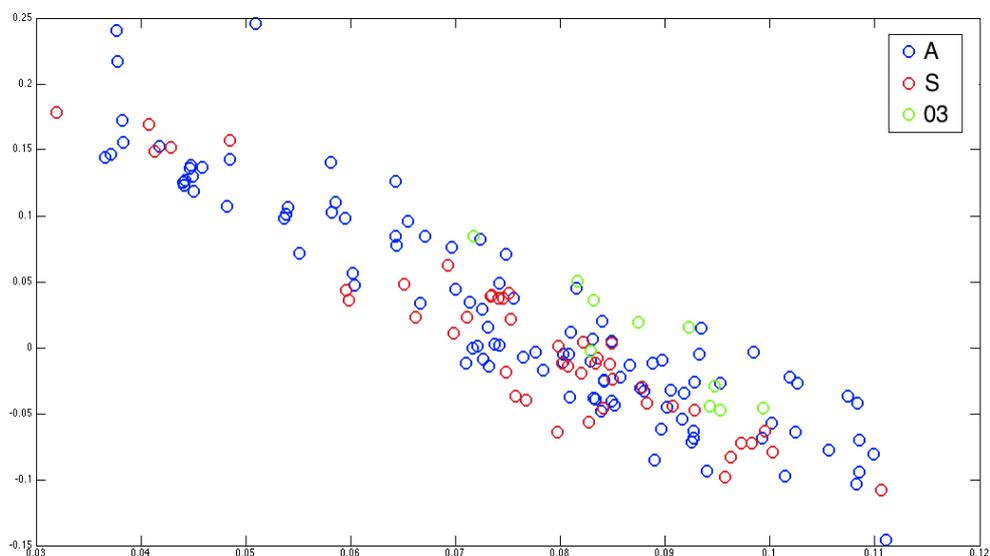
DOCUMENTO ALLEGATO N. II.28

Lipidi polari della polpa vs Metodo di produzione: grafico delle prime due componenti principali in relazione alla composizione acidica dei lipidi polari della polpa per la totalità delle spigole prese in esame e sottoposte a questa analisi (n = 145) (Legenda come in Documento Allegato N. 25)



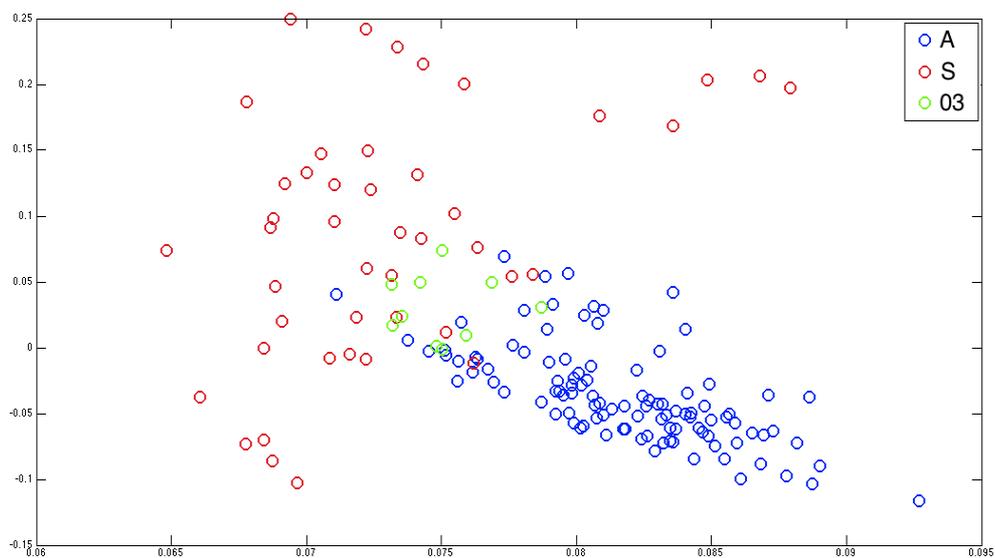
DOCUMENTO ALLEGATO N. II.29

Composizione elementale della polpa vs Metodo di produzione: grafico delle prime due componenti principali in relazione al tenore in macroelementi, oligoelementi ed elementi tossici della polpa per la totalità delle spigole prese in esame (n = 160) (Legenda come in Documento Allegato N. 25)



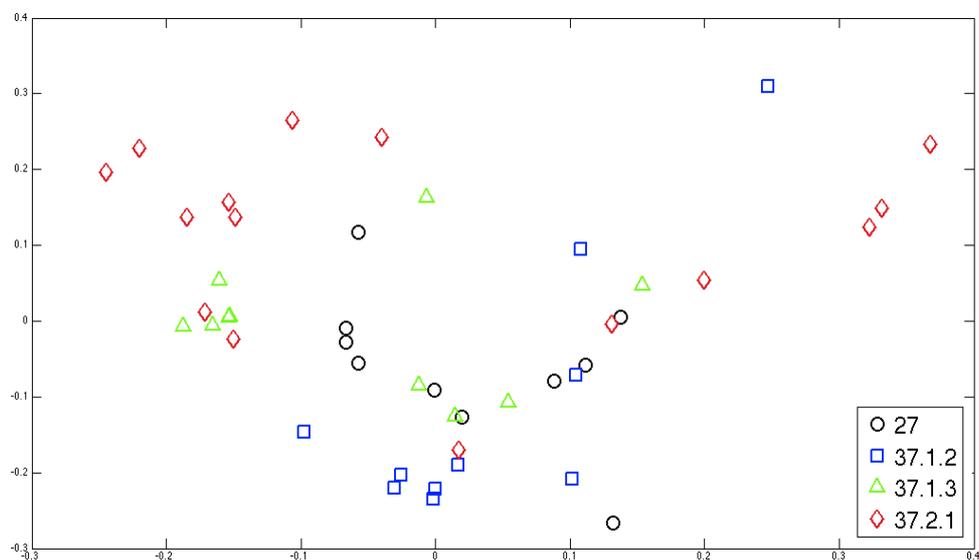
DOCUMENTO ALLEGATO N. II.30

Abbondanze isotopiche relative della polpa vs Metodo di produzione: grafico delle prime due componenti principali in relazione ai rapporti isotopici stabili per la totalità delle spigole prese in esame (n = 160) (Legenda come in Documento Allegato N. 25)



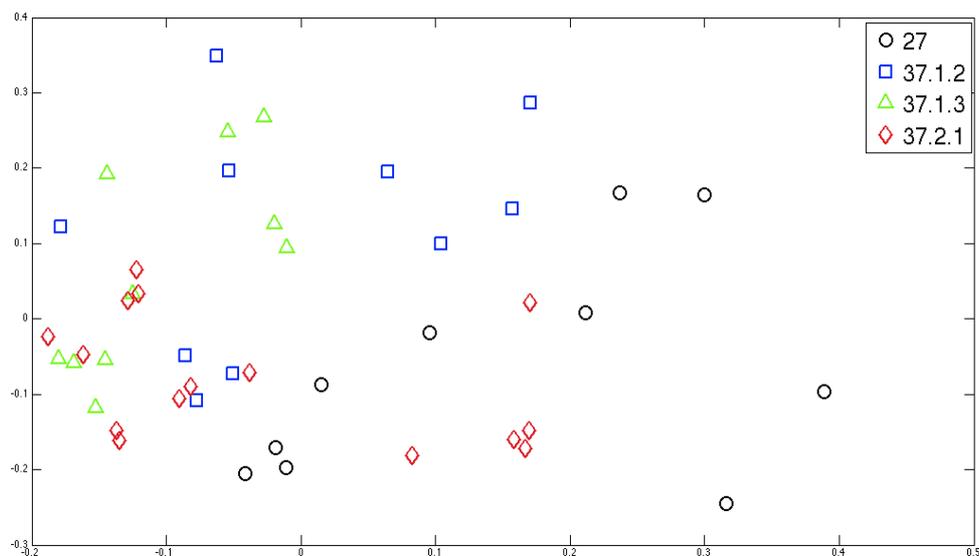
DOCUMENTO ALLEGATO N. II.31

Parametri morfometrici vs zona FAO di cattura: grafico delle prime due componenti principali per la totalità delle spigole selvagge prese in esame (n = 45) (Zona FAO 27 = Atlantico nord-orientale; Zona FAO 37.1.2 = Golfo del Leone; Zona FAO 37.1.3 = Tirreno; Zona FAO 37.2.1 = Adriatico centro-settentrionale)



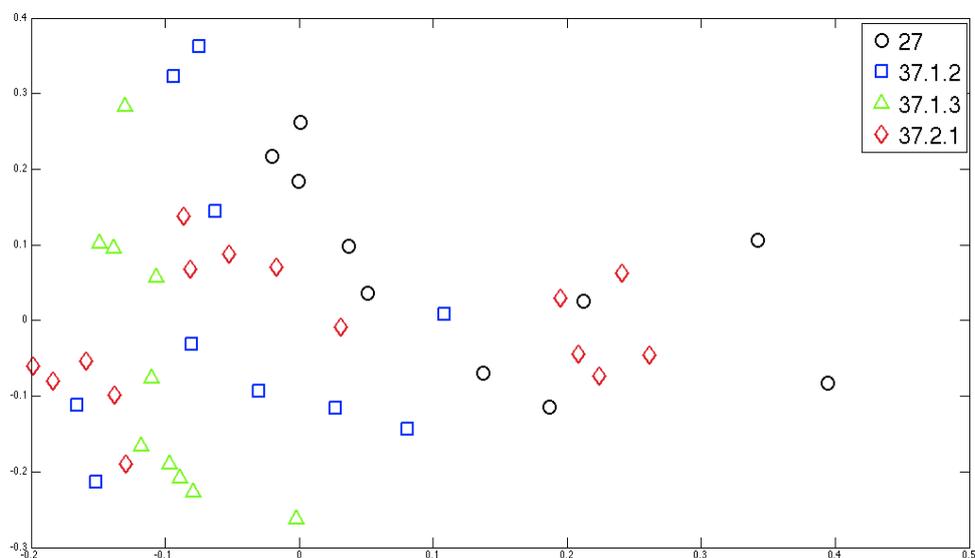
DOCUMENTO ALLEGATO N. II.32

Lipidi totali della polpa vs zona FAO di cattura: grafico delle prime due componenti principali in relazione a umidità, tenore in lipidi totali e composizione acidica dei lipidi totali della polpa per la totalità delle spigole selvagge prese in esame (n = 45) (Legenda come in Documento Allegato N. 31)



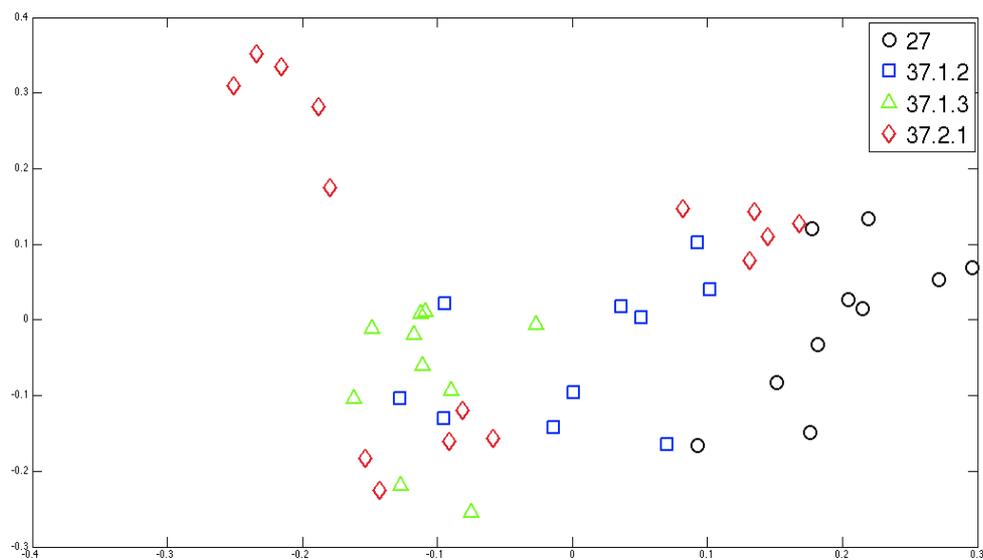
DOCUMENTO ALLEGATO N. II.33

Lipidi neutri della polpa vs zona FAO di cattura: grafico delle prime due componenti principali in relazione alla composizione acidica dei lipidi neutri della polpa per la totalità delle spigole selvagge prese in esame (n = 45) (Legenda come in Documento Allegato N. 31)



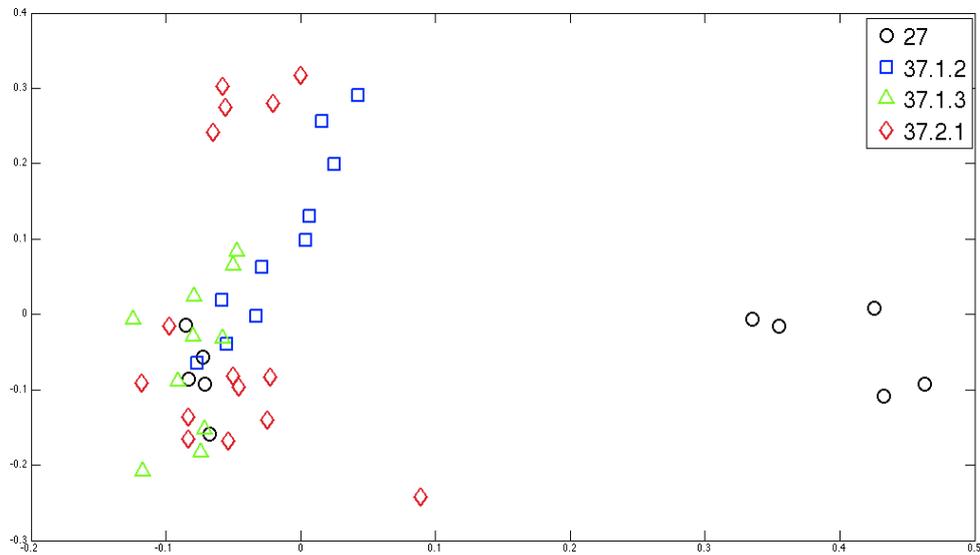
DOCUMENTO ALLEGATO N. II.34

Lipidi polari della polpa vs zona FAO di cattura: grafico delle prime due componenti principali in relazione alla composizione acidica dei lipidi polari della polpa per la totalità delle spigole selvagge prese in esame (n = 45) (Legenda come in Documento Allegato N. 31)



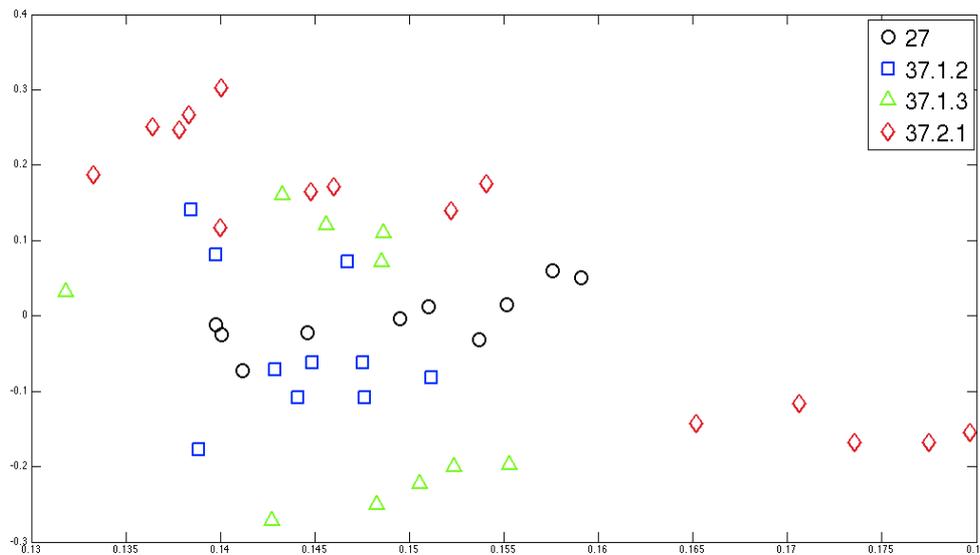
DOCUMENTO ALLEGATO N. II.35

Composizione elementale della polpa vs zona FAO di cattura: grafico delle prime due componenti principali in relazione al tenore in macroelementi, oligoelementi ed elementi tossici della polpa per la totalità delle spigole selvage prese in esame (n = 45) (Legenda come in Documento Allegato N. 31)



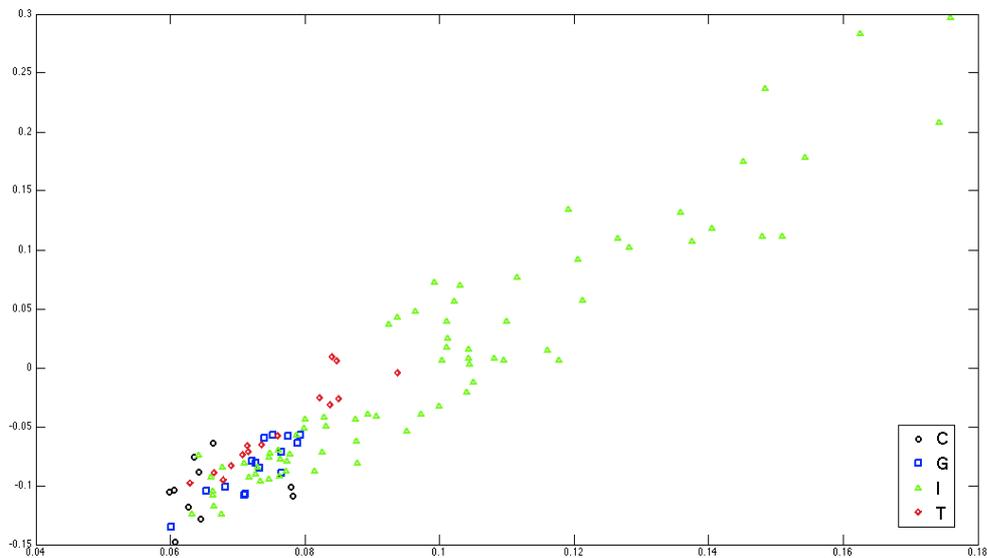
DOCUMENTO ALLEGATO N. II.36

Abbondanze isotopiche relative della polpa vs zona FAO di cattura: grafico delle prime due componenti principali in relazione ai rapporti isotopici stabili per la totalità delle spigole prese in esame per la totalità delle spigole selvage prese in esame (n = 45) (Legenda come in Documento Allegato N. 31)



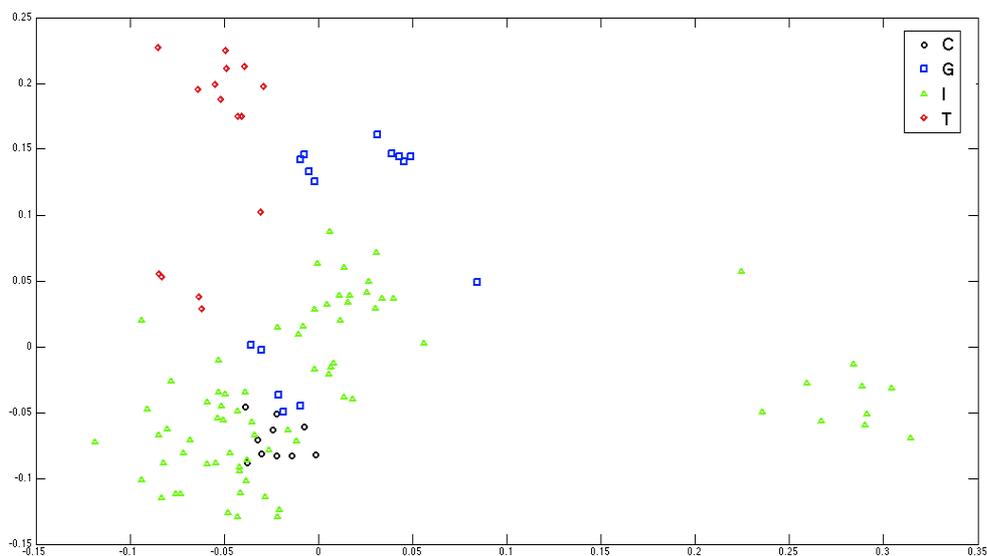
DOCUMENTO ALLEGATO N. II.37

Parametri morfometrici vs Paese di origine: grafico delle prime due componenti principali per la totalità delle spigole allevate prese in esame (n = 115) (C = Croazia; G = Grecia; I = Italia; T = Turchia)



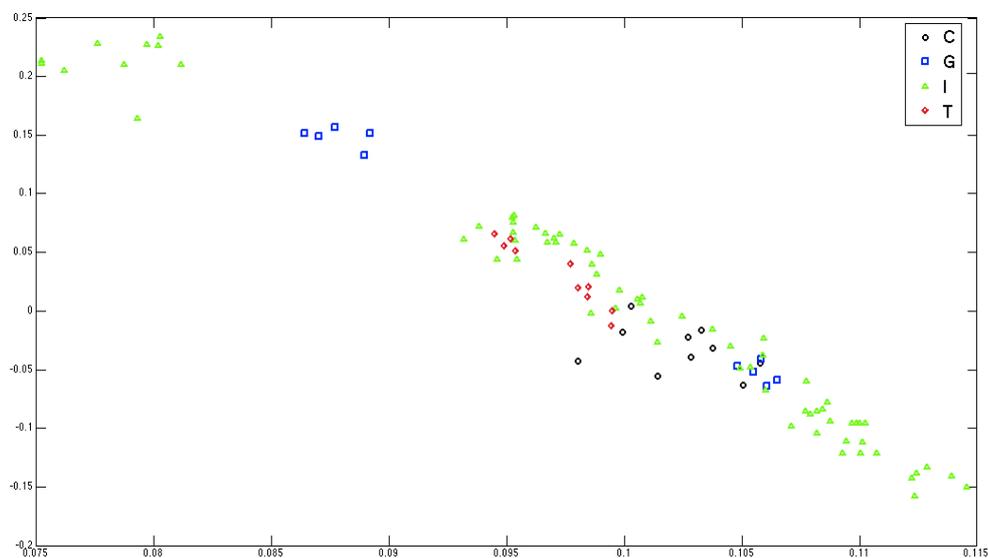
DOCUMENTO ALLEGATO N. II.38

Lipidi totali della polpa vs Paese di origine: grafico delle prime due componenti principali in relazione a umidità, tenore in lipidi totali e composizione acidica dei lipidi totali della polpa per la totalità delle spigole allevate prese in esame (n = 115) (Legenda come in Documento Allegato N. 37)



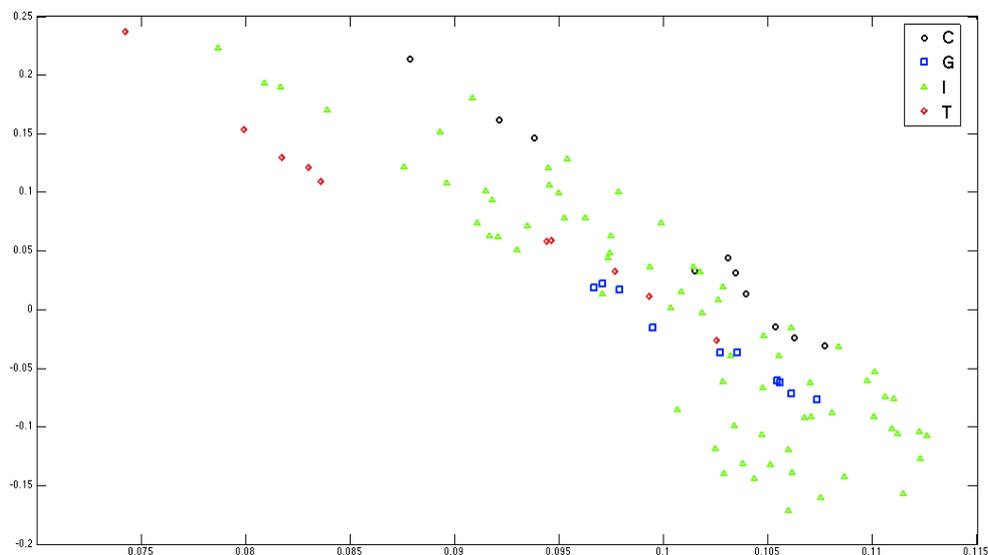
DOCUMENTO ALLEGATO N. II.39

Lipidi neutri della polpa vs Paese di origine: grafico delle prime due componenti principali in relazione alla composizione acidica dei lipidi neutri della polpa per la totalità delle spigole allevate prese in esame e sottoposte a questa analisi (n = 100) (Legenda come in Documento Allegato N. 37)



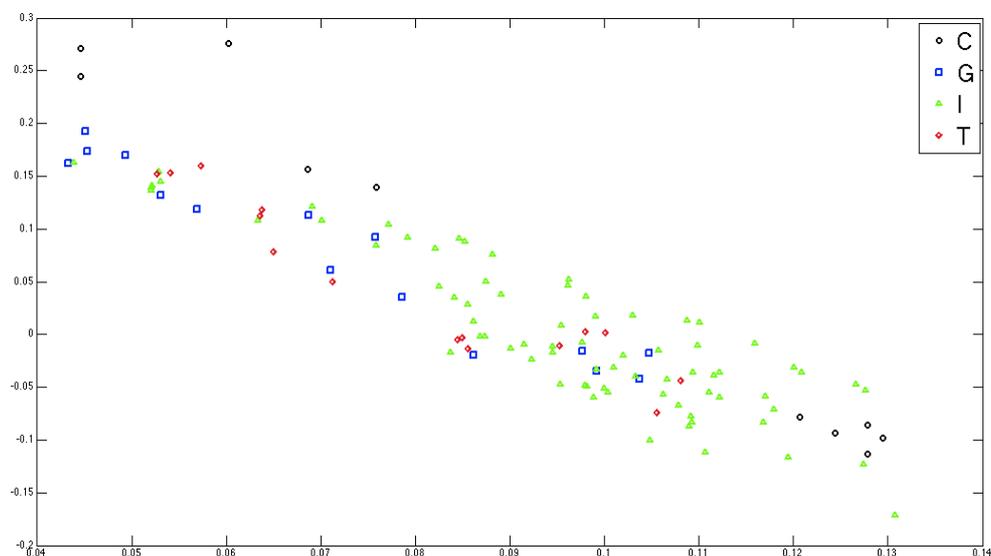
DOCUMENTO ALLEGATO N. II.40

Lipidi polari della polpa vs Paese di origine: grafico delle prime due componenti principali in relazione alla composizione acidica dei lipidi polari della polpa per la totalità delle spigole allevate prese in esame e sottoposte a questa analisi (n = 100) (Legenda come in Documento Allegato N. 37)



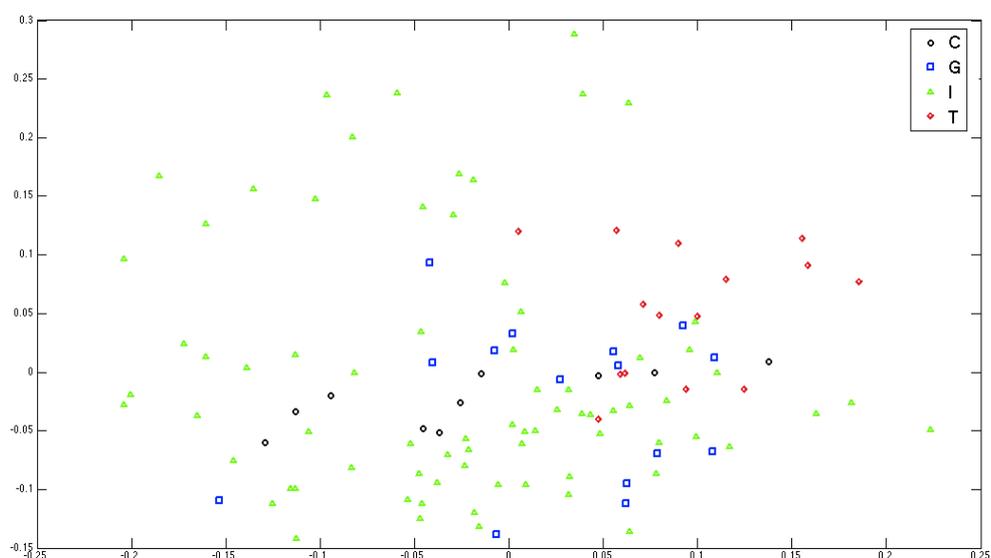
DOCUMENTO ALLEGATO N. II.41

Composizione elementale della polpa vs Paese di origine: grafico delle prime due componenti principali in relazione al tenore in macroelementi, oligoelementi ed elementi tossici della polpa per la totalità delle spigole allevate prese in esame (n = 115) (Legenda come in Documento Allegato N. 37)



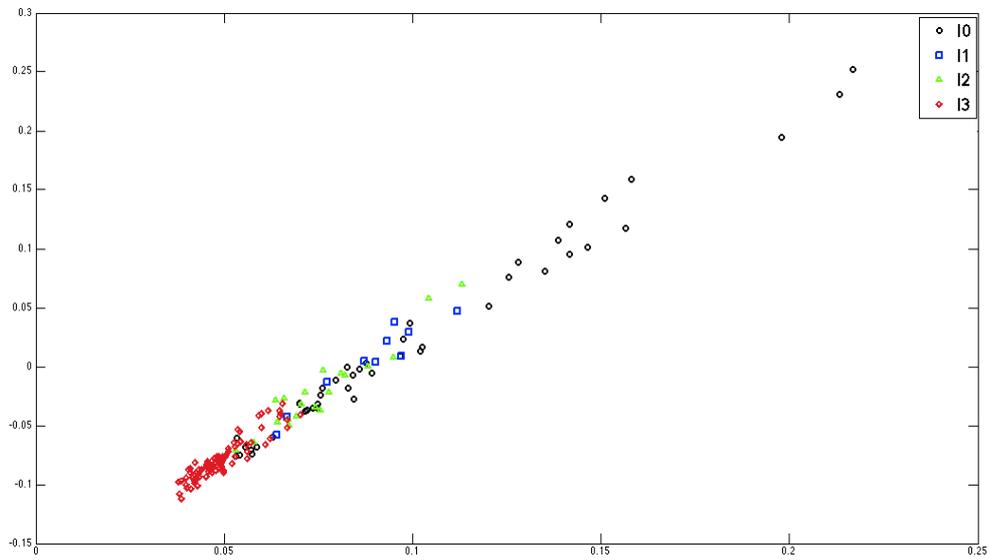
DOCUMENTO ALLEGATO N. II.42

Abbondanze isotopiche relative della polpa vs Paese di origine: grafico delle prime due componenti principali in relazione ai rapporti isotopici stabili per la totalità delle spigole allevate prese in esame (n = 115) (Legenda come in Documento Allegato N. 37)



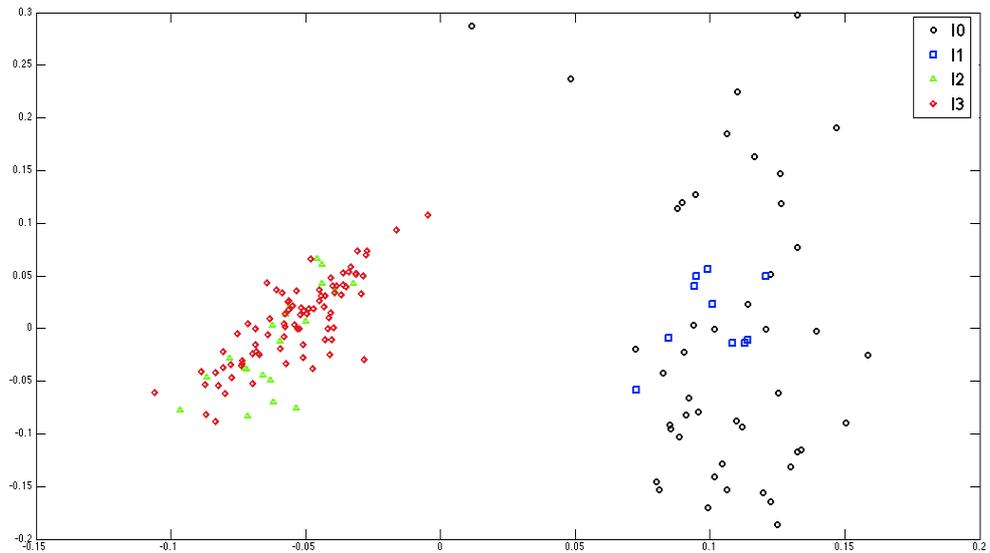
DOCUMENTO ALLEGATO N. II.43

Parametri morfometrici vs “Intensità”: grafico delle prime due componenti principali per la totalità delle spigole prese in esame (n = 160) (I0 = esemplari selvaggi, I1 = esemplari da allevamento estensivo; I2 = esemplari da allevamenti semi-intensivi; I3 = esemplari da allevamenti intensivi)



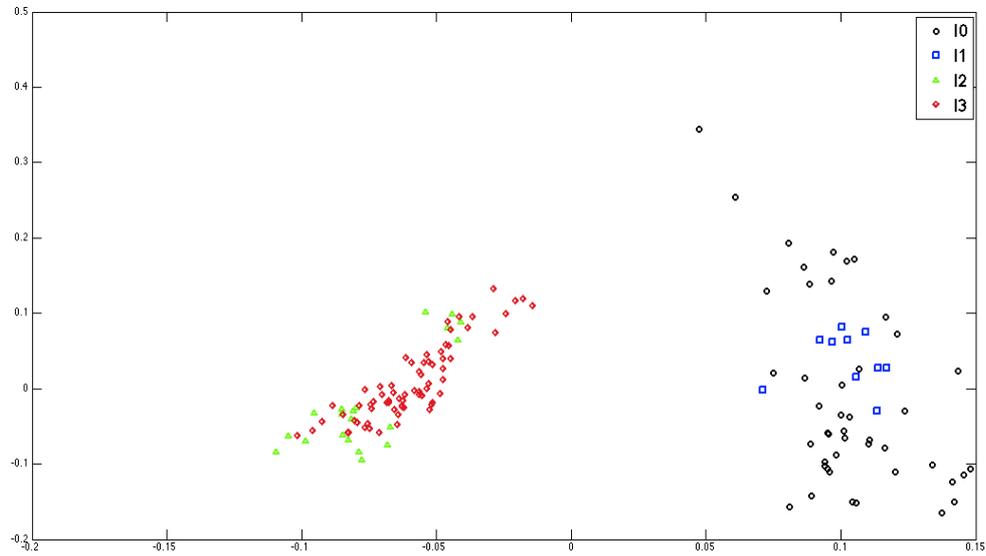
DOCUMENTO ALLEGATO N. II.44

Lipidi totali della polpa vs “Intensità”: grafico delle prime due componenti principali in relazione a umidità, tenore in lipidi totali e composizione acidica dei lipidi totali della polpa per la totalità delle spigole prese in esame (n = 160) (Legenda come in Documento Allegato N. 43)



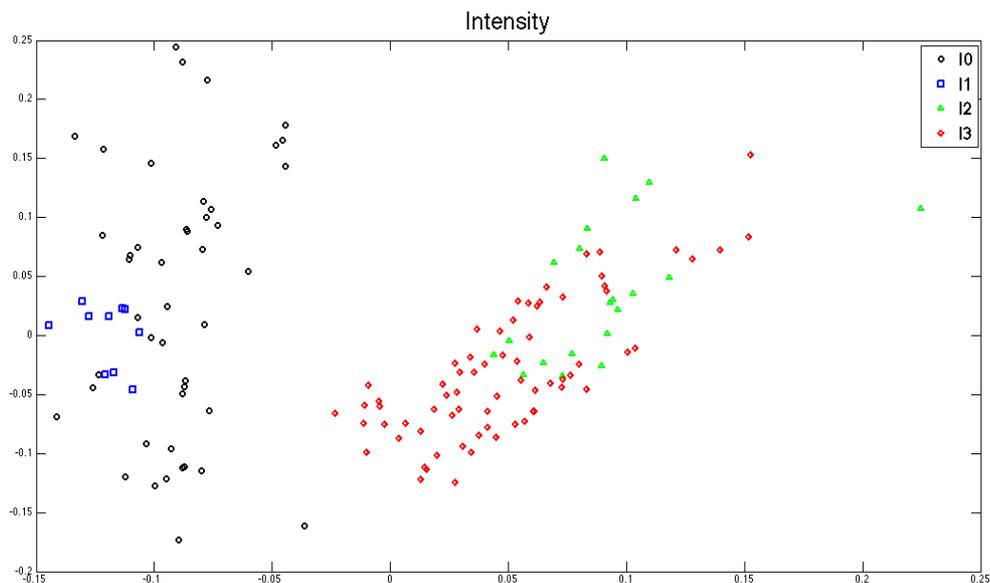
DOCUMENTO ALLEGATO N. II.45

Lipidi neutri della polpa vs “Intensità”: grafico delle prime due componenti principali in relazione alla composizione acidica dei lipidi neutri della polpa per la totalità delle spigole prese in esame e sottoposte a questa analisi (n = 145) (Legenda come in Documento Allegato N. 43)



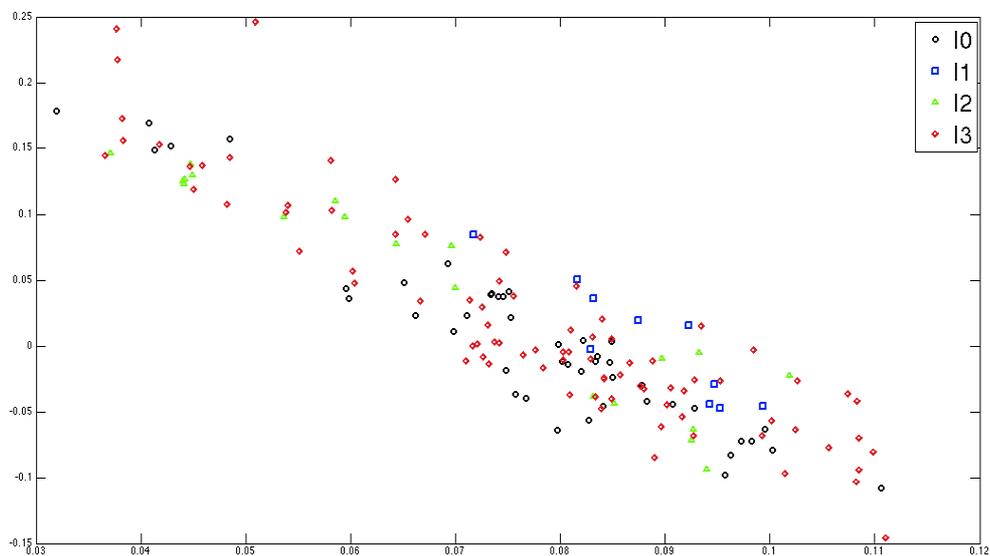
DOCUMENTO ALLEGATO N. II.46

Lipidi polari della polpa vs “Intensità”: grafico delle prime due componenti principali in relazione alla composizione acidica dei lipidi polari della polpa per la totalità delle spigole prese in esame e sottoposte a questa analisi (n = 145) (Legenda come in Documento Allegato N. 43)



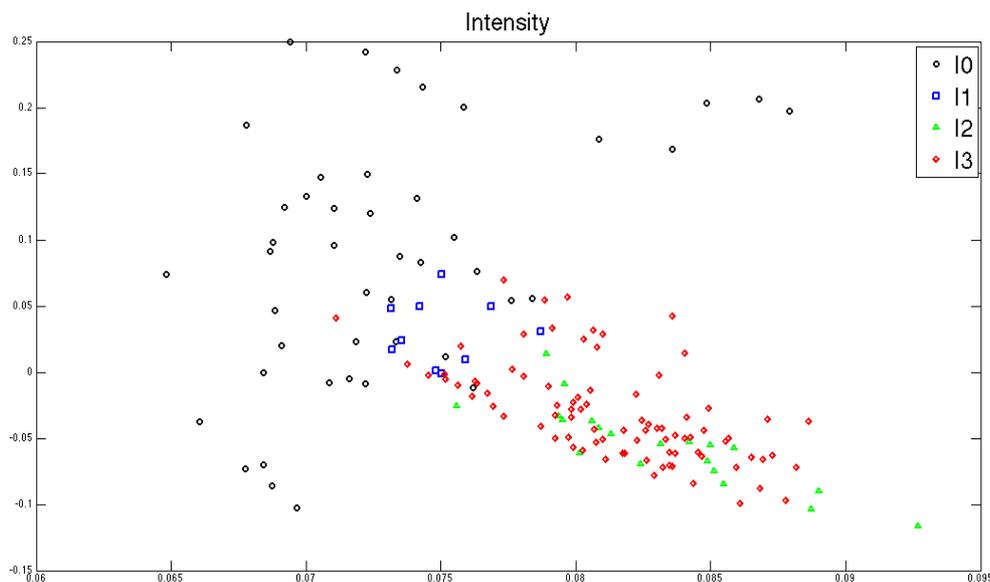
DOCUMENTO ALLEGATO N. II.47

Composizione elementale della polpa vs “Intensità”: grafico delle prime due componenti principali in relazione al tenore in macroelementi, oligoelementi ed elementi tossici della polpa per la totalità delle spigole prese in esame (n = 160) (Legenda come in Documento Allegato N. 43)



DOCUMENTO ALLEGATO N. II.48

Abbondanze isotopiche relative della polpa vs “Intensità”: grafico delle prime due componenti principali in relazione ai rapporti isotopici stabili per la totalità delle spigole prese in esame (n = 160) (Legenda come in Documento Allegato N. 43)



Parte III: Stima della *Freshness Quality*

I consumatori considerano la freschezza come la qualità più importante che deve essere propria dei prodotti ittici non lavorati. All'atto dell'acquisto quindi, siano essi esperti o meno, devono fidarsi delle informazioni ottenute al supermercato o dal rivenditore di fiducia, rimanendo comunque nel dubbio. Considerando questo aspetto, la possibilità, anche da parte dei non addetti ai lavori, di stimare gli attributi di qualità del pesce con metodiche pratiche, dirette, facilmente ripetibili e non distruttive ha impegnato parecchio il mondo della ricerca negli ultimi anni. Basti pensare, per esempio, che, tra la fine del 2010 e gli inizi del 2011, è stata messa a punto un'applicazione per iPhone che aiuta nella valutazione della freschezza del pesce secondo il *Quality Index Method*. (<http://www.nofima.no/marin/en/nyhet/2011/05/fresh-fish-on-your-iphone>), un metodo di cui parlerò nel corso di questa parte della mia dissertazione.

Poter garantire la vendita di prodotti 'freschi come appena pescati' diventa quindi la prerogativa ricercata da tutti gli operatori del settore ittico fresco.

In questo contesto, il progetto coordinato MIPAAF “Valorizzazione della produzione ittica nazionale mediante valutazione dei rischi e standardizzazione della qualità” (2008-2009) è stato portato avanti con l'intento di verificare l'effetto di modalità di ghiacciatura differenti sull'evoluzione della vita commerciale di pesci, molluschi e crostacei. Lo scopo del lavoro, in definitiva, è stato quello di dimostrare come, garantendo un corretto rapporto ghiaccio:pesce già subito dopo la pesca (quindi in barca), sia possibile allungare la vita commerciale dei prodotti pescati, ritardando l'innescamento dei meccanismi di deterioramento e rallentandone il decorso.

Sebbene l'intero progetto fosse costituito da una parte di analisi microbiologiche e da una parte di analisi qualitative (chimiche, fisiche e sensoriali) su esemplari di seppia (*Sepia officinalis*), nasello (*Merluccius merluccius*) e triglia (*Mullus barbatus*), specie tipiche dei nostri mari, in questa sede mi limiterò a presentare i risultati delle analisi qualitative a cui ho preso attivamente parte.

III.1 Introduzione

Secondo la legislazione europea (Regg. 104/2000 e 2065/2001) tra le informazioni

obbligatorie da fornire in etichetta per i prodotti ittici freschi devono essere indicati la specie ittica, il metodo di produzione e la zona di cattura. In questo ambito, nulla si dice riguardo la data di cattura, anche se diventa obbligatorio indicare il termine minimo di conservazione, la data di scadenza o la data di congelamento se il prodotto ittico è venduto preventivamente lavorato (Reg. 1169/2011).

L'importanza di queste informazioni si riconduce al concetto di '*shelf life*', ovvero la vita commerciale del prodotto destinato al consumo.

Sebbene il concetto di '*shelf life*' sia difficile da definire (Barbosa e Brenner, 2002), esso è di fondamentale importanza poiché esprime il periodo di tempo massimo durante il quale gli attributi di qualità del prodotto in esame vengono mantenuti. In letteratura, esiste, tra l'altro, un'interessante discussione su quale sia il reale momento d'inizio della vita commerciale di un prodotto (Morte fisiologica dell'animale? Fuoriuscita dall'acqua?) (Barbosa e Brenner, 2002), ma preferisco, in questo contesto, non addentrarmi in un ambito estremamente interessante ma più inerente alla filosofia che ad una pura ricerca scientifica, perché questo potrebbe distoglierci dallo scopo.

Alla base della volontà di conoscere la '*shelf life*' c'è la richiesta da parte degli operatori alimentari di vendere prodotti sempre freschi e di qualità o, quanto meno, che mantengano queste caratteristiche il più a lungo possibile. Secondo questo principio, quindi, è chiaro come in ambito ittico i concetti di 'qualità' e di 'freschezza' vengano spesso utilizzati insieme, se non sovrapposti, considerato anche che esiste la credenza per cui è possibile garantire la qualità dei prodotti in vendita garantendone la freschezza, senza d'altronde chiedersi cosa realmente i consumatori intendano per qualità. Sembra quasi, infatti, che qualità e freschezza siano considerate più come attributi d'immagine, caratteristiche della cui esistenza nella merce in esame si vorrebbe convincere i consumatori, più che concetti di cui si comprenda l'effettivo significato (Brenner, 2002).

Quanto anticipato spiega perché i termini '*qualità*' e '*freschezza*' siano termini comunemente utilizzati per esprimere una ampia varietà di concetti relativi ai prodotti alimentari (Botta, 1995; Meiselman, 2001), senza però riuscire a definire chiaramente caratteristiche precise dei prodotti in esame (Brenner, 2000, 2002; Brenner e Sakaguchi, 2000; Gärdenfors, 2000). In maniera quasi sistematica, infatti, i concetti 'qualità' e 'freschezza' vengono confusi o sostituiti con i metodi o le misure per determinarli, senza che vengano né specificati, né ricollegati in maniera univoca a quelle caratteristiche che si presuppone contraddistinguano, come, per esempio, la salubrità microbiologica, l'assenza di odori sgradevoli, il colore o la consistenza idonee (Brenner, 2000; Brenner e Sakaguchi, 2000).

Il punto è che i concetti di *'qualità'* e *'freschezza'* sono difficili da definire, da capire e di conseguenza da misurare (Bremner, 2000, 2002; Meiselman, 2001) poiché sono il risultato di diversi fattori, tutti ricollegati al veloce deperimento a cui la matrice ittica è destinata. Da ciò si capisce che, se si considerano *'qualità'* e *'freschezza'* come entità multifattoriali, rappresentarle con una singola misura può risultare semplicistico; inoltre, considerando che *'qualità'* e *'freschezza'* possono essere strettamente legate al contesto in cui vengono misurate, cambiando il contesto, possono cambiare anche le valutazioni su entrambe (Bremner e Sakaguchi, 2000; Meiselman, 2001). Lo scopo di definire i concetti di qualità e freschezza *'per sé'* deve essere quindi quello di dare la possibilità a tutti gli interessati di sapere esattamente ciò che gli operatori alimentari intendono nell'utilizzo di questi termini, relativamente ad un determinato prodotto, in modo da escludere preventivamente eventuali confusioni a riguardo e per capire il motivo per cui vengono usate determinate metodiche piuttosto che altre per definire qualità e freschezza di un alimento. (Bremner, 2002).

Come da vocabolario, con *'qualità'* si intende: “Proprietà che caratterizza una persona, un animale o qualsiasi altro essere, una cosa, un oggetto o una situazione, o un loro insieme organico, come specifico modo di essere, soprattutto in relazione a particolari aspetti e condizioni, attività, funzioni e utilizzazioni. [...] In merceologia e nella pratica commerciale, l'insieme delle proprietà estrinseche e intrinseche di merci, prodotti e materiali” (www.treccani.it/vocabolario/qualità); mentre per *'freschezza'* si intende: “Qualità, condizione di ciò che è fresco, nei vari significati dell'aggettivo. Di alimenti, fatti o preparati da poco: [...] *pesce f.*, pescato da poco (oppure non congelato o surgelato)” (<http://www.treccani.it/vocabolario/freschezza>). Come si può ben capire, il limite delle definizioni da vocabolario è che spesso vengono usati giri di parole per chiarire un concetto, senza arrivare al significato effettivo della parola, fatto che implica l'impossibilità di applicare la parola in esame in modo imparziale e convenzionale alla pratica quotidiana, né di trasmettere un significato univoco (Bremner, 2000).

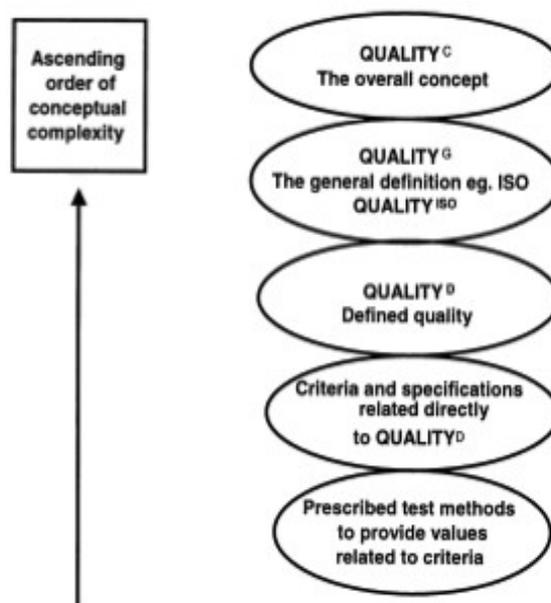
Seconda la norma ISO 9000:2005 (evoluzione delle norme ISO 8402:1994 e successiva ISO 9000:2000 che presto verrà revisionata dalla norma ISO 9000/AWI) (ISO 9000, 2005), la *'qualità'* è “il grado in cui un insieme di caratteristiche intrinseche, cioè di caratteristiche distintive, soddisfa i requisiti, cioè le esigenze o le aspettative che possono essere espresse, generalmente implicite o obbligatorie, di un prodotto in esame”. La *'freschezza'* non viene definita, poiché è considerata una delle caratteristiche intrinseche che definiscono la qualità. Come già dalla prima versione (ISO 8402, 1994), la definizione ISO comprende sia qualità nascoste, sia qualità tangibili, ma non spiega chiaramente cosa può

essere misurato, comportando quindi grandi difficoltà nell'applicare questa definizione a situazioni particolari, a materiali o prodotti specifici (Bremner, 2000).

Esistono altre definizioni per esprimere i concetti di 'qualità' e 'freschezza', strettamente legate al prodotto in sé, al produttore, al consumatore o al valore economico (Meiselman, 2001), ma le problematiche di cui sopra permangono. Per uscire da questo labirinto, Bremner (2000) e Gärdenfors (2000), in lavori indipendenti, hanno proposto un diverso approccio al problema.

Seconda la 'gerarchia nominale' (Bremner, 2000), per definire esattamente cosa sia la qualità di un prodotto alimentare, si deve partire dal concetto ontologico di qualità, di per sé entità non misurabile, detto Qualità^C (qualità concettuale). Di seguito, occorre definire il concetto generale di qualità, come può essere specificato, per esempio, dalle norme ISO, detto Qualità^G (qualità generale). Solo alla fine quindi, si può definire il concetto di qualità strettamente legata al prodotto, alle circostanze o all'utilizzo specifico, detto Qualità^D (definizione di qualità specifica al contesto), definizione che può essere ricondotta a parametri misurati attraverso metodiche standard. In questo modo definizioni strettamente legate ad un contesto vengono ricollegate al concetto primo di qualità senza il rischio di incorrere in malintesi. (vedi Fig. III.1)

Figura III.1 – Spiegazione visiva dell'iter di definizione della qualità secondo Bremner (2000)



Secondo Gärdenfors (2000), per capire un concetto è necessario creare una rappresentazione appropriata di esso. Per arrivare allo scopo è possibile utilizzare l'*approccio simbolico* (per cui si utilizza un simbolo), l'*approccio dell'associazione* (l'associazione tra diverse informazioni conducono al concetto che si vuol rappresentare) o l'*approccio geometrico* (si usano delle dimensioni *geometriche* che per similitudine conducono alla rappresentazione del concetto indagato). Con la teoria degli '*spazi concettuali*', l'autore utilizza l'*approccio geometrico* per spiegare concetti di cui si voglia avere una chiara definizione. Partendo dal presupposto che per rappresentazioni di diversi concetti è possibile determinare una distanza tra essi, più piccola è la distanza tra le rappresentazioni di 2 concetti, maggiore sarà la similitudine tra i concetti in esame. In questo caso, i concetti vengono rappresentati attraverso dimensioni fisiche, geometriche e spaziali, così che uno '*spazio concettuale*' risulti essere un insieme di dimensioni formate, a loro volta, da un determinato numero di domini qualitativi (cioè proprietà caratterizzanti). Così, per esempio, lo '*spazio concettuale*' di qualità è formato dal concetto di 'freschezza', a sua volta rappresentato da un dominio specifico (odore di mare, colore brillante, ecc), dal concetto di 'colore' rappresentato da un altro dominio (brillantezza, tonalità tipica, ecc) o dal concetto di 'consistenza' rappresentato da un altro dominio ancora (elasticità, fibrosità, masticabilità, ecc) e via discorrendo. Questi domini, tuttavia, non sono totalmente indipendenti né sono chiaramente distinti gli uni dagli altri in modo tale che, anche quando si parli di aspetti apparentemente diversi, si possa risalire, attraverso le somiglianze, alla 'struttura' di qualità iniziale.

In definitiva, cercare di definire i concetti di 'qualità' e 'freschezza' e quindi quello di '*shelf life*' ha permesso lo sviluppo di metodiche valide per misurare il livello di qualità dei prodotti in vendita e, eventualmente, per riuscire a conoscere in tempo reale quanto un alimento possa essere considerato idoneo al consumo umano (Meiselman, 2001).

Parte III: Stima della *Freshness Quality*

III.2 Qualità Freschezza e sua rilevazione negli alimenti ittici

Gli alimenti ittici sono caratterizzati da indubbie proprietà nutrizionali e da un alto grado di deperibilità. È sulla valutazione della "Qualità Freschezza", la più nota *Freshness Quality* di lingua inglese, che l'acquirente di pesce, sia esso grossista, ristoratore o consumatore, sente l'esigenza di essere rassicurato.

Il grado di freschezza di una derrata ittica può essere valutato con metodiche chimiche, fisiche, microbiologiche o sensoriali (Bremner e Sakaguchi, 2000). I primi tre approcci, all'apparenza più ripetibili e riproducibili, necessitano comunque della validazione sensoriale, vale a dire dell'esame basato sull'applicazione dei sensi umani ad alcuni caratteri del prodotto che variano con il passare del tempo. Avendo a disposizione un esemplare integro, i caratteri che si vanno a valutare sono l'aspetto generale, la consistenza delle carni, l'occhio, l'odore e il colore delle branchie. Il metodo ufficiale adottato per la valutazione sensoriale della freschezza del pesce è stato già da tempo messo a punto nell'Unione Europea (Reg. CE N. 2406/96).

Le difficoltà applicative che l'accompagnano hanno suggerito ad alcuni ricercatori del Nord Europa la messa a punto di un metodo alternativo, il *Quality Index Method* o QIM (Hyldig e coll., 2007). Sia lo schema comunitario UE, sia il QIM rappresentano un'applicazione particolare dell'analisi sensoriale descrittiva, denominata *Category Scaling*, ma i punti di somiglianza tra i due metodi si fermano qui.

Infatti lo schema UE è stato allestito in versioni distinte per gruppi più o meno folti di specie (per pesce bianco, pesce azzurro, selaci, cefalopodi, crostacei). Mancando di specie-specificità, lo schema comunitario si adatta bene alla specie intorno alla quale è stato costruito (per esempio, è questo il caso dello schema per il pesce azzurro in relazione all'aringa), mentre si applica con più difficoltà alle restanti specie dello stesso gruppo.

Lo schema UE presenta un'ulteriore difficoltà applicativa legata al fatto che, teoricamente, per essere collocato in una determinata categoria di freschezza, un qualsiasi esemplare dovrebbe presentare tutti i parametri distintivi di quella data categoria: questo in realtà accade raramente, in quanto la velocità con cui ciascun parametro evolve al passare del tempo non è la medesima per tutti i parametri. Così, per esempio, l'odore delle branchie "decade" più rapidamente del colore della pelle o della consistenza della carne. Da questo discende che i valutatori, chiamati ad esprimere un giudizio omnicomprensivo sulla freschezza di quel dato esemplare, per formulare un giudizio globale si faranno guidare da alcuni parametri che ritengono, in modo del tutto personale, più importanti rispetto ad altri.

Questa situazione finisce per generare perplessità nei valutatori, chiama in causa interpretazioni piuttosto personali e rende quindi la valutazione sensoriale della freschezza scarsamente ripetibile e riproducibile (Botta, 1995).

Il *Quality Index Method* (QIM) presenta vari elementi di differenziazione dallo schema UE, il più vistoso dei quali consiste nella specie-specificità: ogni schema QIM pubblicato è stato studiato per quella data, singola, specie. Il QIM si fonda sull'osservazione dei

cambiamenti caratteristici che si producono al passare del tempo nel pesce stoccato sotto ghiaccio fondente. Ai cambiamenti che toccano sia l'aspetto esteriore (occhi, pelle, branchie), sia l'odore e la consistenza dell'esemplare della specie in esame si assegna un punteggio di demerito "dedicato" e svincolato da tutte le altre caratteristiche. Il punteggio può andare da 0 a 1, da 0 a 2, da 0 a 3 (eccezionalmente da 0 a 4), dove lo 0 è riservato alla massima espressione di freschezza (Hyldig e coll., 2007).

I punteggi assegnati a ciascun parametro vengono sommati per giungere ad un punteggio complessivo di demerito, il cosiddetto *Quality Index* (QI). In questo modo il giudizio complessivo sullo stato di freschezza scaturisce dalla somma di una serie di valutazioni reciprocamente indipendenti e ciò implica che al valutatore non viene chiesto di ponderare mentalmente se un dato parametro goda o meno di maggiore importanza rispetto ad un altro. Questa valutazione, infatti, è già stata effettuata "a monte", in sede di messa a punto dello schema di valutazione, tenendo conto delle caratteristiche della specie oggetto di studio.

La finalità scientifica, ed estremamente pratica insieme, che nel tempo ha sotteso lo sforzo di allestimento di schemi QIM specie-specifici era e rimane l'ottenimento di un punteggio che cresca linearmente con la durata dello stoccaggio sotto ghiaccio, in modo tale che, data una partita di pesce di una certa specie di cui sia noto il QI in quel momento, sia possibile stimarne con buona approssimazione la vita commerciale residua (Martinsdóttir e coll., 2009).

La valutazione della freschezza con metodi chimici si basa sulla determinazione di alcune sostanze la cui concentrazione varia al passare del tempo dopo la morte dell'animale. Alcune sostanze, quali l'Adenosina Trifosfato (ATP) e i suoi cataboliti, si modificano nell'ambito di reazioni enzimatiche endogene che caratterizzano il primo periodo della evoluzione della freschezza, laddove altre molecole, quali la trimetilammina (TMA), la dimetilammina (DMA) e altri composti azotati volatili, caratterizzano il periodo successivo in cui gioca un ruolo preponderante l'azione della flora microbica che si è sviluppata sulla matrice ittica, quando si parla più di alterazione che di freschezza. I nucleotidi presenti nelle cellule del tessuto muscolare (il già citato ATP, nonché l'Adenosina Difosfato, o ADP, e l'Adenosina Monofosfato, o AMP) iniziano a degradarsi gradualmente, già subito dopo la morte dell'animale, in composti più stabili quali Inosina Monofosfato (IMP), Inosina (HxR) e ipoxantina (Hx), che vanno ad accumularsi nel tessuto muscolare. L'ipoxantina aumenta parallelamente alla perdita di freschezza fino a raggiungere un valore massimo, per poi decrescere nella fase di alterazione. La misura del tenore di ipoxantina fornisce una discreta indicazione sull'andamento della freschezza nelle prime fasi dopo la morte. Di fatto però, la

velocità del catabolismo dei nucleotidi non è costante ma varia al variare della temperatura, della specie, dello stato fisiologico del pesce. E' stato osservato che in alcuni pesci si accumula maggiormente inosina e in altri, invece, ipoxantina. Perciò la sola determinazione del contenuto di ipoxantina non sempre è sufficiente a fornire informazioni sulla freschezza del pesce. Per questo motivo sono stati messi a punto diversi indici (K, K₁, G, P, H, Fr, le cui modalità di calcolo saranno illustrate nel prosieguo) che, rappresentando il rapporto percentuale dei diversi nucleotidi tra di loro, possono meglio evidenziare l'andamento del processo e sono meglio correlati alle osservazioni sensoriali (Howgate, 2006).

Le proprietà dielettriche della pelle e del sottostante tessuto muscolare nel pesce, proprietà che variano a causa delle modificazioni biochimiche successive alla morte, sono alla base dei metodi fisici utilizzati per la valutazione dell'evoluzione della freschezza. Due strumenti basati su questo fenomeno si sono affermati col tempo, uno di progettazione tedesca (Fish Tester), l'altro, più recente, di progettazione inglese (Fish Freshness Meter o Torrymeter). Tali strumenti, che funzionano per semplice contatto e debbono essere calibrati per la specie esaminata, forniscono una misura analogica o digitale, comunque in genere ben correlata al grado di freschezza del pesce. L'uso è però limitato al prodotto fresco, con la pelle; i risultati non sono soddisfacenti se il prodotto è danneggiato, oppure se i filetti sono senza pelle, o, ancora, con matrice decongelata. Inoltre, le misure sono influenzate dalla temperatura, sicché si devono usare accorgimenti per standardizzare le condizioni operative e rendere riproducibili le valutazioni (Kent e Oehlenschläger, 2009).

III.3 Materiali e Metodi

III.3.1 Il campionamento e le Tesi a confronto

III.3.1.1 Seppia (*Sepia officinalis*)

Nel periodo compreso fra il maggio e il luglio 2009, in sei distinte occasioni, sono stati consegnati presso il laboratorio del Corso di Laurea in Acquacoltura e Igiene delle Produzioni Ittiche (Cesenatico, FC) 243 esemplari di seppia (*Sepia officinalis*). Di questi, 108 provenivano da attività di pesca effettuata nel Mar Tirreno e 135 provenivano dal Mar Adriatico. Per ciascuna delle sei repliche di valutazione, in **Tabella III.1** sono riportati: data di consegna, mare di provenienza degli esemplari, tipo di pesca praticato, numero di esemplari, loro peso medio e pertinente campo di variazione (minimo – massimo).

Tabella III.1 – Caratterizzazione dei lotti di seppia oggetto di indagine

Replica	Data	Mare	Tipo di Pesca	Numero esemplari	Peso (g) (media±d.s.)	Minimo (g)	Massimo (g)
1	11/05	Tirreno	Strascico	36	388 ± 168	114	836
2	19/05	Tirreno	<i>idem c.s.</i>	36	363 ± 139	151	652
3	25/05	Tirreno	<i>idem c.s.</i>	36	330 ± 166	126	814
4	23/06	Adriatico	Attrezzo da posta (Bertovello)	45	223 ± 95	92	579
5	30/06	Adriatico	<i>idem c.s.</i>	45	131 ± 22	74	179
6	07/07	Adriatico	<i>idem c.s.</i>	45	177 ± 50	78	306

Volendo valutare l'effetto della "ghiacciatura" effettuata nei primissimi momenti dopo la pesca sull'evoluzione della freschezza dei molluschi, le Tesi a confronto venivano allestite direttamente in barca. I molluschi venivano sistemati in cassette di polistirolo auto-drenanti e le Tesi a confronto erano:

Tesi 1: seppie coperte da uno strato di ghiaccio (acqua dolce) dello spessore di circa 1.5 cm ("ghiaccio sopra");

Tesi 2: seppie disposte su uno strato di ghiaccio (acqua dolce) dello spessore di circa 1.5 cm ("ghiaccio sotto");

Tesi 3: seppie stoccate in assenza di ghiaccio ("senza ghiaccio").

Il trasporto degli esemplari dalla barca al laboratorio veniva effettuato in condizioni di refrigerazione. All'arrivo in laboratorio gli esemplari venivano contati, controllati e collocati in cassette di polistirolo auto-drenanti poste in un frigorifero settato a + 2°C. Per l'intera durata dello stoccaggio, ghiaccio di acqua dolce veniva aggiunto quando necessario in modo tale che le seppie della Tesi 1 mantenessero la copertura di ghiaccio (spessore 1.5 cm ca) e che le seppie della Tesi 2, al pari di quelle della Tesi 3, fossero disposte su un letto di ghiaccio (spessore 1.5 cm ca).

Le valutazioni dirette a fornire una stima per via sensoriale, chimica e fisica della freschezza degli esemplari in stoccaggio sono state effettuate ai giorni 0 (solo per gli esemplari pescati in Adriatico), 1, 2, 3 e 6 dalla pesca (a seguire rispettivamente designati come T₀, T₁, T₂, T₃ e T₆) su tre esemplari per ciascuna Tesi, che, conseguentemente, uscivano dalla sperimentazione.

La prova ha avuto termine con il sesto giorno di stoccaggio, anticipatamente rispetto al raggiungimento della fine della vita commerciale della derrata, in quanto l'enfasi di questa verifica sperimentale era sulla prima parte della stessa.

III.3.1.2 Nasello (*Merluccius merluccius*)

Nel periodo compreso fra il gennaio e il marzo 2009, in sei distinte occasioni, sono

stati consegnati presso il laboratorio del Corso di Laurea in Acquacoltura e Igiene delle Produzioni Ittiche (Cesenatico, FC) 498 esemplari di nasello (*Merluccius merluccius*). Di questi, 184 provenivano da attività di pesca a strascico effettuata nel Mar Adriatico, mentre 314 provenivano da analoga attività nel Mar Tirreno. I primi erano stati eviscerati dalle branchie già a bordo, come è costumanza.

All'arrivo in laboratorio, i pesci, già suddivisi nelle Tesi sperimentali (vedi a seguire), venivano contati, pesati e ridistribuiti per comporre gruppi di esemplari di taglia quanto più uniforme possibile. In particolare, nelle repliche provenienti dal Tirreno il numero degli animali forniti era maggiore rispetto a quello delle repliche provenienti dall'Adriatico, ma l'eterogeneità di taglia era più spinta. La suddivisione degli esemplari in categorie di peso, sempre entro Tesi, era finalizzata ad escludere gli esemplari di mole troppo piccola, come pure quelli troppo grandi. In ogni caso, si tenevano almeno 60 esemplari per replica per il periodo di stoccaggio. Di questi 60 esemplari, una parte veniva analizzata per le rilevazioni di carattere sensoriale, chimico e fisico, mentre la restante parte era destinata al prelievo microbiologico.

Per ciascuna delle sei repliche di valutazione, in **Tabella III.2** sono riportati: data di consegna, mare di provenienza degli esemplari, numero di esemplari, loro peso medio e lunghezza media, coi pertinenti campi di variazione (minimo – massimo).

Tabella III.2 – Caratterizzazione dei lotti di nasello oggetto di indagine

Replica	Data	Mare	N°	Peso (g) (media ± d.s.)	Peso min (g)	Peso max (g)	Lung.(cm) (media ± d.s.)	Lung. min	Lung. max
1	20/01	Adriatico	30	164 ± 25	124	215	28.1 ± 1.6	25.8	31.0
2	03/02	Adriatico	30	246 ± 66	154	403	31.7 ± 2.5	27.6	37.5
3	10/02	Adriatico	30	239 ± 72	153	431	31.5 ± 2.9	27.2	38.0
4	11/03	Tirreno	24	121 ± 86	43	351	24.6 ± 5.3	19.0	35.0
5	18/03	Tirreno	24	123 ± 50	57	247	25.5 ± 3.2	20.5	32.8
6	31/03	Tirreno	24	156 ± 72	70	367	26.9 ± 3.5	21.7	35.5

Volendo valutare l'effetto della “ghiacciatura” effettuata nei primissimi momenti dopo la pesca sull'evoluzione della freschezza dei naselli, le Tesi a confronto venivano allestite direttamente in barca. I pesci venivano sistemati in cassette di polistirolo auto-drenanti, differenziando le Tesi a confronto per il rapporto ghiaccio (di acqua dolce) : pesce, come precisato a seguire:

- **Tesi 1:** rapporto ghiaccio : pesce = 1 : 10 (“poco ghiaccio”);
- **Tesi 2:** rapporto ghiaccio : pesce = 1 : 3 (“molto ghiaccio”),

Il trasporto degli esemplari dalla barca al laboratorio veniva effettuato in condizioni di refrigerazione. All'arrivo in laboratorio gli esemplari venivano contati, controllati e collocati in cassette di polistirolo auto-drenanti poste in un frigorifero settato a + 2°C. Per l'intera

durata dello stoccaggio, ghiaccio di acqua dolce veniva aggiunto quando necessario, in modo tale che i pesci delle due Tesi, pur rimanendo separati, ricevessero il medesimo trattamento, nello specifico la copertura con ghiaccio in rapporto 1 : 3.

Le valutazioni dirette a fornire una stima per via sensoriale, chimica e fisica della freschezza degli esemplari in stoccaggio provenienti dall'Adriatico sono state effettuate ai giorni 1, 3, 6, 8 e 10 dalla pesca, mentre quelle relative ai naselli provenienti dal Tirreno sono state condotte ai giorni 2, 3, 6, 8 e 10 dalla pesca (momenti designati sinteticamente a seguire come T₁, T₂, T₃, T₆, T₈ e T₁₀). Ad esserne interessati erano tre esemplari per ciascuna Tesi, che, conseguentemente, uscivano dalla sperimentazione.

La sperimentazione ha avuto termine con il decimo giorno di stoccaggio, in pratica a ridosso del termine della vita commerciale della derrata.

III.3.1.3 Triglia di fango (*Mullus barbatus*)

Nel periodo compreso fra il novembre 2009 e il febbraio 2010, in sei distinte occasioni, sono stati consegnati presso il laboratorio del Corso di Laurea in Acquacoltura e Igiene delle Produzioni Ittiche (Cesenatico, FC) sei lotti di triglia di fango (*Mullus barbatus*). Di questi lotti, tre provenivano da attività di pesca a strascico effettuata nel Mar Adriatico, mentre i restanti tre provenivano da analoga attività nel Mar Tirreno. Al pari di quanto visto per i naselli, anche per le triglie provenienti dall'Adriatico era stata praticata l'eviscerazione dalle branchie, direttamente a bordo.

All'arrivo in laboratorio, i pesci, già suddivisi nelle Tesi sperimentali (vedi a seguire), venivano contati, pesati e ridistribuiti per allestire gruppi di esemplari di taglia quanto più uniforme possibile. Questo portava ad ottenere due cassette contenenti almeno 40 esemplari per Tesi entro ogni occasione di campionamento. Di questi 40 esemplari, una parte veniva analizzata per le rilevazioni di carattere sensoriale, chimico e fisico, mentre la restante parte era destinata al prelievo microbiologico.

Per ciascuna delle sei repliche di valutazione, in **Tabella III.3** sono riportati: data di consegna, mare di provenienza degli esemplari, numero di esemplari, loro peso medio e lunghezza media, coi pertinenti campi di variazione (minimo – massimo).

Tabella III.3 – Caratterizzazione dei lotti di triglia oggetto di indagine

Replica	Data	Mare	N°	Peso (g) (media ± d.s.)	Peso min (g)	Peso max (g)	Lung.(cm) (media ± d.s.)	Lung. min	Lung. max
1	09/11	Adriatico	30	53.2 ± 18.6	27.1	92.0	16.5 ± 2.03	11.5	20.8
2	18/11	Adriatico	30	49.1 ± 11.3	31.1	73.3	16.6 ± 1.08	14.7	18.5
3	25/11	Adriatico	30	57.0 ± 11.1	39.0	89.1	17.1 ± 1.01	15.3	19.7
4	15/12	Tirreno	18	50.0 ± 8.74	40.9	67.3	16.5 ± 0.77	15.5	18.2
5	20/01	Tirreno	24	63.0 ± 12.0	44.7	94.6	17.7 ± 1.18	15.5	20.5
6	29/01	Tirreno	24	69.6 ± 15.3	42.4	97.0	18.2 ± 1.13	16.1	20.1

Volendo valutare l'effetto della "ghiacciatura" effettuata nei primissimi momenti dopo la pesca sull'evoluzione della freschezza delle triglie, le Tesi a confronto venivano allestite direttamente in barca. I pesci venivano sistemati in cassette di polistirolo auto-drenanti, differenziando le Tesi a confronto per il rapporto ghiaccio (di acqua dolce) : pesce, come precisato a seguire:

Tesi 1: rapporto ghiaccio : pesce = 1 : 10 ("poco ghiaccio");

Tesi 2: rapporto ghiaccio : pesce = 1 : 3 ("molto ghiaccio").

Il trasporto degli esemplari dalla barca al laboratorio veniva effettuato in condizioni di refrigerazione. All'arrivo in laboratorio gli esemplari venivano contati, controllati e collocati in cassette di polistirolo auto-drenanti poste in un frigorifero settato a + 2°C. Per l'intera durata dello stoccaggio, ghiaccio di acqua dolce veniva aggiunto quando necessario, in modo che i pesci delle due Tesi, pur rimanendo separati, ricevessero il medesimo trattamento, nello specifico la copertura con ghiaccio in rapporto 1 : 3.

Le valutazioni dirette a fornire una stima per via sensoriale, chimica e fisica della freschezza delle triglie in stoccaggio provenienti dal Tirreno sono state effettuate ai giorni 1, 3, 6 e 8 dalla pesca (momenti designati sinteticamente a seguire come T₁, T₃, T₆ e T₈). Per gli esemplari provenienti dall'Adriatico a questi stessi giorni, ma limitatamente alle rilevazioni chimiche e fisiche, si è aggiunto il giorno 0, per approfondire, nei limiti del possibile, la caratterizzazione del prodotto appena catturato. Per entrambi i mari e per ciascuna Tesi, venivano esaminati tre esemplari, che, conseguentemente, uscivano dalla sperimentazione.

La sperimentazione ha avuto termine con l'ottavo giorno di stoccaggio.

III.3.2 Valutazione della freschezza per via sensoriale

Le valutazioni sensoriali della freschezza sono state condotte da un *panel* composto da cinque valutatori addestrati (o *panellisti*) per seppia, mentre per nasello e triglia i panellisti erano quattro.

Il laboratorio in cui si svolgeva la valutazione sensoriale della freschezza era allestito con postazioni singole, sotto luce a giorno con una temperatura di colore di 6500°K erogata

da tubi fluorescenti Philips Master TL-D 36W/865, che garantivano sull'area di lavoro un'intensità d'illuminazione media pari a 1200 lux (campo di variazione 851 ÷ 1360 lux).

L'ambiente in cui venivano effettuate le valutazioni sensoriali era climatizzato e mantenuto alla temperatura di 20°C. In ogni caso, per evitare inconvenienti connessi alla permanenza fuori frigo durante le valutazioni, ciascun esemplare da esaminare giaceva su una capsula refrigerante (cm 23 × 12 × 4.5) previamente mantenuta per 22 ore fra 0 e +2°C.

Le valutazioni sensoriali della freschezza erano condotte sia conformemente alla pertinente griglia di valutazione UE (Reg. CE N. 2406/96), sia allo schema QIM (*Quality Index Method*) specie-specifico.

In dettaglio, alla seppia si applicava la griglia UE relativa ai cefalopodi (**Tabella III.4**), illustrata a seguire.

Tabella III.4 - Griglia di valutazione per molluschi Cefalopodi (Reg. CE N. 2406/96)

CRITERI			
Categoria di freschezza	EXTRA	A	B
PELLE	Pigmentazione viva, pelle aderente alla carne	Pigmentazione spenta; pelle aderente alla carne	Decolorazione; la pelle si stacca facilmente dalla carne
CARNE	Molto soda; color bianco madreperla	Soda; color bianco gesso	Leggermente molle; bianco rosato o leggermente ingiallita
TENTACOLI	Resistenti alla trazione	Resistenti alla trazione	Meno resistenti alla trazione
ODORE	Fresco; d'alghe marine	Lieve o assente	Odore d'inchiostro

Sempre con riferimento alla griglia UE, al nasello e alla triglia veniva applicato lo schema per il "Pesce bianco" (**Tabella III.5**).

Tabella III.5 - Griglia di valutazione per pesce bianco (Reg. CE N. 2406/96)

CRITERI				
Categoria di freschezza	EXTRA	A	B	Non ammesso
PELLE	Pigmento vivo e cangiante (ad eccezione dei sebasti) o opalescente; senza tracce di decolorazione	Pigmentazione viva ma priva di lucentezza	Pigmentazione spenta in via di decolorazione	Pigmentazione spenta
MUCO CUTANEO	Acquoso, trasparente	Leggermente torbido	Lattiginoso	Muco grigio-giallognolo, opaco
OCCHIO	Convesso (sporgente); pupilla nera brillante; cornea trasparente	Convesso e leggermente infossato; pupilla nera spenta; cornea leggermente opalescente	Piatto; cornea opalescente; pupilla opaca	Concavo al centro; pupilla grigia; cornea lattiginosa
BRANCHIE	Colore vivo; senza muco	Meno colorato; muco trasparente	Bruno/grigio in via di decolorazione; muco opaco e spesso	Giallognolo; muco lattiginoso
PERITONEO (nel pesce senza visceri)	Liscio; brillante; aderisce bene alla carne	Un po' opaco; può staccarsi dalla carne	Grumoso; si stacca facilmente dalla carne	Non resta attaccato
ODORE BRANCHIE E CAVITÀ ADDOMINALE				
ü pesce bianco esclusa la passera di mare	Di alghe marine	Senza odore di alghe marine; odore neutro	Odore di fermentazione; leggermente acre	Acre
ü passera di mare	Di olio fresco; peperino; odore di terra	Di olio; di alghe marine o leggermente dolciastro	Di olio; di fermentazione, di stantio, leggermente rancido	Acre
CARNE	Soda ed elastica; superficie liscia	Meno elastica	Leggermente molle (flaccida), meno elastica, superficie cerea (vellutata) e spenta	Molle (flaccida); le squame si staccano facilmente dalla pelle, superficie piuttosto rugosa

Quanto agli schemi QIM specie-specifici, quello da applicare alla seppia è stato ricavato dal lavoro di Sykes e coll. (2009), modificato (**Tabella III.6**) per escludere la valutazione di parametri che presuppongano, a carico degli esemplari in studio, manovre distruttive non compatibili con la valutazione di ciascun esemplare da parte di più panellisti, oltre a quello che, per l'appunto, le compie per primo.

Lo schema QIM applicato al nasello (**Tabella III.7**) è fedele a quello proposto da Triqui (2006), mentre per valutare la triglia di fango (**Tabella III.8**) si è preliminarmente verificata, con esito positivo, l'adattabilità a questa dello schema ideato da Bekaert e coll. (2007) per la triglia di scoglio (*Mullus surmuletus*). Alla verifica, infatti, è emerso che l'unica differenza fra le due specie era relativa al colore della pelle negli esemplari freschissimi (rosso-arancio in *M. surmuletus*, rosa in *M. barbatus*).

Tabella III.6 - Schema QIM per Seppia (*Sepia officinalis*), modificato da Sykes e coll. (2009)

Parametri	Descrizione	Punteggio
Aspetto superficiale		
Faccia dorsale	Brunastro con pigmentazione brillante, osso indistinto	0
	Ancora brunastro, ma con tonalità rosa, osso più distinto	1
	Da marrone a rosa scuro, osso ben distinguibile	2
Faccia ventrale	Bianca iridescente e brillante, mantello piatto	0
	Bianca ma meno iridescente, mantello leggermente infossato con qualche smagliatura	1
	Rosa, senza iridescenza; mantello infossato con smagliature	2
Pelle	Ben aderente alle carne, resistente	0
	Non aderente ma ancora resistente	1
	Non aderente, si rompe facilmente	2
Odore	Di alghe marine, di fresco	0
	Metallico o neutro	1
	Stantio o di erba marcia	2
	Ammoniacale, acido o di decomposizione	3
Occhi		
Colore pupilla	Nero	0
	Purpureo	1
	Lilla	2
	Bianco, lattiginoso	3
Limpidezza Cornea	Chiara, trasparente	0
	Opalescente, velata	1
	Lattescente, opaca	2
Testa		
Ventose	Ben adese, resistenti	0
	Leggermente staccabili (3 - 5 per tentacolo)	1
	Staccabili (>5 per tentacolo)	2
Tentacoli	Resistenti, non si rompono quando tirati	0
	Ancora resistenti, ma si rompono quando tirati	1
	Non resistenti, si rompono facilmente quando tirati	2
Forma	Testa compatta, globo oculare ben definito	0
	Testa e globo oculare leggermente infossato	1
	Testa e globo oculare infossato e acquoso	2
Punteggio Complessivo di Demerito		0-20

Tabella III.7 - Schema QIM per Nasello (*Merluccius merluccius*), secondo Triqui (2006)

Parametri	Descrizione	Punteggio
Aspetto generale		
Aspetto superficiale	Grigio brillante	0
	Grigio, meno brillante	1
	Grigio (sfumature rosa nella regione dorsale)	2
	Grigio (sfumature giallo-rosa nella regione dorsale)	3
Consistenza della carne (regione dorsale)	Soda, elastica	0
	Soda, meno elastica	1
	Meno soda, molto meno elastica	2
	Molle	3
Occhio		
Limpidezza cornea	Trasparente, brillante	0
	Leggermente opalescente	1
	Opalescente	2
	Opalescente, con macchie di sangue	3
Colore della pupilla	Nera, brillante	0
	Nera grigiastria	1
	Nera grigiastria (tipica della cataratta)	2
	Grigia, biancastra	3
Forma	Piatto	0
	Leggermente concavo	1
	Concavo	2
Branchie		
Colore	Rosso scuro o rosso brillante, poco muco traslucido	0
	Rosso scuro o rosso intenso, muco leggermente opalescente	1
	Rosso scuro, muco opalescente e denso	2
	Rosso scolorito, muco giallo-brunastro	3
Odore	Fresco, di alghe marine	0
	Fresco, meno intenso di alghe marine	1
	Neutro	2
	Leggermente acido o pungente, fruttato	3
	Acido o pungente o amaro o rancido	4
Punteggio complessivo di demerito		0-21

Tabella III.8 - Schema QIM per Triglia di fan (*Mullus barbatus*), secondo Bekaert e coll. (2007)

Parametri	Descrizione	Punteggio
Aspetto generale		
Pelle	Fresco, brillante, colori chiari, rosa, muco limpido, presenza di squame	0
	Colori meno brillanti, meno lucenti, muco lattiginoso	1
	Colori spenti, in via di decolorazione, grigio, porpora, muco giallo	2
	Colori spenti e deteriorati, grigio, assenza di squame	3
Consistenza della carne (regione dorsale)	In rigor	0
	Soda, elastica	1
	Meno soda, meno elastica	2
Occhio		
Forma	Convesso	0
	Piatto, leggermente infossato	1
	Infossato, concavo	2
Limpidezza della cornea	Limpida, brillante	0
	Leggermente opaca, spenta, meno brillante	1
	Lattiginosa, grigia	2
Colore della pupilla	Limpido, nero, il cerchio giallo intorno alla pupilla è limpido	0
	Spento, il cerchio giallo intorno alla pupilla è meno brillante	1
	Lattiginoso, grigio, il cerchio giallo intorno alla pupilla è scolorito	2
Branchie		
Colore	Lucente, rosso brillante	0
	Meno lucente, rosso	1
	Decolorazione incipiente, in particolare i contorni delle lamelle, opercolo scolorito	2
	Scolorimento giallo-brunastro	3
Odore	Fresco, di alghe marine, metallico	0
	Neutro, meno fresco, di erba, metallico	1
	Un po' di muffa, un po' acido	2
	Molto acido, di muffa, fecale, di putrefazione	3
Muco	Limpido	0
	Lattiginoso, lamelle appiccicose	1
	Giallo, bruno	2
Pareti dell'addome*	Traslucide, azzurrognole	0
*triglie eviscerate	Leggermente scolorite, aspetto ceroso	1
	Gialle, macchie brune	2
Sangue in addome		
Colore	Brillante, rosso	0
	Rosso scuro	1
	Bruno	2
Punteggio complessivo di demerito		0 – 23

Al termine delle sessioni di addestramento all'uso di ciascun schema QIM, si è anche valutato il grado di concordanza raggiunto tra i panellisti nell'assegnazione dei punteggi, misurata con il “Coefficiente di Correlazione Intra-Classe (ICC)” e il relativo intervallo di confidenza al 95%, come momento di verifica della correttezza del lavoro svolto dallo “strumento Panel” ed elemento di valutazione della facilità con cui i panellisti stessi avevano imparato a graduare il giudizio su ciascun parametro. In accordo con quanto proposto da Landis e Koch (1977), la concordanza è stata considerata assente per valori di ICC inferiori a 0.2, debole per valori tra 0.2 e 0.4, moderata per valori tra 0.4 e 0.6, sostanziale per valori tra 0.6 e 0.8, quasi perfetta per valori tra 0.8 e 1.

Come si evince dalla **Tabella III.9**, il grado di concordanza raggiunto fra i panellisti nell'uso del QIM seppia era molto buono. Tra i parametri individuali il coefficiente più elevato (quindi la migliore concordanza) si è ottenuto per l'aspetto superficiale (dorsale e ventrale), mentre quello più basso per il parametro limpidezza della cornea. Ottima la concordanza fra panellisti, e chiusa entro un intervallo di confidenza molto ristretto, quando stimata in relazione al QIM Totale.

Tabella III.9 – Correlazione Intra-Classe tra i panellisti per il QIM seppia

Parametro	ICC	Intervallo di confidenza al 95%	
		Limite inferiore	Limite superiore
<i>Aspetto superficiale dorsale</i>	0.925	0.901	0.943
<i>Aspetto superficiale ventrale</i>	0.939	0.920	0.953
Pelle	0.893	0.861	0.918
Odore	0.895	0.861	0.922
Colore della pupilla	0.901	0.871	0.925
<i>Limpidezza della cornea</i>	0.857	0.811	0.893
Ventose	0.879	0.846	0.907
Tentacoli	0.913	0.888	0.934
<i>Forma della testa</i>	0.874	0.839	0.903
QIM Totale	0.970	0.962	0.977

Anche per il nasello il grado di concordanza raggiunto globalmente fra i panellisti era molto buono (**Tabella III.10**). Tra i parametri individuali il coefficiente più elevato si è ottenuto per il colore delle branchie, mentre quello più basso, ancora una volta, è emerso per la limpidezza della cornea.

Tabella III.10 - Correlazione Intra-Classe tra i panellisti per il QIM nasello

Parametro	ICC	Intervallo di confidenza al 95%	
		Limite inferiore	Limite superiore
<i>Aspetto superficiale</i>	0.930	0.902	0.950
Consistenza della carne	0.925	0.895	0.947
Limpidezza della cornea	0.863	0.808	0.904
Colore della pupilla	0.914	0.867	0.944
Forma dell'occhio	0.901	0.864	0.929
Colore delle branchie	0.952	0.934	0.965
Odore delle branchie	0.939	0.915	0.957
QIM Totale	0.967	0.950	0.978

Infine, il grado di concordanza fra panellisti, per quanto buono, è stato meno soddisfacente in occasione dell'applicazione del QIM triglia (Tabella III.11), per la quale specie il parametro su cui era più facile trovare concordanza di giudizio era l'odore delle branchie, mentre il minor grado di accordo emergeva per la consistenza della carne. Leggermente inferiore (e più disperso) rispetto a quanto registrato per le altre due specie il grado di concordanza registrato per il punteggio totale.

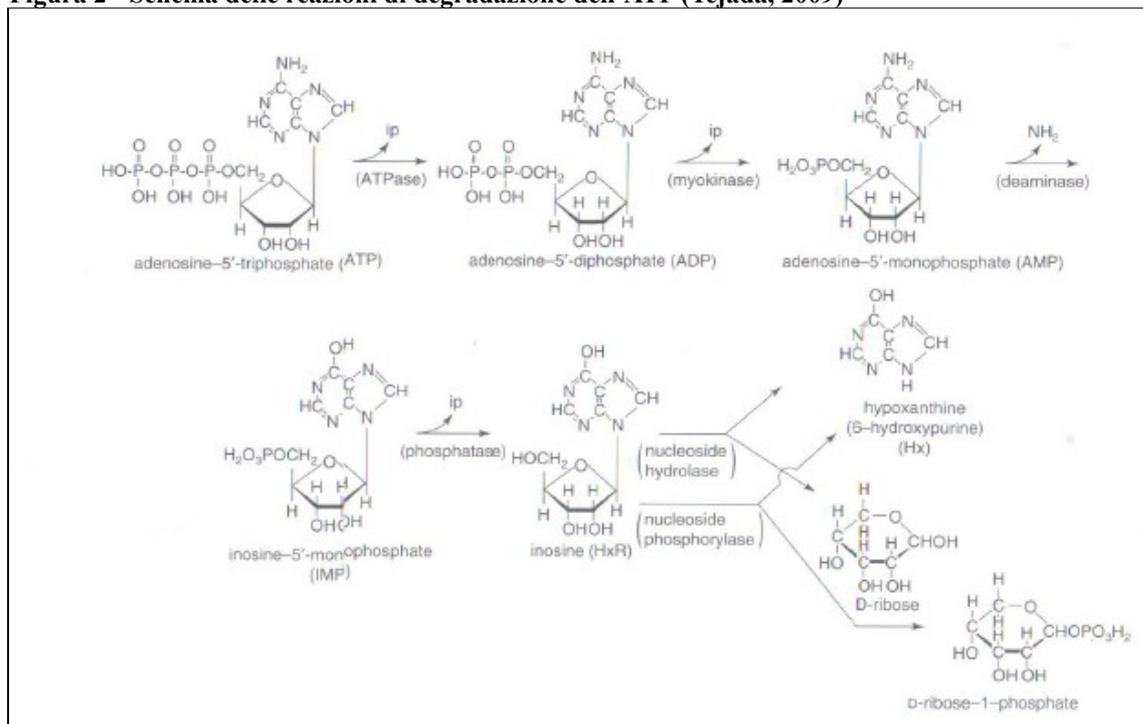
Tabella III.11 - Correlazione Intra-Classe tra i panellisti per il QIM triglia

Parametro	ICC	Intervallo di confidenza al 95%	
		Limite inferiore	Limite superiore
Aspetto generale	0.860	0.763	0.915
Consistenza della carne	0.681	0.546	0.783
Forma dell'occhio	0.866	0.809	0.909
Limpidezza della cornea	0.876	0.816	0.918
Colore della pupilla	0.832	0.727	0.895
Colore delle branchie	0.895	0.838	0.932
Odore delle branchie	0.931	0.901	0.953
Muco sulle branchie	0.750	0.505	0.862
Pareti dell'addome	0.846	0.751	0.904
<i>Sangue in addome</i>	0.862	0.770	0.915
QIM Totale	0.925	0.862	0.957

III.3.3 Valutazione della freschezza per via chimica

Per la valutazione del grado di freschezza mediante l'utilizzo di parametri chimici ci si è concentrati sulla ricerca dei metaboliti che si formano ad opera di enzimi endogeni nei primi giorni dopo la morte dell'animale. Infatti è noto che già ad alcune ore dalla morte si instaurano fenomeni eminentemente autolitici (Tejada, 2009) che portano alla degradazione dell'adenosina trifosfato (ATP) ad adenosina difosfato (ADP) e di qui ad adenosina monofosfato (AMP), inosina monofosfato (IMP), inosina (HxR), fino alla formazione di ipoxantina (Hx), come schematizzato nella **Figura III.2**.

Figura 2 - Schema delle reazioni di degradazione dell'ATP (Tejada, 2009)



Per la determinazione dei nucleotidi si è proceduto ad una estrazione con acido perclorico (7%) come indicato da Ryder (1985). In particolare modo, per quanto riguarda le seppie, le analisi sono state condotte in doppio, prelevando esattamente 5 grammi di tessuto della parte dorsale e 5 grammi della parte ventrale per ciascun esemplare, una volta effettuata la valutazione sensoriale. Anche per quanto riguarda i naselli e le triglie le analisi sono state condotte in doppio, una volta condotta la valutazione sensoriale. Per queste specie si è proceduto prelevando esattamente 5 grammi di polpa dal filetto destro ed altrettanti dal filetto sinistro, prelievo effettuato nella porzione dorsale subito dopo la testa dell'animale.

Il campione è stato pesato in provette da 50 ml di plastica resistente all'acido, mantenute in un bagno di ghiaccio per tutta la durata dell'estrazione. Dopo l'aggiunta di 25 ml di acido perclorico il campione è stato tritato con Ultra-Turrax® per 1 minuto. Dopo un riposo di 15 minuti in *freezer* a -20°C per permettere la precipitazione della componente proteica sarcoplasmatica, le provette sono state centrifugate a 2000 g per 10 minuti in centrifuga refrigerata. Il surnatante è stato filtrato in cilindri da 25 ml e portato a volume iniziale con acido perclorico. Il campione acido veniva poi stoccato a -80°C fino ad ulteriore analisi.

La seconda fase è consistita nella neutralizzazione di un'aliquota (10 ml) dell'estratto acido con KOH fino al raggiungimento del pH finale, compreso tra 6.50 e 6.80. Il campione neutralizzato veniva filtrato, portato a volume a 20 ml con acqua MilliQ, quindi stoccato in

vials da 2 ml per l'analisi con HPLC. Quest'ultima è stata condotta con un sistema HPLC Agilent Technologies 1100 a pompa binaria, con autocampionatore e *detector* a diodo. La colonna usata per la separazione era una Agilent Technologies Zorbax Eclipse XDB-C8 (4.6 x 75 mm, 3.5 μ). La fase mobile usata era una miscela composta per il 7% di acetonitrile e per il 93% di un tampone al 50 mM di sodio fosfato bibasico e 10 mM di tetrabutylammoniumbromuro portato a pH 7 con acido fosforico. Ciascuna corsa cromatografica durava 12 minuti e la velocità della pompa era di 1.3 ml/min. Per la curva di taratura si sono usati ATP, ADP, AMP, IMP, HxR e Hx della Sigma-Aldrich Inc.

Dopo aver determinato le concentrazioni molari dei 6 composti (fra nucleotidi, nucleosidi e basi azotate) sopra menzionati (ATP, ADP, AMP, IMP, HxR, Hx), a partire da quelle sono stati calcolati alcuni indici che la letteratura scientifica indica come potenzialmente utili o molto utili per la stima dello stato di freschezza di un alimento ittico:

Indice K (%) = $(HxR + Hx) / (ATP + ADP + AMP + IMP + HxR + Hx) * 100$ (Saito e coll., 1959)

Indice K_I (%) = $(HxR + Hx) / (IMP + HxR + Hx) * 100$ (Karube e coll., 1984)

Indice G (%) = $(HxR + Hx) / (AMP + IMP + HxR) * 100$ (Burns e coll., 1985)

Indice Fr (%) = $(IMP) / (IMP + HxR + Hx) * 100$ (Gill e coll., 1987)

Indice H (%) = $(Hx) / (IMP + HxR + Hx) * 100$ (Luong e coll., 1992)

Indice P (%) = $(HxR + Hx) / (AMP + IMP + HxR + Hx) * 100$ (Shahidi e coll., 1994).

Agli indici di cui sopra, di comune impiego per numerose specie di pesci, per la seppia si è aggiunto quello proposto da Ohashi e coll. (1991) nell'ambito di un lavoro dedicato al totano del Pacifico (*Todarodes pacificus*), vale a dire **Hx / AMP * 100**. Tale indice tiene conto del particolare decorso del catabolismo dell'ATP nei molluschi cefalopodi, caratterizzati da livelli piuttosto elevati di AMP, a riscontro di valori molto ridotti di IMP.

III.3.4 Valutazione della freschezza per via fisica

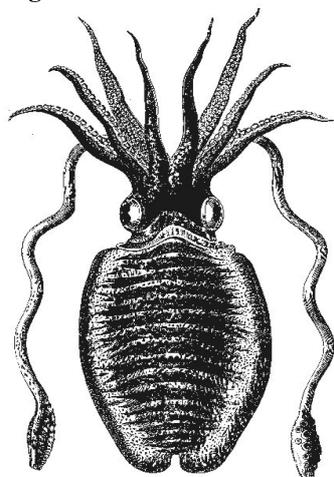
Prima di ogni sessione di valutazione sensoriale, ogni esemplare di seppia, come pure di nasello e di triglia, veniva sottoposto alla misurazione strumentale delle proprietà dielettriche della pelle e del sottostante muscolo ricorrendo al Fish Freshness Meter “295 – Torrymeter” (Distell.com, Fauldhouse, West Lothian, Regno Unito). Questo strumento permette di valutare le caratteristiche di conducibilità elettrica del tessuto muscolare, che traduce in un valore numerico intero inversamente correlato alla conducibilità elettrica. Ne consegue che quanto più integri i tessuti valutati, tanto minore la conducibilità e dunque tanto

più elevata la risposta dello strumento (Anon., 2009).

Sulla seppia sono state effettuate 12 misurazioni per ciascun esemplare, delle quali 6 sulla superficie dorsale e altrettante su quella ventrale (**Figura III.3**), ispirandosi per il numero delle misure a quanto posto in atto da Vaz-Pires et al. (2008), ma, diversamente da quell'approccio, convenendo di computare un solo valore medio, senza distinguere fra posizione dorsale e ventrale.

Quanto alle rilevazioni su nasello e triglia, per queste specie su ciascun esemplare sono state effettuate due misurazioni (una sul lato destro, l'altra sul lato sinistro), nella porzione mediale della parte dorsale del filetto.

Fig. III.3



III.4 Analisi dei dati

Presentazione dei risultati: per ciascun giorno e ciascuna Tesi, le rilevazioni sensoriali (racchiuse nel parametro Quality Index, QI) e quelle strumentali (parametri chimici e fisici) di maggiore rilievo sono state riassunte in termini di media e suo intervallo di confidenza al 95%, in modo da poter valutare, giorno per giorno, l'effetto della Tesi usando proprio gli intervalli di confidenza. L'evoluzione temporale delle variabili è stata presentata anche in forma di grafico di dispersione diversificato per Tesi ed integrato con le relative rette di regressione stimate con il metodo dei minimi quadrati ed i relativi coefficienti di determinazione (R^2).

Confronto tra le Tesi: le variabili sensoriali e strumentali sono state analizzate con analisi fattoriale via Modello Lineare Generale (General Linear Model, GLM), per valutare l'effetto dei giorni trascorsi (come covariata), del tipo di ghiacciatura (come fattore fisso) e del mare di provenienza (come fattore random). Quando il mare non ha mostrato alcuna

influenza, il GLM è stato ripetuto con solo la covariata e l'effetto fisso allo scopo di individuare se il tipo di ghiacciatura influenzasse significativamente l'evoluzione del parametro di volta in volta sotto esame nei giorni di osservazione, ovvero se il coefficiente angolare della regressione tra il parametro ed i giorni fosse significativamente diverso tra le Tesi. L'Analisi della Covarianza (ANCOVA) è stata usata per i parametri per i quali il GLM aveva suggerito l'uso di un coefficiente angolare comune, per valutare se le intercette delle regressioni fossero significativamente diverse fra le Tesi, vale a dire se l'evoluzione temporale del parametro partisse da valori iniziali differenti, pur mantenendosi il parallelismo fra le rette.

Per tutte le analisi si è considerato significativo un valore $P \leq 0.05$ ed è stato utilizzato il pacchetto statistico SPSS 15.0 (SPSS Italia, Casalecchio di Reno, BO). La parte grafica è stata sviluppata ricorrendo a Microsoft® Office Excel 2007 (Microsoft Italia, Segrate, Milano).

III.5 Risultati e Discussione

III.5.1 Seppia (*Sepia officinalis*)

Premessa

Si ricorda che l'approccio preliminare alle elaborazioni statistiche p.d. è consistito in un confronto fra mari di provenienza degli esemplari, per accertarsi che questo fattore non esercitasse una qualche influenza sulle variabili di volta in volta sotto esame. A questo fine, si è proceduto mediante GLM con "Tipo di ghiacciatura" come fattore fisso, "Mare di provenienza" come fattore *random*, "Giorno di stoccaggio" come covariata ed i singoli parametri rilevati (a livello sensoriale, chimico e fisico) come variabile.

Poiché per la seppia si è potuto escludere un effetto "Mare" sulle variabili di interesse, le elaborazioni, i cui esiti sono riportati a seguire, sono state condotte "a mari riuniti".

III.5.1.1 Valutazione della freschezza per via sensoriale

L'applicazione dello schema QIM da noi modificato agli esemplari in stoccaggio secondo le tre Tesi di ghiacciatura ha generato i valori medi riportati in **Tabella III.12**, tutti

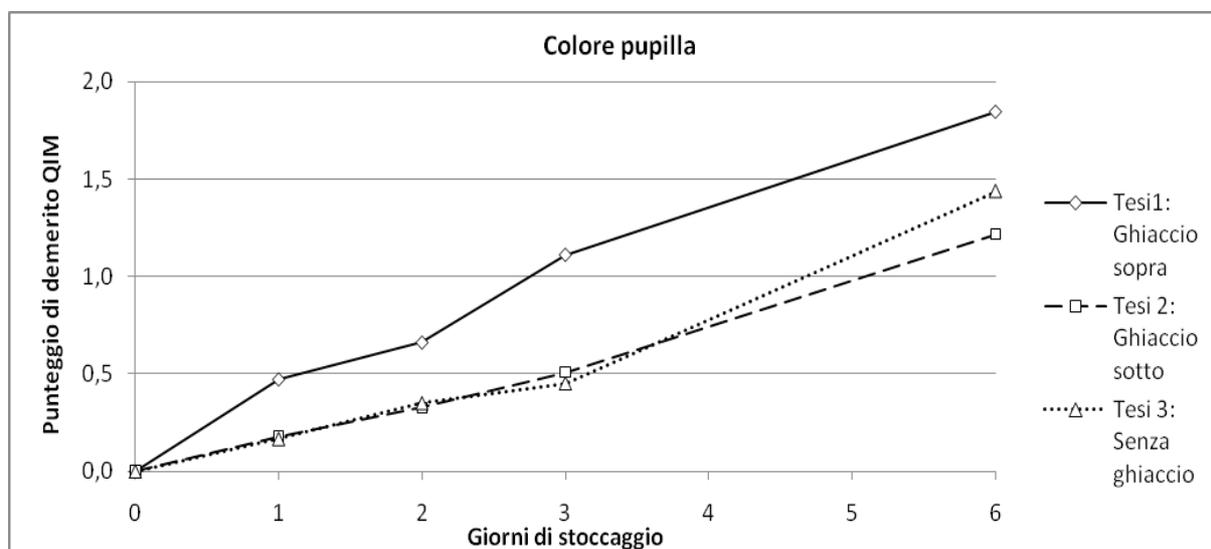
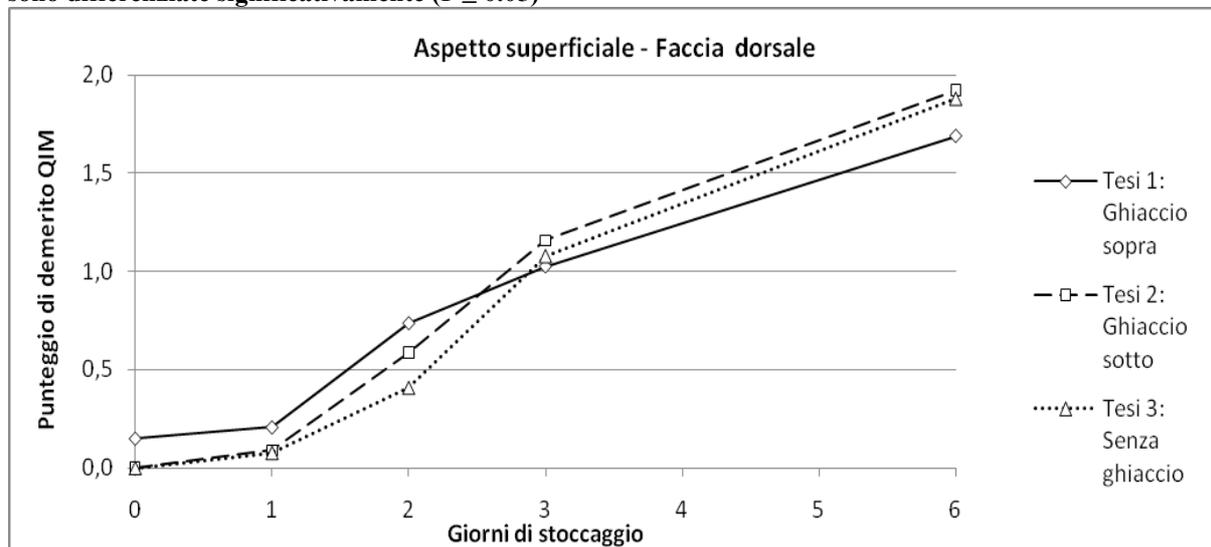
caratterizzati da un *trend* lineare crescente e significativamente correlati ($P \leq 0.05$) alla durata dello stoccaggio stesso.

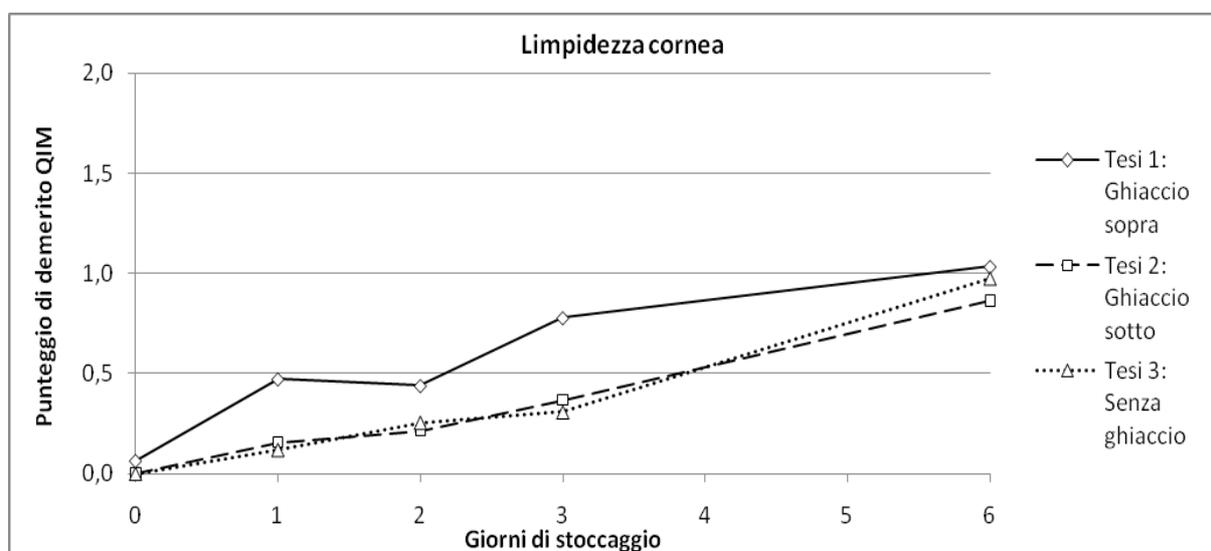
Tabella III.12 – Valori medi dei punteggi sensoriali assegnati a ciascun parametro secondo lo schema QIM applicato a seppie stoccate con “ghiaccio sopra” (Tesi 1), con “ghiaccio sotto” (Tesi 2) e “senza ghiaccio” (Tesi 3), con correlazione (r) ai giorni di stoccaggio ($P \leq 0.05$)

Giorni di stoccaggio		0	1	2	3	6	r
Parametro	Tesi						
Faccia dorsale	1	0.15	0.21	0.74	1.03	1.69	0.9033
	2	0.00	0.09	0.59	1.16	1.92	0.9268
	3	0.00	0.08	0.41	1.08	1.88	0.9301
Faccia ventrale	1	0.10	0.24	0.61	0.95	1.75	0.8585
	2	0.10	0.14	0.73	0.96	1.88	0.9039
	3	0.15	0.10	0.58	0.93	1.86	0.8871
Pelle	1	0.03	0.22	0.71	0.96	1.80	0.9022
	2	0.19	0.39	0.75	0.90	1.76	0.8843
	3	0.19	0.25	0.78	0.97	1.83	0.9072
Odore	1	0.11	0.16	0.85	1.13	1.94	0.9301
	2	0.07	0.11	0.74	1.14	1.90	0.9088
	3	0.07	0.06	0.73	1.05	1.93	0.9099
Aspetto superficiale	1	0.10	0.21	0.73	1.02	1.80	0.9434
	2	0.09	0.18	0.70	1.04	1.87	0.9571
	3	0.10	0.12	0.62	1.01	1.87	0.9487
Colore pupilla	1	0.00	0.47	0.66	1.11	1.84	0.8666
	2	0.00	0.18	0.33	0.51	1.22	0.7596
	3	0.00	0.17	0.35	0.45	1.44	0.7662
Limpidezza della cornea	1	0.06	0.47	0.44	0.78	1.03	0.6269
	2	0.00	0.16	0.21	0.37	0.86	0.6797
	3	0.00	0.12	0.26	0.31	0.98	0.7014
Occhi	1	0.03	0.47	0.55	0.94	1.44	0.9391
	2	0.00	0.17	0.27	0.44	1.04	0.7537
	3	0.00	0.14	0.30	0.38	1.21	0.7537
Ventose	1	0.03	0.38	0.79	1.16	1.71	0.9187
	2	0.03	0.34	0.73	1.06	1.72	0.9386
	3	0.00	0.29	0.77	1.07	1.77	0.9105
Tentacoli	1	0.00	0.08	0.46	0.80	1.67	0.9116
	2	0.00	0.00	0.34	0.77	1.71	0.9370
	3	0.00	0.03	0.38	0.70	1.70	0.9317
Forma	1	0.00	0.16	0.72	1.06	1.50	0.9317
	2	0.00	0.12	0.45	0.99	1.42	0.8764
	3	0.00	0.13	0.56	0.85	1.54	0.9022
Testa	1	0.01	0.21	0.66	1.00	1.63	0.8118
	2	0.01	0.16	0.51	0.94	1.62	0.9560
	3	0.00	0.15	0.57	0.87	1.67	0.9466
Quality Index	1	0.48	2.33	5.92	8.84	15.0	0.9566
	2	0.39	1.50	4.89	7.81	14.4	0.9618
	3	0.37	1.23	4.78	7.28	14.9	0.9612

I singoli parametri per i quali le tre Tesi si sono differenziate sono stati l’aspetto superficiale (faccia dorsale), il colore della pupilla e la limpidezza della cornea, in relazione ai quali gli esemplari della Tesi 1 (Ghiaccio sopra) sono risultati significativamente peggiori (risuotendo punteggi di demerito più alti) rispetto a quelli delle altre due Tesi fino al terzo giorno per la faccia dorsale, e per l’intera durata della prova in relazione al colore della pupilla e alla limpidezza della cornea (**Figura III.4**).

Figura III.4 – Punteggi medi dei tre parametri di qualità delle seppie per i quali le tre Tesi in stoccaggio si sono differenziate significativamente ($P \leq 0.05$)





Quanto sopra va a corroborare la posizione critica del mondo produttivo nei confronti della ghiacciatura “classica” (i.e. dall’alto) nella seppia, pratica cui ci si sottrae per non indurre danneggiamenti estetici nella derrata.

Alla fine del periodo di stoccaggio inizialmente deliberato (della durata di 6 giorni) il punteggio sensoriale onnicomprensivo di freschezza, vale a dire il *Quality Index*, raggiungeva il valore 15 sul massimo esprimibile di 20 (**Tabella III.12**), a conferma del fatto che la fine della vita commerciale della derrata non era stata raggiunta. Per questo parametro, che assomma in sé il responso sensoriale assegnato agli esemplari di seppia in stoccaggio, la **Tabella III.13** illustra i valori medi e gli intervalli di confidenza caratterizzanti le tre Tesi di ghiacciatura al passare del tempo, qui portando a zero i decimali per adattarsi pienamente alla natura di “intero” del punteggio secondo lo schema QIM.

Tabella III.13 – Valori medi e intervalli di confidenza del punteggio *Quality Index* (QI) per le tre Tesi di seppia nel periodo di stoccaggio preso in esame

Parametro	Giorni di stoccaggio	Tesi	Numero di esemplari	Media	Intervallo di confidenza 95%	
					Lim. inferiore	Lim. superiore
Punteggio Quality Index (QI)	0	1	9	0	0	1
		2	9	0	0	1
		3	9	0	0	1
	1	1	18	2	2	3
		2	18	2	1	2
		3	18	1	1	2
	2	1	18	6	5	7
		2	18	5	4	6
		3	18	5	4	6
	3	1	18	9	8	10
		2	18	8	7	8
		3	18	7	7	8
	6	1	18	15	14	16
		2	18	14	14	15
		3	18	15	14	16

Volendo esplicitare, distintamente per Tesi, il legame che passa fra il *Quality Index* (anche detto *QI*, la nostra y stimata, anche designata come \hat{y}) e i giorni di stoccaggio (x), si presentano anzitutto le seguenti equazioni, corredate di R^2 o “Coefficiente di determinazione”:

$$\text{Tesi 1) } \hat{y} = 2.4642x + 0.6046 \quad R^2 = 0.9149$$

$$\text{Tesi 2) } \hat{y} = 2.4711x - 0.1806 \quad R^2 = 0.9255$$

$$\text{Tesi 3) } \hat{y} = 2.5792x - 0.5682 \quad R^2 = 0.9233$$

Il coefficiente di determinazione esprime la quota parte di variabilità totale spiegata dal modello, suscettibile di variare fra 0 e 100% ed è una misura importante della “bontà” predittiva di un’equazione di stima. Il quadro relativo alle tre equazioni si completa con l’Intervallo di confidenza (95%) sia per il coefficiente angolare, sia per l’intercetta, per consentire al lettore di comprendere se sia statisticamente corretto tenere distinte le tre Tesi e, se sì, quale Tesi sia distinguibile dalle altre (**Tabella III.14**).

Tabella III.14 – Intervalli di confidenza (95%) per il coefficiente angolare e l’intercetta delle equazioni di stima del *QI* nella seppia

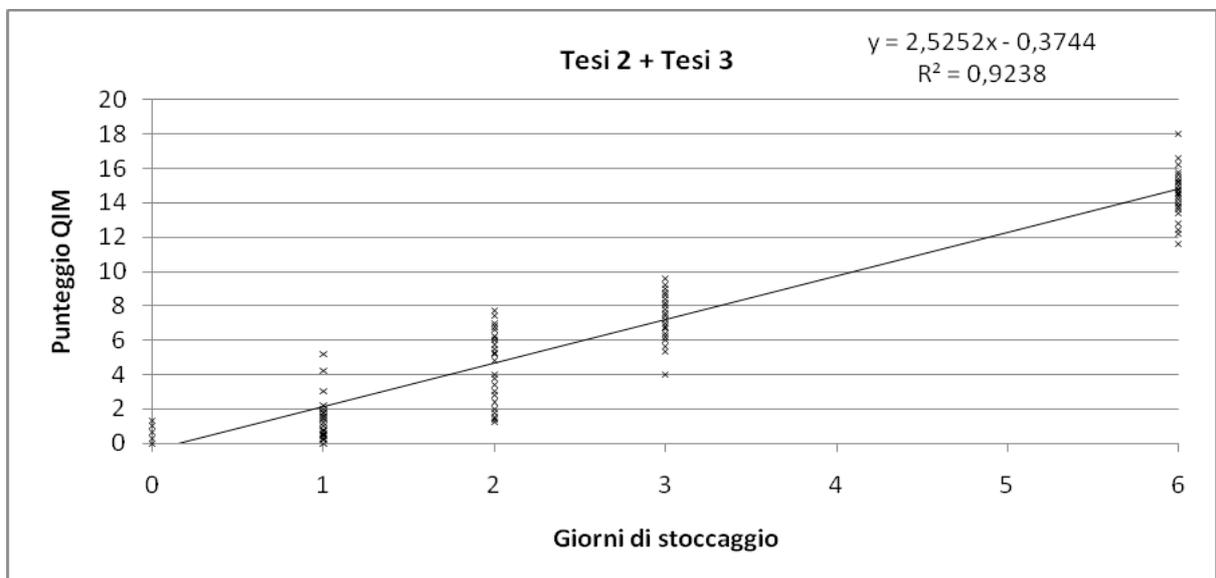
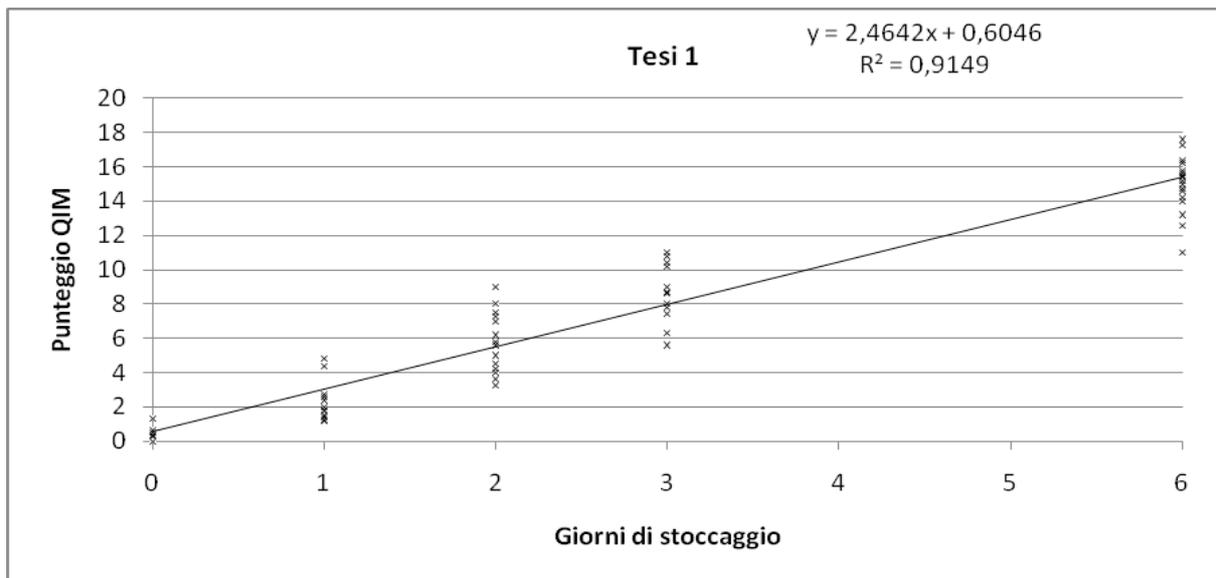
Tesi	Coefficiente angolare		Intercetta	
	Limite infer.	Limite super.	Limite infer.	Limite super.
1	2.3001	2.6282	0.4400	1.1660
2	2.3071	2.6352	-0.7040	0.3430
3	2.4151	2.7433	-1.1230	-0.0130

Proprio dallo studio degli intervalli di confidenza (IC) deriva la necessità di considerare non tre, bensì due equazioni di stima del *QI* a partire dai giorni di stoccaggio, di cui una per la Tesi 1 ed una per le altre due Tesi. Si osserva infatti che l’IC per l’intercetta della Tesi 1 non si sovrappone, neppure in minima parte, con gli IC delle Tesi 2 e 3, mentre per questi ultimi la sovrapposizione si produce.

Nella **Figura III.5** viene illustrata l’espressione grafica delle due equazioni di stima cui si è pervenuti. La prima è stata sopra riportata per la Tesi “Ghiaccio sopra”, mentre la seconda, che come detto cumula in sé le Tesi “Ghiaccio sotto” e “Senza ghiaccio”, viene riportata a seguire:

$$\hat{y} = 2.5252x - 0.3744 \quad R^2 = 0.9238$$

Figura III.5 – Correlazione lineare fra il *QI* e i giorni di stoccaggio secondo lo schema a 20 punti adottato per la seppia, per la Tesi 1 (Ghiaccio sopra) e le Tesi 2 e 3 (Ghiaccio sotto e Senza ghiaccio)



La loro utilità consiste appunto nel permettere, in relazione ad esemplari sottoposti ad uno stoccaggio di natura e durata analoga a quella degli animali qui studiati, di stimare il punteggio QI a partire dal numero di giorni di stoccaggio trascorsi, senza per questo doversi dotare di un *panel* di valutatori da addestrare e mantenere “performanti”, che rappresenta un onere di una certa entità. Già visivamente si apprezza come le due rette siano, in pratica, parallele (di fatto i loro coefficienti angolari non sono significativamente diversi), ma tagliano l’asse delle y in punti significativamente diversi (cioè, abbiano intercetta differente), il che vuol dire che, al momento 0, le due situazioni si concretizzano in un QI significativamente diverso.

Dal punto di vista pratico, a pari giorni di stoccaggio e almeno fino a T₃, le seppie conservate con copertura di ghiaccio (Tesi 1) fanno registrare un punteggio QI leggermente,

ma significativamente, superiore a quello delle restanti tipologie di seppia. Altro portato di questa sperimentazione è che, dal punto di vista sensoriale, non sussiste differenza fra seppie conservate in barca sopra ghiaccio fondente e seppie conservate in barca senza alcuno strato di ghiaccio, a patto che, una volta sbarcate, siano mantenute, le une come le altre, su uno strato di ghiaccio.

Il lavoro condotto da Sykes e coll. (2009) su seppia stoccata sotto ghiaccio fondente per la messa a punto di uno schema QIM a 29 punti complessivi si è tradotto nella individuazione di una equazione di stima con la quale non è possibile confrontarsi, essendo quello schema completo anche di valutazioni che abbiamo qui dovuto scartare perché “non reiterabili”, ma che si presenta con connotazioni in un certo senso simili, pur essendo caratterizzata da un migliore coefficiente di determinazione:

$$\text{Equazione Sykes e coll. (2009)} \quad \hat{y} = 2.6767x - 0.6083 \quad R^2 = 0.9866$$

La valutazione sensoriale della freschezza delle seppie in stoccaggio, come ricordato in precedenza, veniva effettuata anche secondo la schema comunitario messo a punto per i cefalopodi (Reg. CE N. 2406/96), che è tuttora la metodica sensoriale “ufficiale”. L’applicazione di questa metodica si traduce nell’attribuzione di ciascun esemplare in valutazione ad una delle tre possibili categoria di freschezza menzionate nella parte “metodologica” della relazione, il che equivale alla assegnazione di uno *score*, un punteggio che non è suscettibile di elaborazione statistica “classica”. Il quadro delle corrispondenze fra i giorni ai quali gli esemplari delle tre Tesi sono stati valutati, il punteggio attribuito loro secondo il Regolamento 2406/96 e secondo lo schema QI applicato viene fornito in **Tabella III.15**.

Tabella III.15 – Punteggio UE e punteggio medio QI assegnato alle tre Tesi di seppia in valutazione

Giorni di stoccaggio	Punteggio UE	Punteggio medio QI		
		Tesi 1	Tesi 2	Tesi 3
0	E	0	0	0
1	E	2	2	1
2	A	6	5	5
3	A	9	8	7
6	A/B	15	14	15

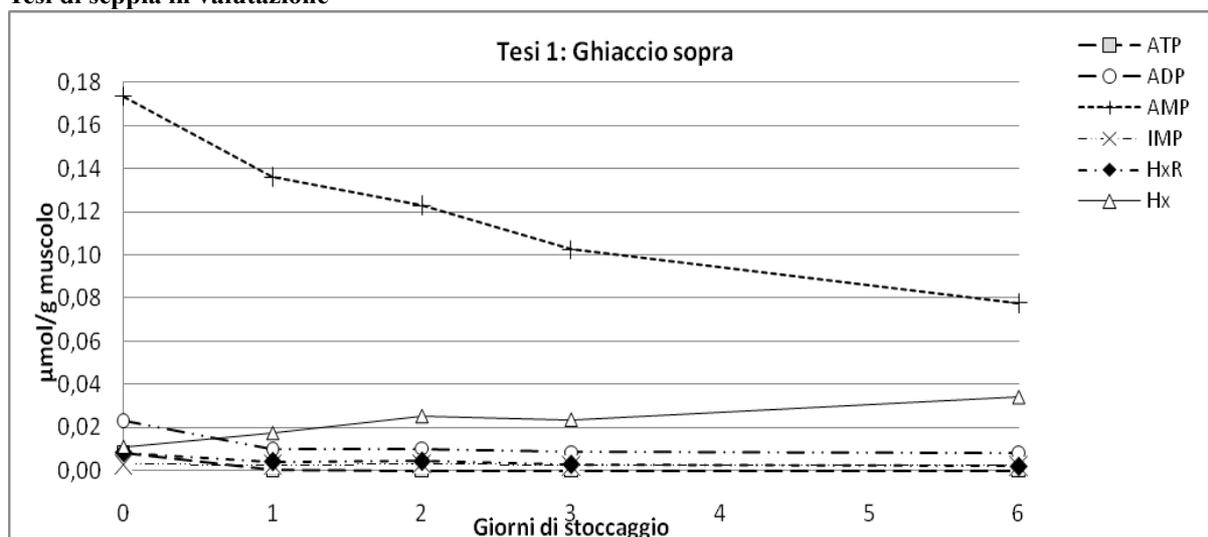
L’esame della **Tabella III.15** fa emergere subito una osservazione: nell’arco di tempo impegnato dalla presente sperimentazione fra le Tesi non sono emerse differenze che lo schema comunitario fosse in grado di cogliere. La qualifica “Extra” veniva assegnata

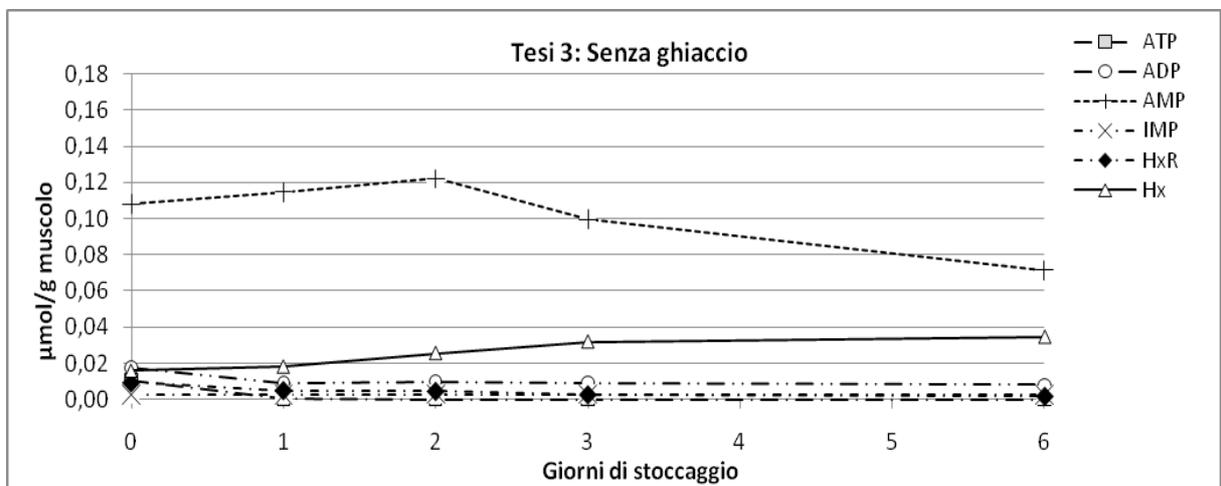
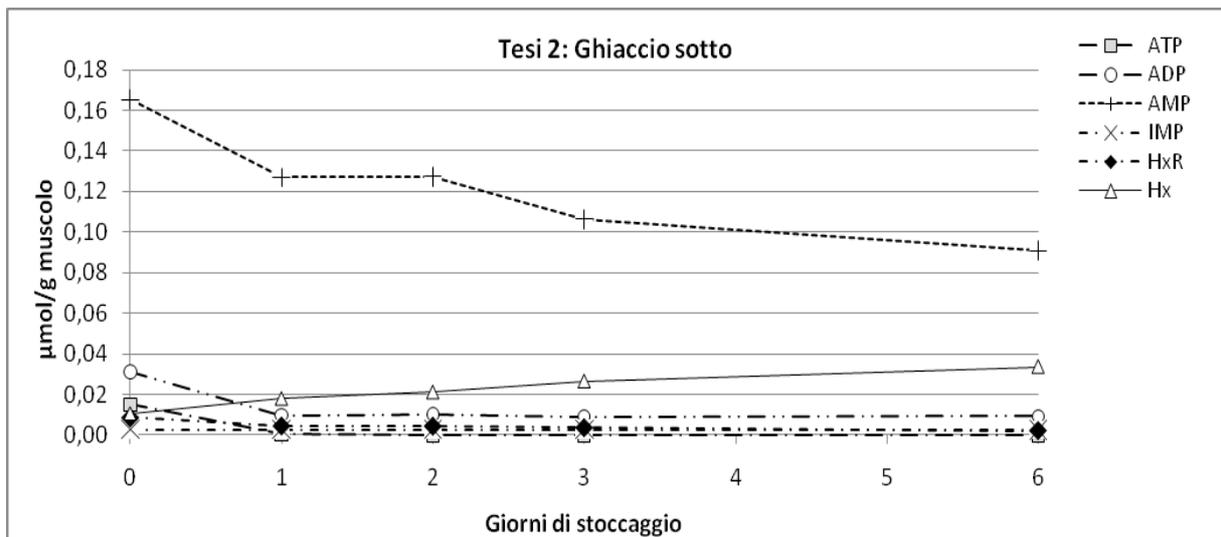
nell'arco dei primi due giorni di vita commerciale del prodotto. Questo nei successivi quattro giorni tendenzialmente riceveva la qualifica "A", che solo verso il termine dei sei giorni sembrava trascolorare verso una "B". In buona sostanza, si manifestava quanto autorevolmente osservato da Botta (1995) a proposito dell'applicazione delle diverse declinazioni dello schema comunitario di valutazione della freschezza (per pesce bianco, azzurro, cefalopodi, ecc), vale a dire la lunga permanenza degli esemplari in valutazione nella classe "A", il che finisce per dare al potenziale utente di quella classificazione un'informazione poco attendibile e utilizzabile.

III.5.1.2 Valutazione della freschezza per via chimica

L'evoluzione temporale dei cataboliti dell'ATP negli esemplari delle tre Tesi è visualizzata in **Figura III.6**.

Figura III.6 – Evoluzione temporale dell'ATP e dei suoi cataboliti (ADP, AMP, IMP, HxR e Hx) nelle tre Tesi di seppia in valutazione

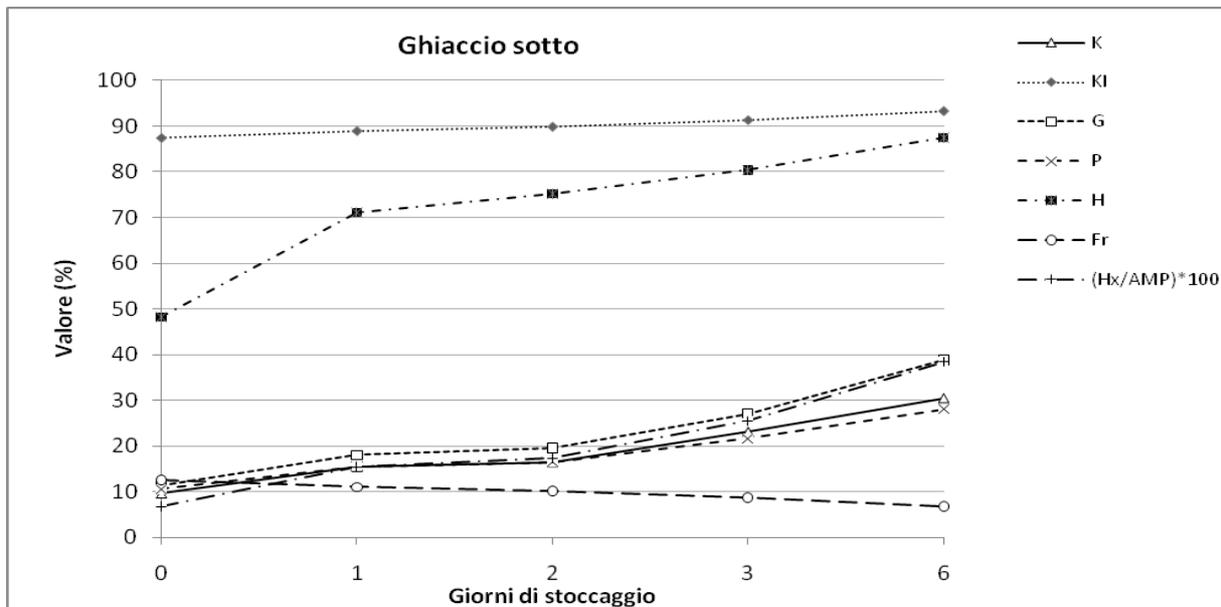
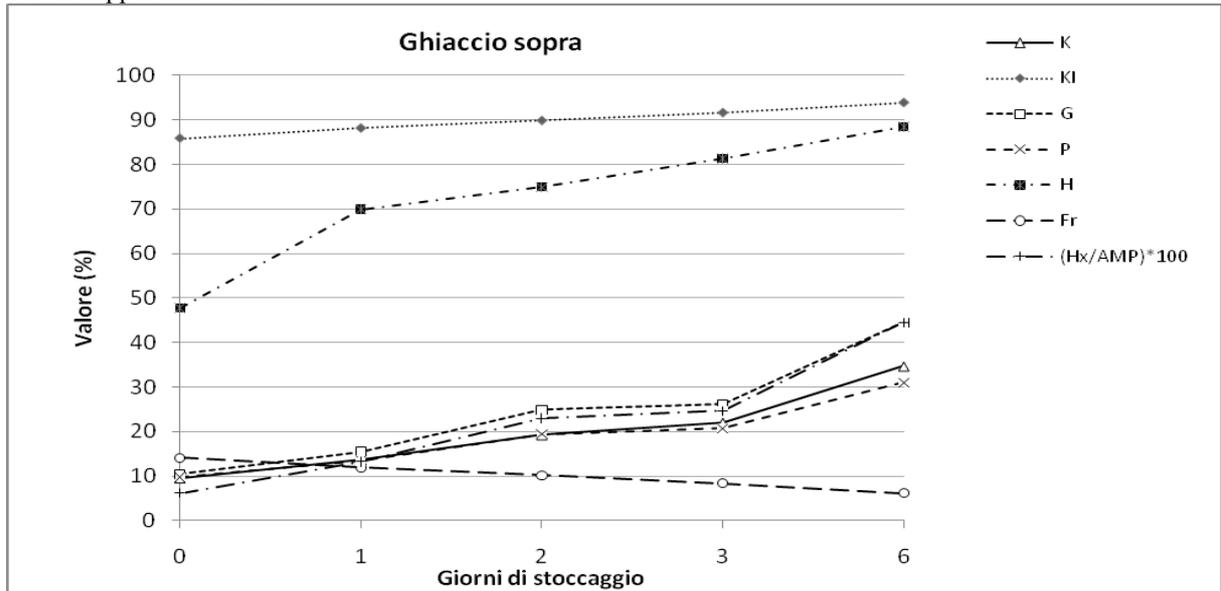


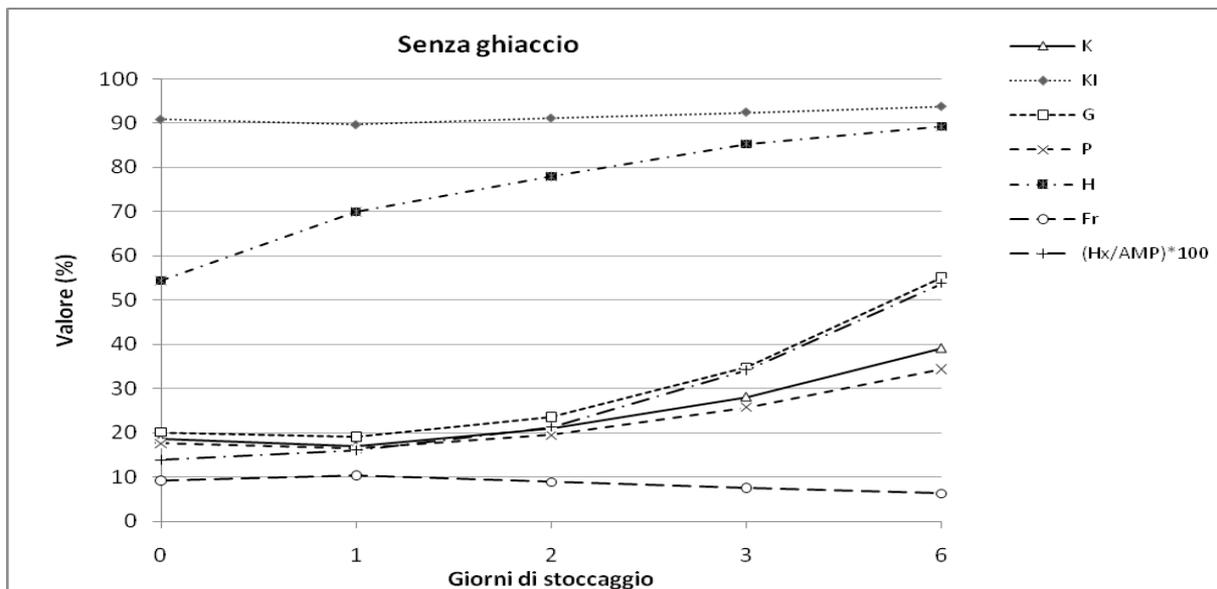


Il catabolita che sembra rispondere precocemente alle condizioni di stoccaggio è l'AMP. Fino al terzo giorno di conservazione, l'AMP mantiene livelli sensibilmente più elevati nelle Tesi che contemplano l'uso di ghiaccio in barca (Tesi 1 e Tesi 2), rispetto a quella che non lo prevede (Tesi 3), laddove, dal terzo giorno in poi e fino a fine prova, l'ammontare di questo catabolita non appare differente nelle tre Tesi a confronto. In generale, i rimanenti cataboliti dell'ATP non sembrano rispondere in maniera diversa nelle Tesi a confronto, oltre a mantenersi a livelli decisamente bassi.

La consapevolezza che un singolo catabolita dell'ATP non possa fornire una stima utile della freschezza di un alimento ittico si è instaurata da tempo, suggerendo la necessità di individuare, su base quasi specie-specifica, rapporti "strategici" fra cataboliti o fra somme degli stessi (Tejada, 2009), indici che abbiamo richiamato nella parte "metodologica" della relazione. Tutti gli indici là riportati sono stati calcolati per gli esemplari delle tre Tesi a confronto, ottenendo i grafici riportati in **Figura III.7**.

Figura III.7 - Evoluzione temporale dei principali indici costruiti a partire dall'ATP e dai suoi cataboliti nelle tre Tesi di seppia a confronto





L'unico indice per il quale le tre Tesi sono risultate significativamente diverse l'una dall'altra, e che pertanto, in teoria, manifesterebbe la massima capacità di discriminarle, è il K_I -value. Dall'esame della **Figura III.7**, tuttavia, emerge subito come l'utilità di questo indice sia praticamente nulla, perché: a) fin dall'inizio dello stoccaggio, indipendentemente dalla Tesi, questo indice assume valori mediamente intorno al 90%, cioè molto prossimi al "fondo scala"; b) nelle tre Tesi il suo valore varia ben di poco nel corso della prova di stoccaggio, fenomeni questi che discendono dal ridottissimo livello di presenza di IMP, peraltro tipico dei molluschi cefalopodi (vedi **Figura III.6**).

A fare da contraltare al K_I -value è l'indice H, per il quale le tre Tesi non si differenziano, anch'esso comunque caratterizzato da valori medi piuttosto alti (intorno al 50%) fin dall'inizio della prova di stoccaggio, per finire intorno al 90% al termine dei sei giorni di sperimentazione. Per l'indice Fr, poi, l'analisi statistica farebbe emergere la discriminabilità della Tesi 1 rispetto alle restanti due, a fronte di una distinguibilità effettiva che ci pare davvero esigua, sempre a giudicare dalla **Figura III.7**.

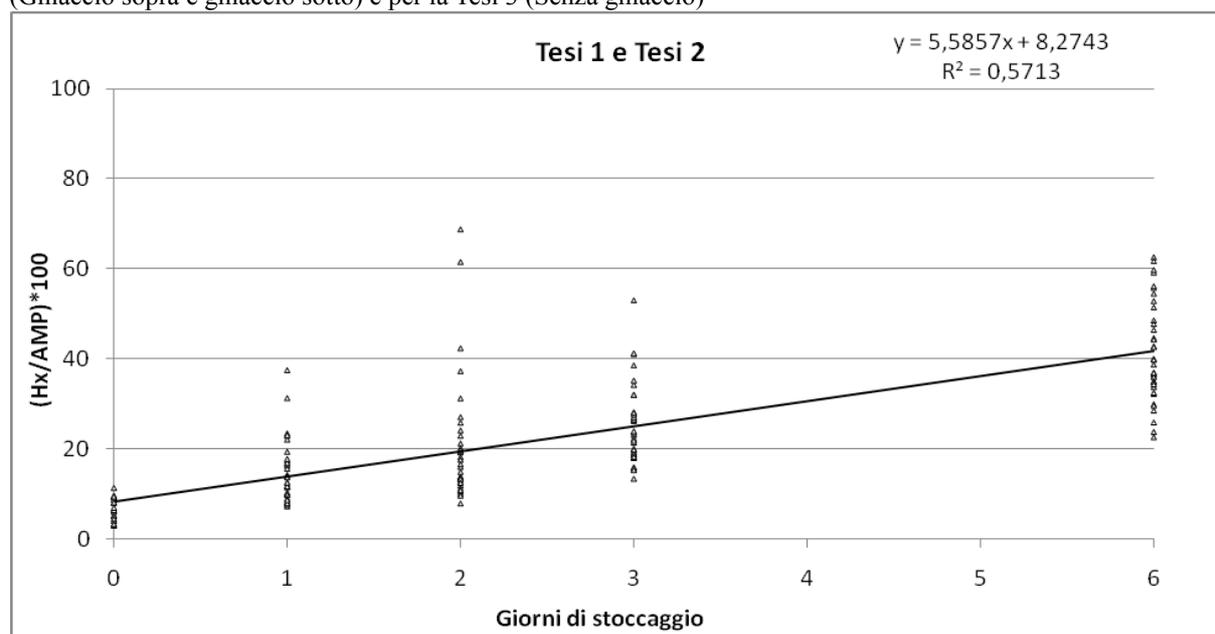
Passando agli altri indici degni di menzione, l'indice K, il primo in assoluto ad essere stato proposto nella pletora di quelli coi quali attualmente si può avere a che fare, riveste scarsa utilità, arrivando ad assumere valori comunque inferiori al 40% nell'arco dei sei giorni di stoccaggio. Nel momento in cui si è andati ad accertare la relazione che lega questo indice al tempo di stoccaggio, è emerso che occorrerebbe esprimerla mediante due rette distinte, caratterizzate da diversa intercetta ma da uno stesso coefficiente angolare, di cui una per le Tesi 1 e 2, l'altra per la Tesi 3. In termini generali questo esito è condiviso anche dall'indice P, nonché dall'indice G, il quale è caratterizzato da un andamento praticamente sovrapponibile a

quello del rapporto percentuale fra ipoxantina (Hx) e AMP (**Figura III.7**).

Su quest'ultimo indice si ritiene necessario soffermarsi, perché, se anche è vero che la sua performance non lo rende distinguibile dall'indice G, è anche vero che per la sua quantificazione è sufficiente determinare i livelli di presenza di due soli cataboliti dell'ATP, anziché di quattro. Su questo indice, peraltro, oltre all'interesse del già citato gruppo di ricercatori guidato da Ohashi, che per primo lo propose nel 1991, si è appuntata l'attenzione di diversi studiosi della freschezza nei molluschi cefalopodi: ci riferiamo in particolare al contributo di Yokoyama e coll. (1994) sul calamaro lanceolato (*Doryteuthis bleekeri*) e a quello di Márquez-Ríos e coll. (2007) sul calamaro di Humboldt (*Dosidicus gigas*).

La relazione che passa fra l'indice $Hx/AMP*100$ ed il tempo di stoccaggio delle seppie qui in esame è visualizzata nella **Figura III.8**, all'interno della quale trovano spazio le equazioni di regressione, distintamente per le Tesi 1 e 2 combinate, e per la Tesi 3. Di quelle equazioni la **Tabella III.16** fornisce una più compiuta caratterizzazione in termini di intervalli di confidenza per coefficiente angolare e intercetta. Proprio dagli intervalli di confidenza è dato vedere come le due rette differiscano significativamente l'una dall'altra per il coefficiente angolare, ma non per l'intercetta. Più in dettaglio, la retta che accomuna le due tesi "con ghiaccio-in-barca" è meno inclinata sull'asse delle ascisse di quella relativa alla "assenza di ghiaccio in barca", il che vuol dire che già solo l'impiego del ghiaccio in barca ha rallentato il processo che porta dai "grandi" 5'-nucleotidi (in questo caso AMP) all'ipoxantina (Hx), in altre parole il processo di decadimento chimico della freschezza delle seppie.

Figura III.8 – Correlazione lineare in seppia fra l'indice $(Hx/AMP)*100$ e i giorni di stoccaggio per le Tesi 1 e 2 (Ghiaccio sopra e ghiaccio sotto) e per la Tesi 3 (Senza ghiaccio)



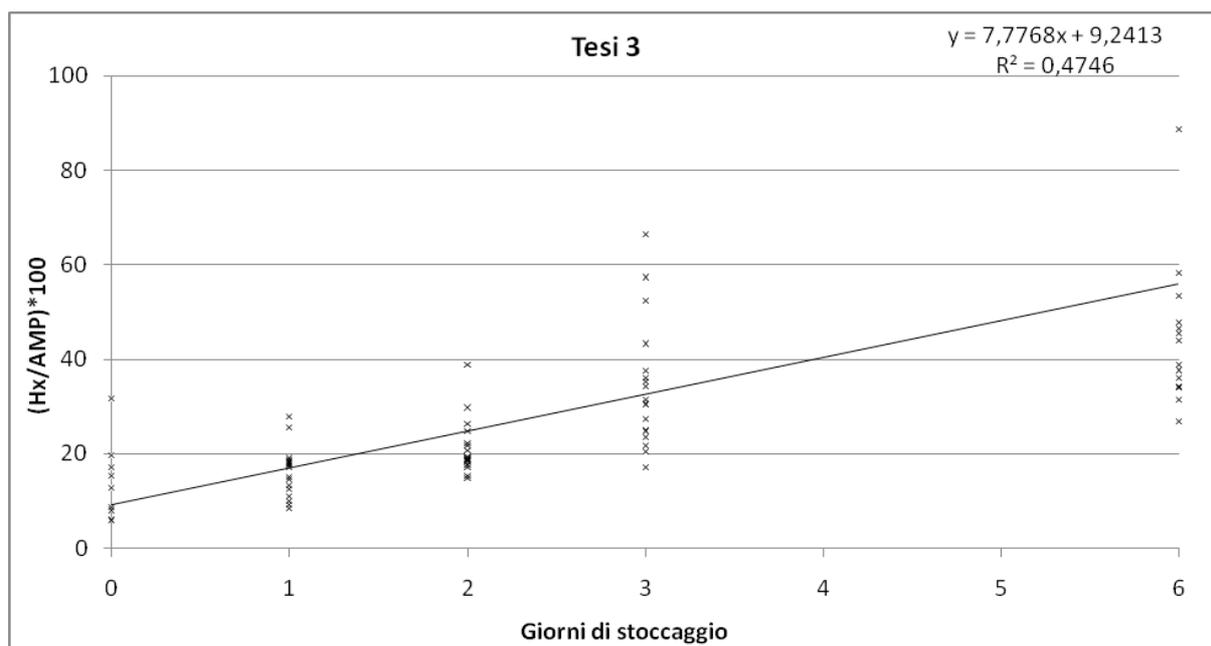


Tabella III.16 - Intervalli di confidenza (95%) per il coefficiente angolare e l'intercetta delle equazioni di stima dell'indice Hx/AMP*100 nella seppia

Equazione per Tesi	Coefficiente angolare		Intercetta	
	Limite infer.	Limite super.	Limite infer.	Limite super.
1 e 2	4.2146	6.9568	4.7310	11.5490
3	6.3973	9.1396	3.1760	15.4000

Pur con un certo margine di incertezza e limitatamente all'intervallo di tempo esplorato in occasione di questa indagine, l'utilità di queste equazioni starebbe nella possibilità, tramite il loro impiego, di stimare l'indice Hx/AMP*100 in seppie, una volta noto il tempo di stoccaggio, senza pertanto fare ricorso ad alcuna determinazione chimica. Questa possibilità troverebbe applicazione pratica nel momento in cui fosse stabilita una relazione sufficientemente stretta fra l'indice in questione e la freschezza sensoriale. Si tratta di un'eventualità tutt'altro che remota, se si considera la conclamata e "positiva" percepibilità sensoriale dei 5'-nucleotidi (IMP e AMP fra questi) e la altrettanto famosa negatività sensoriale dell'Hx (Huss, 1988), fenomeni questi cui di sicuro non è estraneo il fatto che un pesce possa essere definito *sashimi-grade* e dunque le sue carni avviate al consumo allo stato crudo proprio in funzione del valore assunto dal K-value, il che, per il mercato nipponico, avviene solo se questo indice ha valore inferiore al 20% (Harada, 1988).

Sempre per l'indice Hx/AMP*100 la **Tabella III.17** riporta il valore medio e l'intervallo di confidenza (IC) al 95%, distintamente per le tre Tesi nell'ambito del periodo di

prova. E' immediato osservare che la più ampia discriminazione fra le Tesi si realizza al T_0 , quando la Tesi 3 evidenzia un IC intorno alla media sostanzialmente non sovrapponibile a quello delle altre due Tesi, quelle, per intendersi, che ricorrono al ghiaccio. E' ancora una volta evidente che l'applicazione precoce del ghiaccio si traduce in un rallentamento dei processi di decadimento dell'AMP a Hx.

Tabella III.17 – Valori medi e intervalli di confidenza per l'indice Hx/AMP*100 in relazione alle tre Tesi di seppia nel periodo di stoccaggio preso in esame

Parametro	Giorni di stoccaggio	Tesi	Numero di esemplari	Media	Intervallo di confidenza 95%	
					Lim. inferiore	Lim. superiore
(Hx/AMP)*100	0	1	9	6.78	4.68	8.88
		2	9	6.11	4.21	8.01
		3	9	14.00	7.57	20.43
	1	1	18	15.50	12.06	18.94
		2	18	13.22	9.93	16.51
		3	18	16.11	13.49	18.74
	2	1	18	17.33	13.61	21.06
		2	18	23.00	14.43	31.57
		3	18	21.33	18.43	24.23
	3	1	18	25.56	21.96	29.15
		2	18	24.56	19.46	29.65
		3	18	34.00	27.42	40.58
	6	1	18	38.56	33.03	44.08
		2	18	44.56	39.33	49.78
		3	18	56.39	40.82	71.96

III.5.1.3 Valutazione della freschezza per via fisica

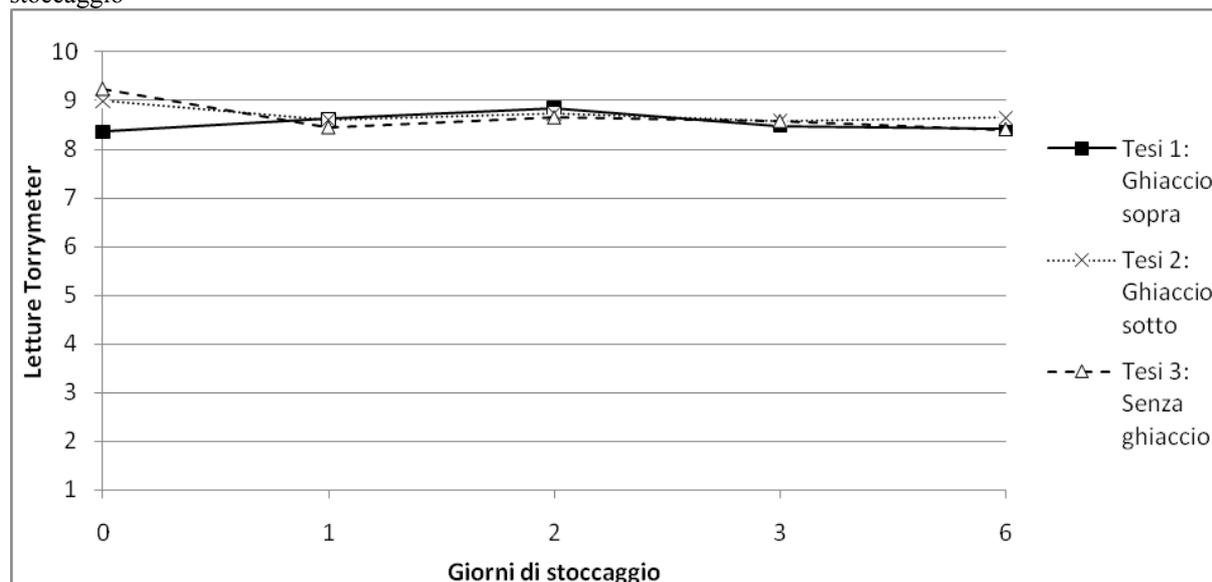
Le letture fornite dal Torrymeter, come dato di apprezzare dalla **Tabella III.18**, sono risultate in pratica omogenee fra Tesi e costanti al passare del tempo di stoccaggio, il che le ha rese sostanzialmente non utili ai fini di una stima della freschezza degli esemplari sotto esame.

Tabella III.18 – Valori medi e intervalli di confidenza per le letture del Torrymeter in relazione alle tre Tesi di seppia nel periodo di stoccaggio preso in esame

Parametro	Giorni di stoccaggio	Tesi	Numero di esemplari	Media	Intervallo di confidenza 95%	
					Lim. inferiore	Lim. superiore
Lettura Torrymeter	0	1	9	8	8	9
		2	9	9	8	10
		3	9	9	9	10
	1	1	18	9	8	9
		2	18	9	8	9
		3	18	8	8	9
	2	1	18	9	9	9
		2	18	9	8	9
		3	18	9	8	9
	3	1	18	8	8	9
		2	18	9	9	9
		3	18	9	8	9
	6	1	18	8	8	9
		2	18	9	8	9
		3	18	8	8	9

L'andamento al passare dei giorni della lettura Torrymeter nelle tre Tesi (**Figura III.9**) rende, se possibile, ancora più evidente la pressoché nulla capacità informativa di quello strumento in questo contesto.

Figura III.9 – Andamento delle letture medie del Torrymeter nelle tre Tesi di seppia in funzione del periodo di stoccaggio



III.5.2 Nasello (*Merluccius merluccius*)

Premessa

Si ritiene opportuno ricordare come per questa specie le Tesi a confronto, al solito implementate solo durante la permanenza del pescato in barca, fossero: **Tesi 1**, con rapporto ghiaccio : pesce = 1 : 10; **Tesi 2**, con rapporto ghiaccio : pesce = 1 : 3. È altrettanto importante sottolineare come, al momento della elaborazione statistica dei risultati ottenuti per questa specie, sia stato necessario eliminare tutti i rilievi sperimentali relativi alla sesta replica, perché temporalmente sfasati rispetto a quelli delle restanti cinque.

Nel momento in cui, tramite GLM, si è verificato se il Mare avesse un effetto significativo sui parametri sensoriali, chimici e fisici in studio, si è dovuto prendere atto che per il nasello un effetto significativo ($p < 0.0005$) sussisteva, con due sole eccezioni (per AMP e IMP). È ragionevole supporre che il Mare non agisse “come tale”, ma perché indissolubilmente legato ad una esposizione del pesce al ghiaccio di durata differente, prima che ne fosse intrapresa la valutazione presso i laboratori di Cesenatico.

Tuttavia, poiché ogni Tesi Ghiacciatura “conteneva ciascun mare in egual misura”, sempre ricorrendo al GLM (con Tesi come fattore fisso e Mare come fattore *random*, con interazione non significativa), si è potuto egualmente confrontare le due Tesi sperimentali.

III.5.2.1 Valutazione della freschezza per via sensoriale

Il punteggio medio QI complessivo ottenuto dai naselli in esperimento per le due Tesi a confronto, nell'arco dei dieci giorni di stoccaggio praticati, è riportato in **Tabella III.19**, insieme coi relativi intervalli di confidenza. Dall'esame di questi ultimi, effettuato comparando le Tesi entro giorno di stoccaggio, si apprezza immediatamente come non sussistano differenze significative legate alla ghiacciatura.

Tabella III.19 - Valori medi e intervalli di confidenza del punteggio *Quality Index* (QI) per le due Tesi di nasello nel periodo di stoccaggio preso in esame

Parametro	Giorni di stoccaggio	Tesi	Numero di esemplari	Media	Intervallo di confidenza 95%	
					Lim. inferiore	Lim. superiore
Punteggio Quality Index (QI)	1	1	9	1	1	2
		2	9	1	0	2
	2	1	6	5	3	7
		2	6	5	3	7
	3	1	15	6	5	7
		2	15	6	5	7
	6	1	15	11	10	12
		2	15	11	10	13
	8	1	15	14	13	15
		2	15	14	12	15
	10	1	12	16	15	17
		2	12	15	12	18

Volendo esplicitare, distintamente per le due Tesi, il legame che passa fra il QI (\hat{y}) e i giorni di stoccaggio (x), si perviene alle seguenti equazioni:

$$\text{Tesi 1) } \hat{y} = 1.5703x + 1.0717 \quad R^2 = 0.8775$$

$$\text{Tesi 2) } \hat{y} = 1.5457x + 1.0684 \quad R^2 = 0.8596,$$

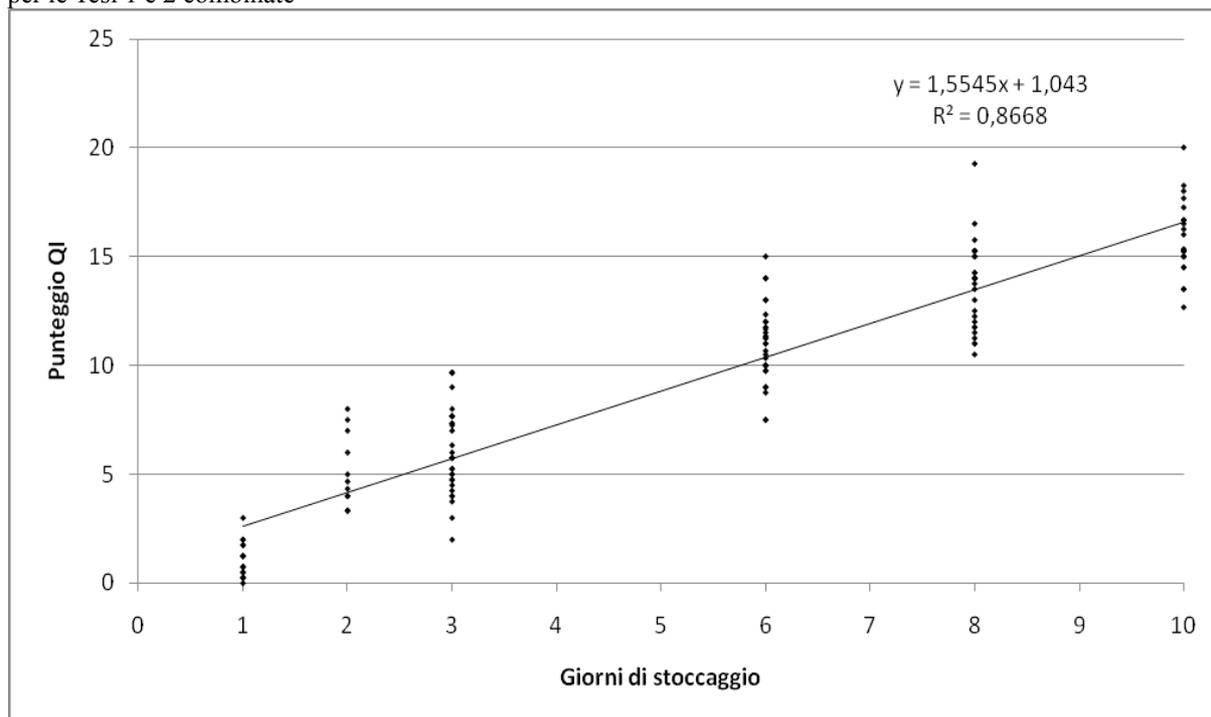
per comparare le quali è necessario studiare gli intervalli di confidenza, come da **Tabella III.20**.

Tabella III.20 – Intervalli di confidenza (95%) per il coefficiente angolare e l'intercetta delle equazioni di stima del QI nel nasello

Tesi	Coefficiente angolare		Intercetta	
	Limite infer.	Limite super.	Limite infer.	Limite super.
1	1.4304	1.7101	0.1891	1.9544
2	1.3968	1.6946	0.1286	2.0081

Proprio dal fatto che, per entrambe le Tesi, entrambi gli intervalli di confidenza di **Tabella III.20** sono sovrapponibili discende la necessità di adottare una sola equazione di regressione per stimare il QI del nasello conservato sotto ghiaccio in funzione dei giorni di stoccaggio (**Figura III.10**).

Figura III.10 – Correlazione lineare fra il QI e i giorni di stoccaggio secondo lo schema adottato per il nasello, per le Tesi 1 e 2 combinate



In definitiva, si può affermare che l'effetto ghiacciatura, nei termini in cui la si è testata, non si è rivelato statisticamente significativo. Molto probabilmente a spiegare quanto sopra può essere la “collocazione” prettamente invernale della prova che riduceva, fino ad annullarla, l'efficacia di un più consistente apporto di ghiaccio durante la permanenza in barca del pescato.

In ogni caso, l'utilità pratica di questa unica equazione di stima consiste nel fatto che, in relazione a naselli sottoposti a ghiaccature analoghe (per tempi e modalità) a quelle qui poste in atto, essa ci consente di “prevedere” il punteggio QI di freschezza sensoriale di un lotto di pesci a partire dalla sola cognizione dei giorni di stoccaggio, senza cioè dover ricorrere all'opera di panellisti addestrati.

La **Tabella III.21** permette di affiancare, distintamente per le due tesi, la categoria di freschezza assegnata ai naselli in prova secondo lo schema comunitario per il “Pesce bianco” con il punteggio medio QI. Si osserva come lo schema *Quality Index* si presti meglio di quello comunitario a rendere il senso della evoluzione dei connotati di freschezza sensoriale al passare del tempo. Per esempio, sono stati necessari sei giorni di stoccaggio perché il punteggio UE degli esemplari in studio transitasse nettamente dalla classe A alla classe B, mentre, nello stesso periodo, il QI passava dal valere mediamente 10 al valere mediamente 15, percorrendo così un abbondante 25% della propria “capacità espressiva”.

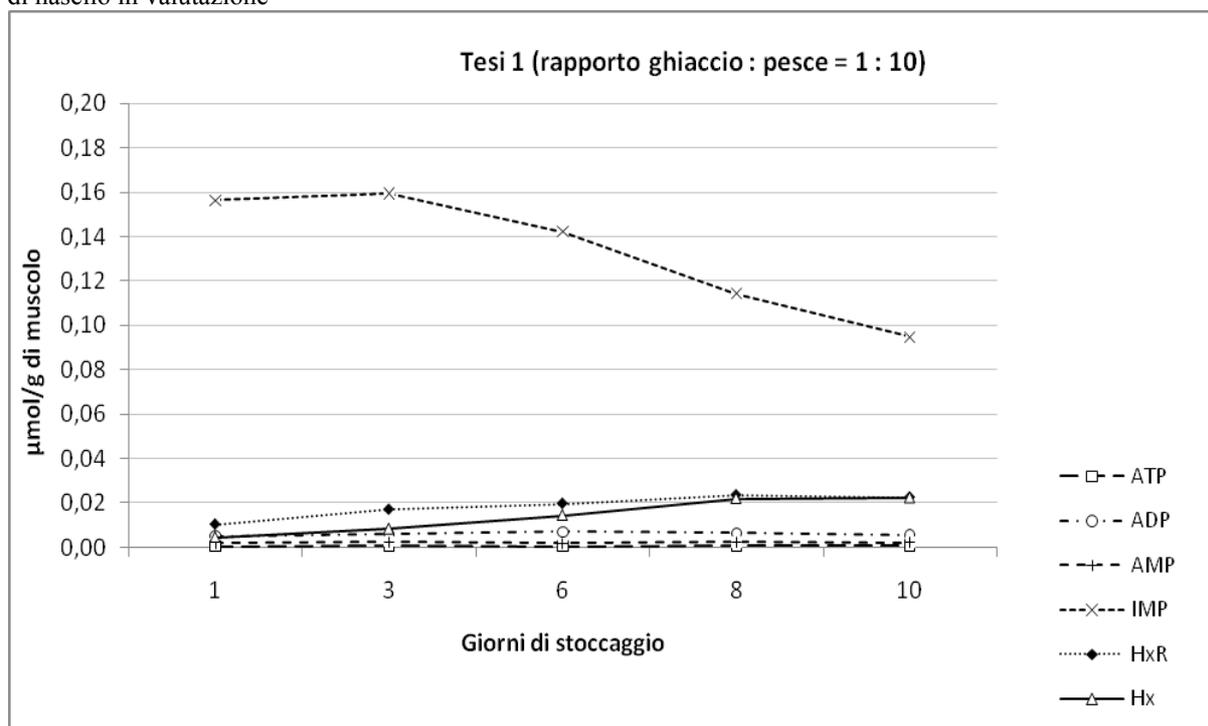
Tabella III.21 – Punteggio UE e punteggio medio QI assegnato alle due Tesi di nasello in valutazione

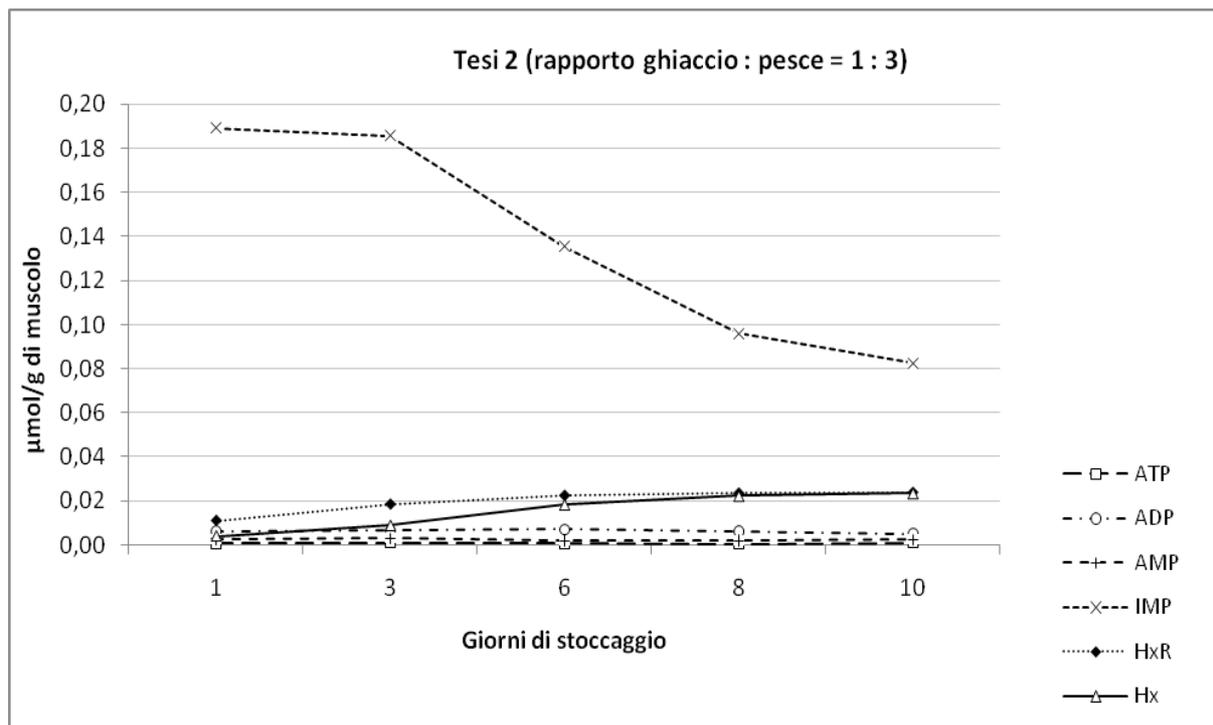
Giorni di stoccaggio	Punteggio UE	Punteggio medio QI	
		Tesi 1	Tesi 2
1	E	1	1
3	A	6	6
6	A/B	11	11
8	B	14	14
10	B/C	16	16

III.5.2.2. Valutazione della freschezza per via chimica

Lo studio dell'evoluzione temporale dell'ATP e dei suoi cataboliti negli esemplari di nasello in prova ha fatto emergere una differenza statisticamente significativa fra le due Tesi solo per l'IMP, a vantaggio della Tesi 2 che, nei primi giorni di stoccaggio, ne manteneva livelli più elevati (**Figura III.11**).

Figura III.11 – Evoluzione temporale dell'ATP e dei suoi cataboliti (ADP, AMP, IMP, HxR e Hx) nelle due Tesi di nasello in valutazione





Quanto sopra osservato, tuttavia, non si è tradotto in indici di freschezza significativamente diversi fra le Tesi, come è dato apprezzare, per quelli dotati di maggiore interesse (indici K, K_t e G), dal confronto fra i pertinenti intervalli di confidenza, come riportati a seguire (**Tabella III.22**).

Tabella III.22 – Valori medi e intervalli di confidenza per gli indici K, K_i e G in relazione alle due Tesi di nasello in valutazione

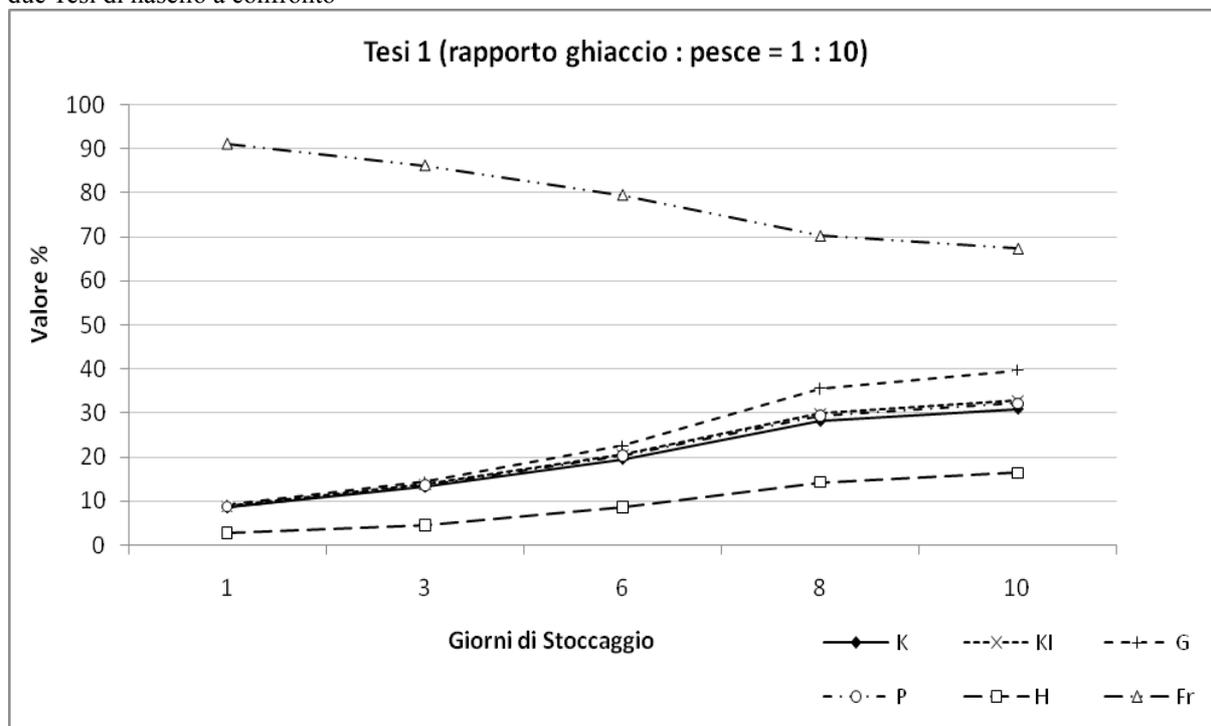
Parametro	Giorni di stoccaggio	Tesi	Numero di esemplari	Media	Intervallo di confidenza 95%		
					Lim. inferiore	Lim. superiore	
Indice K	1	1	9	12.00	5.98	18.01	
		2	9	6.81	4.89	8.72	
	2	1	6	7.82	5.64	9.99	
		2	6	8.51	4.49	12.52	
	3	1	15	12.99	9.99	15.99	
		2	15	13.22	9.89	16.54	
	6	1	15	19.24	14.31	24.16	
		2	15	22.49	16.28	28.71	
	8	1	15	28.73	21.37	36.09	
		2	15	31.82	23.00	40.65	
	10	1	12	31.88	25.76	38.00	
		2	12	31.76	17.06	46.47	
	Indice K _i	1	1	9	12.59	6.21	18.97
			2	9	7.12	5.11	9.13
2		1	6	8.17	5.89	10.44	
		2	6	8.89	4.66	13.12	
3		1	15	13.62	10.47	16.76	
		2	15	13.87	10.35	17.38	
6		1	15	20.30	15.06	25.53	
		2	15	23.76	17.15	30.37	
8		1	15	30.53	22.56	38.50	
		2	15	33.89	24.33	43.44	
10		1	12	33.88	27.30	40.47	
		2	12	34.07	18.03	50.10	
Indice G		1	1	9	13.42	5.96	20.87
			2	9	7.25	5.18	9.32
	2	1	6	8.36	6.01	10.71	
		2	6	9.14	4.73	13.56	
	3	1	15	14.32	10.86	17.78	
		2	15	14.56	10.74	18.38	
	6	1	15	22.55	16.22	28.87	
		2	15	27.48	18.64	36.33	
	8	1	15	36.82	25.22	48.43	
		2	15	42.65	27.89	57.40	
	10	1	12	41.37	31.68	51.05	
		2	12	38.89	21.14	56.64	

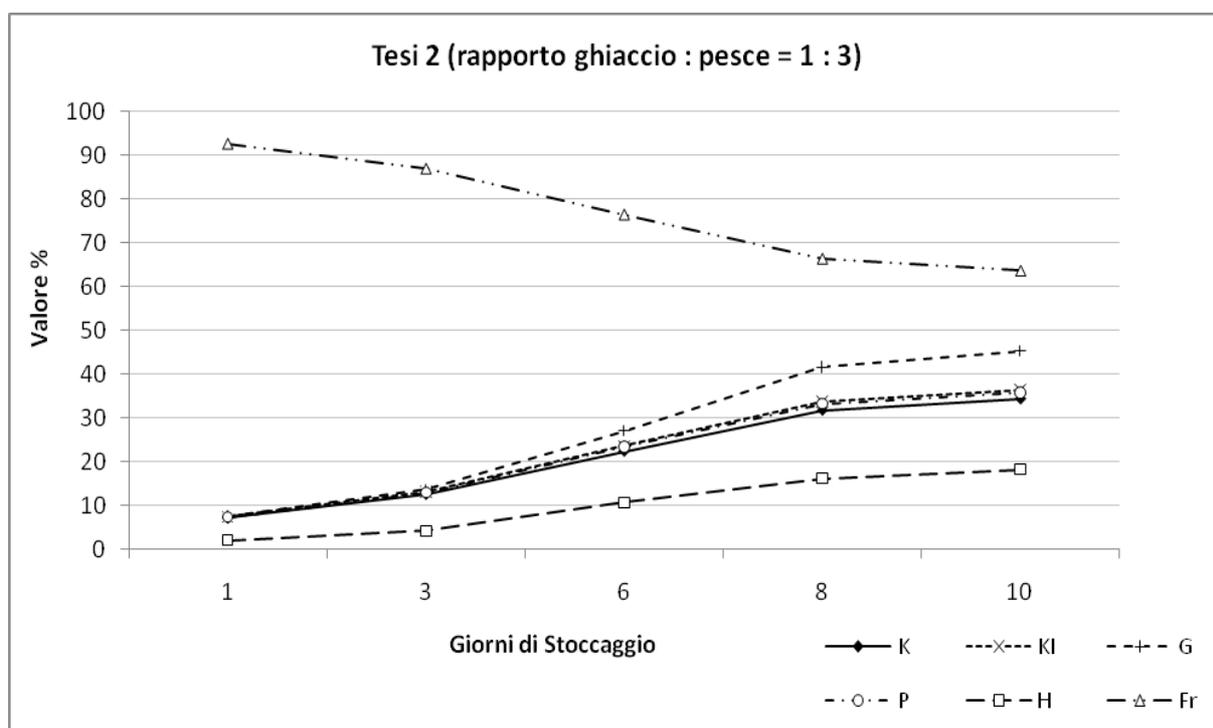
La mancanza di differenze significative fra Tesi per gli indici di freschezza, a dispetto della differenza osservata nel tenore in IMP, verosimilmente dipende dal fatto che nel computo di tali indici entrano numerosi cataboliti, il cui gioco reciproco ha attenuato, fino ad estinguerlo, l'effetto dello stesso IMP. Dai contenuti della **Tabella III.22** derivano comunque due osservazioni. La prima concerne il valore sistematicamente più basso assunto da ciascuno

degli indici li riportati per la Tesi 2 al giorno 1, che suggerirebbe per questa una superiore “espressione di freschezza”, comunque statisticamente non significativa. La seconda concerne i valori medi in un certo senso “fuori sequenza” registrati per il giorno 2 che, lo si ricorda, erano relativi solo ai capi provenienti dal Tirreno.

La rappresentazione grafica dell’andamento di tutti gli indici di freschezza calcolabili, oltre quelli menzionati in **Tabella III.22**, compare in **Figura III.12**. In effetti, se si dovesse prescegliere un indice fra quelli li presentati, la preferenza sarebbe accordata all’indice G, perché in grado di raggiungere valori più elevati rispetto a tutti quelli il cui valore cresce al passare del tempo (vale a dire tutti, tranne l’indice Fr). E’ necessario però rimarcare come l’indice G qui rimanga comunque un parametro poco illuminante, in quanto al decimo giorno di stoccaggio tocca solo il 40% del massimo raggiungibile.

Figura III.12 – Evoluzione temporale dei principale indici costruiti a partire dall’ATP e dai suoi cataboliti nelle due Tesi di nasello a confronto





III.5.2.3 Valutazione della freschezza per via fisica

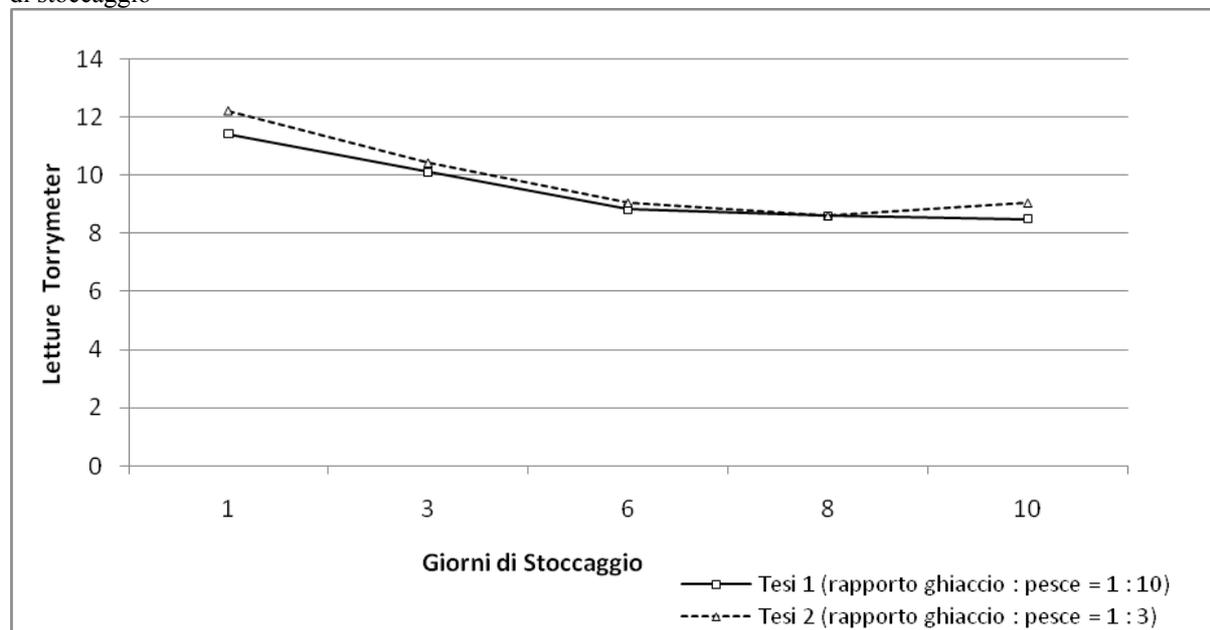
Come dato di apprezzare dalla **Tabella III.23**, le letture fornite dal Torrymeter su nasello sono risultate in pratica omogenee fra Tesi e costanti al passare del tempo di stoccaggio, il che le ha rese sostanzialmente non utili ai fini di una stima della freschezza degli esemplari sotto esame. In tabella appare la già notata anomalia al giorno 2, per la presenza, qui, dei soli capi provenienti dal Tirreno.

Tabella III.23 – Valori medi e intervalli di confidenza per le letture del Torrymeter in relazione alle due Tesi di nasello nel periodo di stoccaggio preso in esame

Parametro	Giorni di stoccaggio	Tesi	Numero di esemplari	Media	Intervallo di confidenza 95%	
					Lim. inferiore	Lim. superiore
Letture Torrymeter	1	1	9	12	11	13
		2	9	13	12	14
	2	1	6	10	8	12
		2	6	10	8	13
	3	1	15	11	10	12
		2	15	11	10	12
	6	1	15	9	8	11
		2	15	9	8	10
	8	1	15	9	8	10
		2	15	9	8	10
	10	1	12	9	8	9
		2	12	9	8	11

L'omogeneità del responso fornito dalle Tesi a confronto emerge chiara anche dalla **Figura III.13** a seguire.

Figura III.13 – Andamento delle letture medie del Torrymeter nelle due Tesi di nasello in funzione del periodo di stoccaggio



III.5.3 Triglia di fango (*Mullus barbatus*)

Premessa

Come per il nasello, anche per la triglia di fango le Tesi a confronto, poste in atto esclusivamente durante la permanenza degli esemplari in barca, erano **Tesi 1**, con rapporto ghiaccio : pesce = 1 : 10; **Tesi 2**, con rapporto ghiaccio : pesce = 1 : 3.

Nel momento in cui, tramite GLM, si è andati a verificare se il Mare di provenienza degli esemplari avesse un effetto significativo sui parametri in studio, si è dovuto prendere atto che questo si produceva solo per alcuni cataboliti dell'ATP (per la precisione per ADP, IMP, HxR e Hx), il che portava a ipotizzare, come in precedenza per il nasello, che il Mare non agisse “come tale”, ma perché la provenienza andava di conserva con una esposizione del pesce al ghiaccio di durata differente prima che, nei laboratori di Cesenatico, lo si sottoponesse ai noti rilievi di natura sensoriale, chimica e fisica.

Poiché però, come precisato a suo tempo per il nasello, ogni Tesi Ghiacciatura “conteneva ciascun mare in egual misura”, tramite GLM si è potuto procedere efficacemente al confronto fra le due Tesi sperimentali.

III.5.3.1 Valutazione della freschezza per via sensoriale

Il punteggio medio QI complessivo ottenuto dalle triglie in esperimento per le due Tesi a confronto, nell'arco degli otto giorni di stoccaggio praticati, è riportato in **Tabella III.24**, insieme coi relativi intervalli di confidenza. Anche per questa specie, come dato vedere dal sovrapporsi più o meno completo degli intervalli di confidenza, si può concludere circa l'assenza di differenze significative fra le Tesi per la freschezza sensoriale.

Tabella III.24 – Valori medi e intervalli di confidenza del punteggio *Quality Index* (QI) per le due tesi di triglia nel periodo di stoccaggio preso in esame

Parametro	Giorni di stoccaggio	Tesi	Numero di esemplari	Media	Intervallo di confidenza 95%	
					Lim. inferiore	Lim. superiore
Punteggio Quality Index (QI)	1	1	18	4	3	6
		2	18	5	3	6
	3	1	18	9	8	10
		2	18	8	7	9
	6	1	15	14	12	15
		2	15	13	12	15
	8	1	18	17	16	19
		2	18	16	14	18

Volendo esplicitare, distintamente per le due Tesi, il legame che passa fra il QI (\hat{y}) e i giorni di stoccaggio (x), si perviene alle seguenti equazioni:

$$\text{Tesi 1) } \hat{y} = 1.8872x + 2.3698 \quad R^2 = 0.8462$$

$$\text{Tesi 2) } \hat{y} = 1.8110x + 2.3166 \quad R^2 = 0.8152,$$

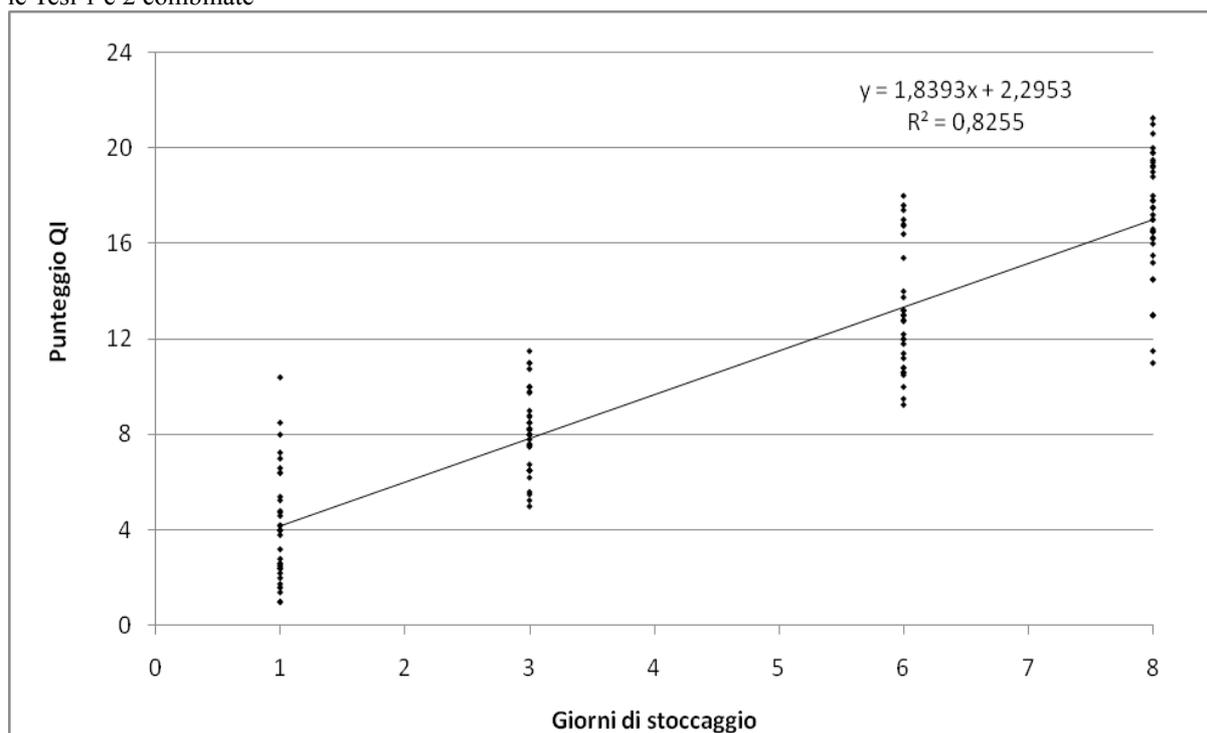
per comparare le quali è necessario studiare gli intervalli di confidenza, come da **Tabella III.25**.

Tabella III.25 – Intervalli di confidenza (95%) per il coefficiente angolare e l'intercetta delle equazioni di stima del QI nella triglia

Tesi	Coefficiente angolare		Intercetta	
	Limite infer.	Limite super.	Limite infer.	Limite super.
1	1.6910	2.0834	1.3480	3.3916
2	1.6007	2.0212	1.2215	3.4117

Poiché entrambi gli intervalli di confidenza riportati in **Tabella 25** sono sovrapponibili, ne deriva la necessità di adottare una sola equazione di regressione utile a stimare il QI della triglia conservata sotto ghiaccio in funzione dei giorni di stoccaggio (**Figura III.14**).

Figura III.14 – Correlazione lineare fra QI e i giorni di stoccaggio secondo lo schema adottato per la triglia, per le Tesi 1 e 2 combinate



Anche per la triglia sembra necessario concludere che, nei termini in cui le due Tesi sono state poste a confronto, la ghiacciatura è stata priva di effetto statisticamente significativo. Al pari di quanto accaduto per il nasello, questo potrebbe essere ricondotto alla collocazione temporale della sperimentazione, anche in questo caso invernale.

In **Tabella III.26** è possibile apprezzare, in un certo senso, la corrispondenza fra la classificazione comunitaria assegnata alle triglie oggetto di valutazione adottando lo schema per il “Pesce bianco” ed il punteggio medio QI. Ci sembra il caso di evidenziare come a fronte di una ferma evoluzione del punteggio QI al susseguirsi dei giorni di stoccaggio, l’evoluzione nella categoria UE sia meno netta, perché più sfumati i contorni delle categorie.

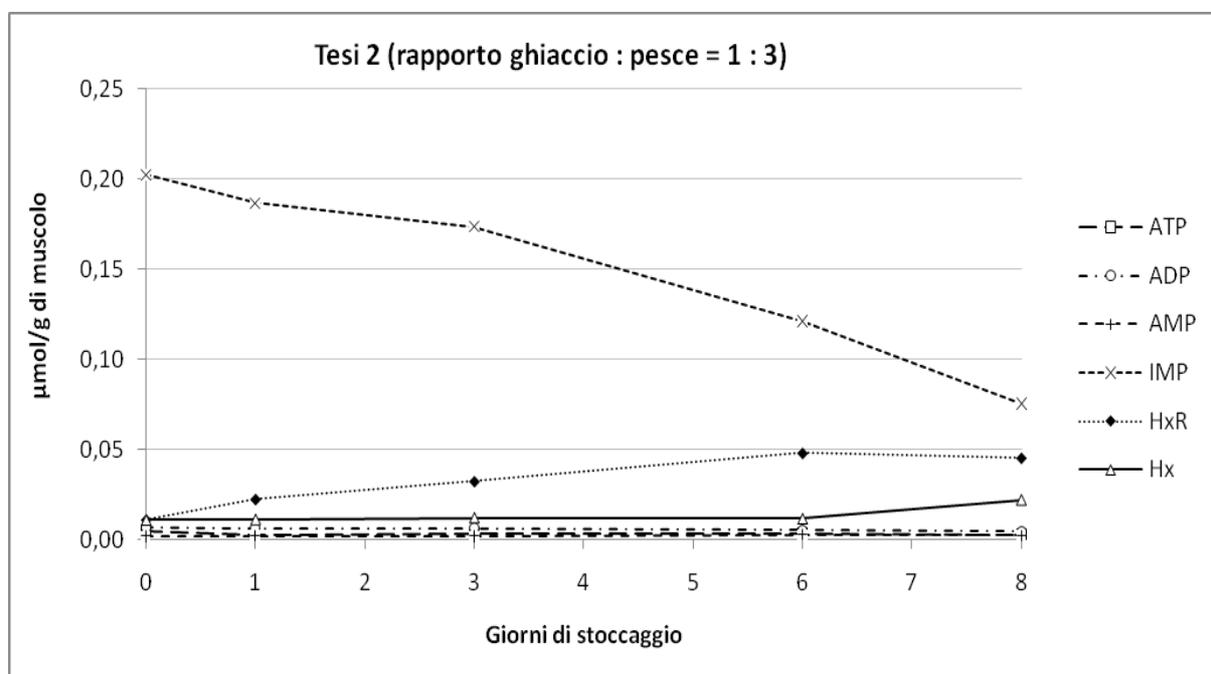
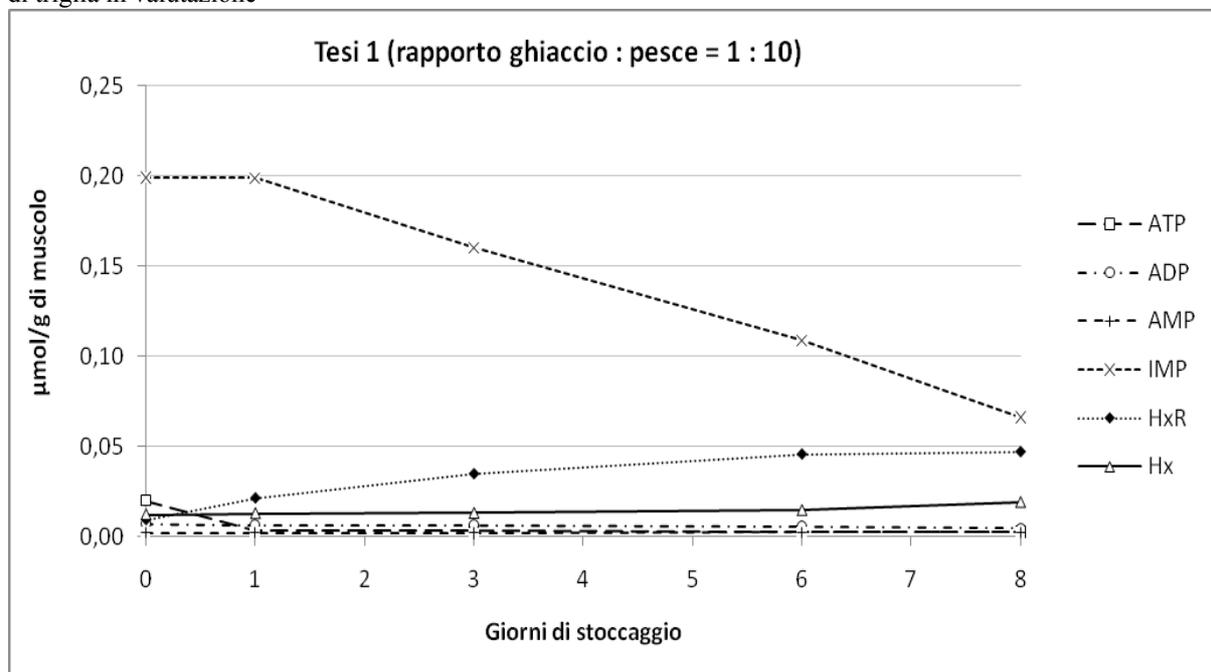
Tabella III.26 – Punteggio UE e punteggio medio QI assegnato alle due Tesi di triglia in valutazione

Giorni di stoccaggio	Punteggio UE	Punteggio medio QI	
		Tesi 1	Tesi 2
1	E	4	4
3	A	9	7
6	A/B	13	13
8	B/C	17	17

III.5.3.2 Valutazione della freschezza per via chimica

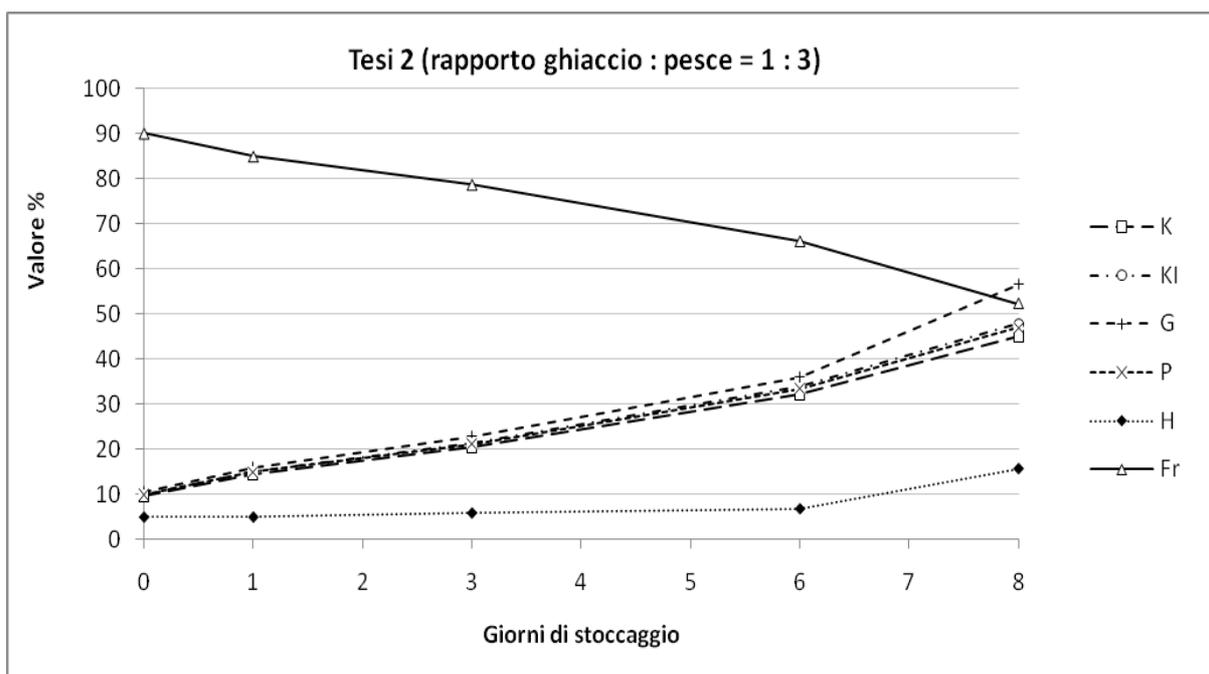
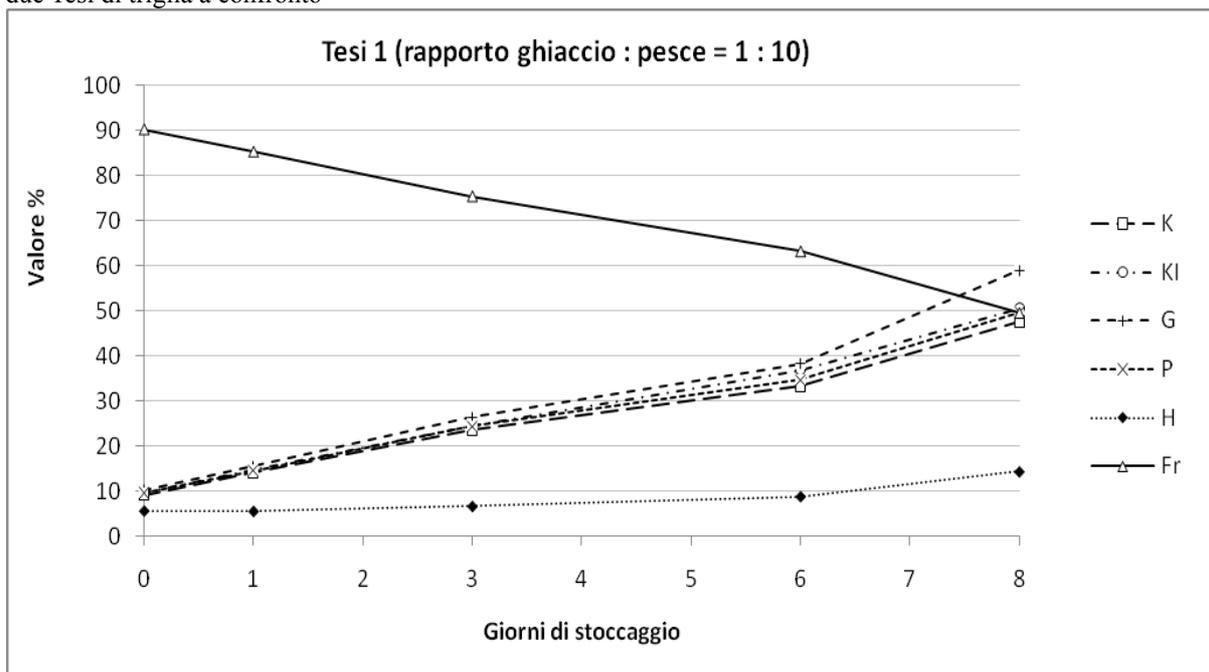
L'evoluzione temporale dell'ATP e dei suoi cataboliti negli esemplari di triglia in prova è risultata praticamente sovrapponibile nelle due Tesi (**Figura III.15**).

Figura III.15 – Evoluzione temporale dell'ATP e dei suoi cataboliti (ADP, AMP, IMP, HxR e Hx) nelle due Tesi di triglia in valutazione



Considerazioni di taglio analogo quanto alla non-distinguibilità delle Tesi si applicano a tutti gli indici di freschezza calcolabili, come rappresentati in **Figura III.16**.

Figura III.16 – Evoluzione temporale dei principale indici costruiti a partire dall'ATP e dai suoi cataboliti nelle due Tesi di triglia a confronto



Al pari di quanto osservato per il nasello, anche per la triglia l'indice G appare rivestire particolare interesse potendo addirittura sfiorare, all'ottavo giorno di stoccaggio, il 60% del massimo raggiungibile (vedi **Tabella III.27**).

Tabella III.27 – Valori medi e intervalli di confidenza per gli indici K, K₁ e G in relazione alle due Tesi di triglia in valutazione

Parametro	Giorni di stoccaggio	Tesi	Numero di esemplari	Media	Intervallo di confidenza 95%		
					Lim. inferiore	Lim. superiore	
Indice K	0	1	9	9.09	7.19	10.99	
		2	9	9.48	6.25	12.70	
	1	1	18	14.11	11.30	16.91	
		2	18	14.45	11.84	17.06	
	3	1	18	23.50	19.04	27.95	
		2	18	20.47	15.49	25.44	
	6	1	15	33.17	27.18	39.16	
		2	15	32.17	28.63	35.70	
	8	1	18	47.63	42.74	52.51	
		2	18	45.06	40.34	49.78	
	Indice K ₁	0	1	9	9.71	7.70	11.71
			2	9	9.90	6.51	13.30
1		1	18	14.69	11.72	17.65	
		2	18	15.06	12.33	17.78	
3		1	18	24.57	19.91	29.23	
		2	18	21.33	16.11	26.54	
6		1	15	36.79	32.53	41.04	
		2	15	33.92	30.16	37.68	
8		1	18	50.51	45.21	55.80	
		2	18	47.77	42.54	53.00	
Indice G		0	1	9	10.23	8.01	12.44
			2	9	10.39	6.70	14.07
	1	1	18	15.50	12.27	18.72	
		2	18	15.82	12.74	18.90	
	3	1	18	26.30	20.93	31.66	
		2	18	22.80	16.48	29.12	
	6	1	15	38.23	30.83	45.63	
		2	15	35.87	31.73	40.02	
	8	1	18	58.89	50.22	67.56	
		2	18	56.57	48.33	64.82	

III.5.3.3 Valutazione della freschezza per via fisica

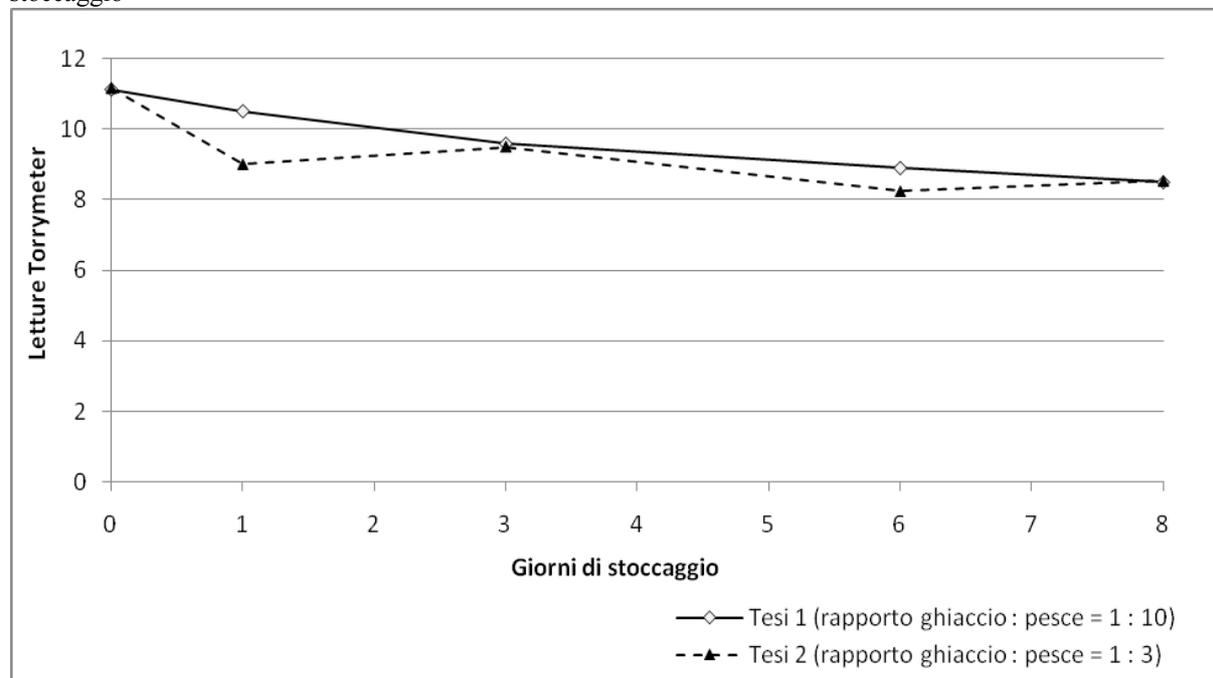
Gli intervalli di confidenza per le letture Torrymeter nelle due Tesi si sfiorano per due giorni nell'ambito del periodo di stoccaggio, il giorno "1" e il giorno "6", quando sono stati gli esemplari della Tesi più "generosamente" ghiacciata a far registrare valori minori (**Tabella III.28 e Figura III.17**).

Tabella III.28 – Valori medi e intervalli di confidenza per le letture del Torryster in relazione alle due Tesi di triglia nel periodo di stoccaggio preso in esame

Parametro	Giorni di stoccaggio	Tesi	Numero di esemplari	Media	Intervallo di confidenza 95%	
					Lim. inferiore	Lim. superiore
Lettura Torryster	0	1	9	11	11	12
		2	9	11	11	12
	1	1	18	11	10	12
		2	18	9	8	10
	3	1	18	10	9	11
		2	18	10	9	11
	6	1	15	9	9	10
		2	15	8	8	9
	8	1	18	9	7	10
		2	18	9	8	9

Il fenomeno in questione, peraltro assente nei restanti giorni di rilevazione (il che potrebbe anche essere ricondotto al fatto che le letture Torryster venivano effettuate su capi differenti in ciascuna delle giornate di osservazione), andrebbe maggiormente indagato, almeno per escludere che una maggiore conducibilità elettrica in alcuni esemplari della Tesi 2 non sia la risposta ad un certo danno da freddo.

Figura III.17 – Andamento delle letture medie del Torryster nelle due Tesi di triglia in funzione del periodo di stoccaggio



III.6 Qualità Freschezza: Considerazioni Conclusive

Seppia (*Sepia officinalis*)

- Dal *punto di vista sensoriale*, l'applicazione di ghiaccio fondente sopra gli esemplari durante la permanenza in barca ne peggiora significativamente l'aspetto superficiale dorsale, il colore della pupilla e la limpidezza della cornea, mentre non sussiste differenza fra gli esemplari che in barca sono stati mantenuti su un letto di ghiaccio e quelli mantenuti in assenza di ghiaccio.
- Dal *punto di vista chimico*, gli esemplari delle Tesi che hanno visto l'uso del ghiaccio in barca, comunque collocato, hanno fatto registrare un più lento decadimento dell'Adenosina Monofosfato (AMP) e un meno ripido incremento degli indici correlati negativamente con la freschezza chimica. L'indice più utile ad esprimere tale freschezza appare l'incidenza percentuale della ipoxantina sull'AMP.
- Dal *punto di vista fisico*, le Tesi a confronto non si sono minimamente differenziate.

Nasello (*Merluccius merluccius*)

- Dal *punto di vista sensoriale*, le Tesi a confronto non si sono differenziate in modo statisticamente significativo, il che è stato ricondotto alla collocazione prettamente invernale della prova.
- Dal *punto di vista chimico*, a dispetto di un tenore in Inosina Monofosfato (IMP) significativamente più elevato nei primi giorni di stoccaggio, la Tesi con ghiacciatura più generosa non ha manifestato superiorità qualitativa per nessuno degli indici di freschezza chimica. Tra questi, l'indice che si segnala come da preferire è "G".
- Dal *punto di vista fisico*, le Tesi a confronto non si sono minimamente differenziate.

Triglia di fango (*Mullus barbatus*)

- Dal *punto di vista sensoriale*, le Tesi a confronto non si sono differenziate in modo statisticamente significativo, il che è stato ricondotto alla collocazione prettamente invernale della prova.
- Dal *punto di vista chimico*, le Tesi a confronto non si sono significativamente differenziate per l'evoluzione temporale né dell'ATP e relativi cataboliti, né degli indici di freschezza chimica, fra i quali ancora una volta è da preferire "G".
- Dal *punto di vista fisico*, le Tesi a confronto si sono differenziate in due giornate nell'ambito dell'intero periodo di prova, a "sfavore" della Tesi più generosamente ghiacciata.

III.7 Bibliografia

- Anon. (2009). Distell Fish Freshness Meter “Torrymeter”, User and Technical Manual Version 2.7. <http://www.distell.com/downloads/Distell.com%20User%20Manual%20FFM.pdf>
- Barbosa A., Brenner H.A. (2002). The meaning of shell life. In (H. A. Brenner Ed): *Safety and quality issues in fish processing*. Woodhead Publishing in Food Science and Technology, Cambridge, UK.
- Bekaert K., Maryssael P., Desmyter B. (2007). Handleiding voor de Beoordeling van de Versheid van Vis Volgens de Kwaliteit Index Methode. V.U. Redercentrale, Dhr. Emiel Brouckaert, Hendrik Baelskaai 25 - 8400 Oostende, Belgium, pp. 43.
- Botta J.R. (1995). *Evaluation of seafood freshness quality*. VCH Publishers, Inc., New York, NY, USA.
- Brenner H.A. (2000). Toward practical definitions of quality for food science. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(1), 83–90.
- Brenner H. A., Sakaguchi M. (2000). A critical look at whether ‘Freshness’ can be determined. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 9(3), 5–25, DOI:10.1300/J030v09n03_02.
- Brenner, H. A. (2002). Understanding the concepts of quality and freshness in fish, 163–172. In (H. A. Brenner Ed): *Safety and quality issues in fish processing*. Woodhead Publishing in Food Science and Technology, Cambridge, UK.
- Burns B.G., Ke P.J., Irvine B.B. (1985). *Objective Procedure for Fish Freshness Evaluation Based on Nucleotide Changes using a HPLC System*. Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences, No. 1373, pp. 41, <http://www.dfo-mpo.gc.ca/Library/38070.pdf> (ultimo accesso 12/04/2012)
- Gärdenfors P. (2000). *Conceptual spaces: the geometry of thought*. Cambridge, MA, US: The MIT Press, <http://trac.assembla.com/soray/export/243/user/Henry/readings/Conceptual%20Spaces.pdf>.
- Gill T.A., Thompson J.W., Gould S., Sherwood D. (1987). Characterization of quality deterioration of yellowfin tuna. *Journal of Food Science*, 52: 580–583.
- Harada K. (1988). Presenting fish for sale on the Japanese market. *Australian Fisheries*, 47(6), 3842.
- Howgate P. (2006). A review of the kinetics of degradation of inosine monophosphate in some species of fish during chilled storage. *International Journal of Food Science and*

- Technology*, 41: 341–353.
- Huss H.H. (1988). *Fresh Fish – Quality and Quality Changes: a Training Manual Prepared for the FAO/DANIDA Training Programme on Fish Technology and Quality Control*. Fisheries Report Series No. 29, pp. 132. Food & Agriculture Organization, Roma.
- Hyldig G., Bremner A., Martinsdóttir E., Schelvis R. (2007). Quality Index Methods, 529–547. In (L.M.L. Nollet et al., Eds): *Handbook of Meat, Poultry and Seafood Quality*. Blackwell Publishing, Ames, IA, USA
- Karube I., Matsuoka H., Suzuki S., Watanabe E., Toyama T. (1984). Determination of fish freshness with an enzyme sensor system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32. 314–319.
- Kent M., Oehlenschläger J. (2009). Measuring electrical properties, 286-300. In (H. Rehbein & J. Oehlenschläger, Eds): *Fishery Products. Quality, Safety and Authenticity*. Wiley-Blackwell, Chichester, West Sussex, UK.
- Landis J., Koch G. (1977). The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, 33, 159–174.
- Luong J.H.T., Male K.B., Masson C., Nguyen A.L. (1992). Hypoxanthine ratio determination in fish extract using capillary electrophoresis and immobilized enzymes. *Journal of Food Science*, 57, 77–81.
- Meiselman H.L. (2001). Criteria of food quality in different contexts. *Food Service Technology*, 1, 67–84.
- Márquez-Ríos E., Morán-Palacio E.F., Lugo-Sánchez M.E., Ocano-Higuera V.M., Pacheco-Aguilar R. (2007). Postmortem biochemical behavior of giant squid (*Dosidicus gigas*) mantle muscle stored in ice and its relation with quality parameters. *Journal of Food Science*, 72, C356–C362.
- Martinsdóttir E., Schelvis R., Hyldig G., Sveinsdóttir K. (2009). Sensory evaluation of seafood: methods, 425–443. In (H. Rehbein & J. Oehlenschläger, Eds): *Fishery Products. Quality, Safety and Authenticity*. Wiley-Blackwell, Chichester, West Sussex, UK.
- Ohashi E., Okamoto M., Ozawa A., Fujita T. (1991). Characterization of common squid using several freshness indicators. *Journal of Food Science*, 56, 161–163, 174.
- Ryder J. M. (1985). Determination of adenosine triphosphate and its breakdown products in fish muscle by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 33, 678–680.
- Saito T., Arai K., Matsuyoshi M. (1959). A new method for estimating the freshness of fish.

Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 24, 749–750.

- Shahidi F., Chong X., Dunajski E. (1994). Freshness quality of harp seal (*Phoca groenlandica*) meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 868–872.
- Sykes A.V., Oliveira A.R., Domingues P.M., Cardoso C.M., Andrade J.P., Nunes M.L. (2009). Assessment of European cuttlefish (*Sepia officinalis*, L.) nutritional value and freshness under ice storage using a developed Quality Index Method (QIM) and biochemical methods. *LWT - Food Science and Technology*, 42, 424–432.
- Tejada M. (2009). ATP-derived products and K-value determination, 68–88. In (H. Rehbein & J. Oehlenschläger, Eds): *Fishery Products. Quality, Safety and Authenticity*. Wiley-Blackwell, Chichester, West Sussex, UK.
- Triqui R. (2006). Sensory and flavor profiles as a means of assessing freshness of hake (*Merluccius merluccius*) during ice storage. *European Food Research and Technology*, 222, 41–47.
- Vaz-Pires P., Seixas P., Mota M., Lapa-Guimarães J., Pickova J., Lindo A., Silva T. (2008). Sensory, microbiological, physical and chemical properties of cuttlefish (*Sepia officinalis*) and broadtail shortfin squid (*Illex coindetii*) stored in ice. *LWT - Food Science and Technology*, 41, 1655–1664.
- Yokoyama Y., Takahashi S., Sakaguchi M., Kawai F., Kanamori M. (1994). Postmortem changes of ATP and its related compounds and freshness indices in spear squid *Doryteuthis bleekeri* muscles. *Fisheries Science*, 60, 583–587.

PROGETTI:

Progetto coordinato MIPAAF, Valorizzazione della produzione ittica nazionale mediante valutazione dei rischi e standardizzazione della qualità. Bando Decreto 5 dicembre 2006. Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana, Serie generale n. 297 del 22 dicembre, 29–32,
http://www.izs.it/bollettino_segn_legislative/bollettini_2006/dicembre/1.pdf

NORME:

- ISO 8402 (1994). *Quality management and quality assurance – Vocabulary*, www.iso.org/iso/iso_catalogue/catalogue_ics/catalogue_detail_ics.htm?csnumber=20115
- ISO 9000 (2000). *Quality management systems — Fundamentals and vocabulary*, www.iso.org/iso/iso_catalogue/catalogue_ics/catalogue_detail_ics.htm?csnumber=29280.
- ISO 9000. (2005). *Quality management systems — Fundamentals and vocabulary*. www.seatone.cn/news/upfile/2006519845492059.pdf.
- ISO/AWI 9000. *Quality management systems — Fundamentals and vocabulary*,

REGOLAMENTI:

Reg. (CE) N. 2406/96 (1997). Regolamento (CE) N. 2406/96 del Consiglio del 26 novembre 1996 che stabilisce norme comuni di commercializzazione per taluni prodotti della pesca. Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana, 2^a Serie speciale n. 13 del 17.02.1997, 10-24.

Regolamento (CE) N. 104/2000 del Consiglio del 17 dicembre 1999 relativo all'organizzazione comune dei mercati nel settore dei prodotti della pesca e dell'acquacoltura. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, L 17 del 21.1.2000, 22–52.

Regolamento (CE) N. 2065/2001 della Commissione del 22 ottobre 2001 che stabilisce le modalità d'applicazione del regolamento (CE) n. 104/2000 del Consiglio per quanto concerne l'informazione dei consumatori nel settore dei prodotti della pesca e dell'acquacoltura. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, L 278 del 23.10.2001, 6–8.

Regolamento (CE) N. 178/2002 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 28 gennaio 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. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, L31 del 1.2.2002, 1–24.

Regolamento (CE) 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 e abroga la direttiva 87/250/CEE della Commissione, la direttiva 90/496/CEE del Consiglio, la direttiva 1999/10/CE della Commissione, la direttiva 2000/13/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, le direttive 2002/67/CE e 2008/5/CE della Commissione e il regolamento (CE) n. 608/2004 della Commissione. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, L 304 del 22.11.2011, 18–63.

Parte IV: Studi del Profilo Nutrizionale

IV.1 Profilo nutrizionale

Con “profilo nutrizionale” si intende la composizione in nutrienti di un alimento o di una dieta (Agostoni et al., 2010a). Così, definire il profilo nutrizionale di un alimento e classificarlo in base alla sua composizione serve a delineare, e quindi cercare di perseguire, una “dieta bilanciata”, partendo dal presupposto che l’equilibrio dietetico complessivo può essere raggiunto integrando un'ampia gamma di alimenti con profili nutrizionali diversi. (Agostoni et al., 2010a). Tra gli alimenti disponibili, quelli con il ruolo più importante per la dieta quotidiana sono oli vegetali, prodotti lattiero-caseari, cereali e prodotti a base di cereali, frutta e ortaggi e prodotti a base di frutta e ortaggi, carne e prodotti a base di carne, pesce e prodotti a base di pesce, bevande analcoliche. Ognuno di essi presenta una composizione nutrizionale sostanzialmente diversa come diversa è anche la frequenza di assunzione da parte dei consumatori. Considerato questo aspetto, alla base delle raccomandazioni scientifiche riferite all’assunzione calorica e nutrizionale quotidiana (Flynn et al., 2009; U.S.D.A., 2010), vi è il principio per cui ogni alimento può influire, positivamente o negativamente, sull’equilibrio dietetico complessivo, proprio in relazione a determinate sostanze nutritive che lo compongono.

In generale, le sostanze nutritive a cui si fa riferimento, siano esse derivanti da vegetali o da animali, sono acqua, proteine totali ed aminoacidi essenziali, lipidi totali ed acidi grassi (saturi, monoinsaturi e polinsaturi), colesterolo, carboidrati (disponibili e solubili), zuccheri (glucosio, fruttosio, galattosio, saccarosio, maltosio, lattosio), amido, fibre, minerali (macro e microelementi) e vitamine essenziali (Gnagnarella et al., 2004)

L'importanza dell'apporto quotidiano delle sostanze sopra elencate sta nel fatto che uno squilibrio di anche una sola di queste categorie di molecole può creare gravi problemi alla salute. Infatti, oggi, almeno nella società occidentale, si tende ad avere una dieta più ricca di alcuni nutrienti (per esempio grassi e zuccheri semplici) e povera in altri (per esempio fibre), abitudine che può predisporre a malattie metaboliche (Sofi et al., 2005; Belahsen e Rguib, 2006). Per fare un esempio, basti ricordare come un apporto eccessivo quotidiano di acidi grassi saturi o di colesterolo può predisporre a patologie miocardiche (Yusuf et al., 2004; World Health Organization, 2009), mentre una carenza in DHA (un acido grasso polinsaturo della serie omega 3) può predisporre a disfunzioni cognitive (McCann e Ames, 2005; Uauy e

Dangour, 2006).

E' chiaro, quindi, quanto sia importante essere a conoscenza dell'apporto nutritivo dei diversi prodotti alimentari.

Per raggiungere lo scopo, a livello Europeo si è agito su più fronti. Da un lato è stato redatto un regolamento che disciplina le informazioni nutrizionali da fornire in etichetta, mentre, dall'altro, ogni singolo Stato ha spinto il mondo della ricerca a creare database alimentari, sotto forma di portali telematici accessibili a tutti, dove vengono contenute le indicazioni nutrizionali degli alimenti più consumati.

Con l'intento di stabilire regole chiare per l'utilizzo delle indicazioni nutrizionali di ciascun alimento e per rendere obbligatorie quelle “informazioni sulle caratteristiche nutrizionali che consentano ai consumatori, compresi quelli che devono seguire un regime alimentare speciale, di effettuare scelte consapevoli” (Reg. 1169/2011), l'Unione Europea ha emanato la direttiva CEE. N. 90/496, successivamente il Reg. n. 1924/2006 (Reg. n. 1924/2006), abrogato la prima e modificato (solo in parte) il secondo dal più ampio e completo Regolamento N.1169/2011 (Reg. 1169/2011). Dopo aver espressamente vietato la possibilità di fornire in etichetta informazioni dietetiche forvianti o non dimostrate scientificamente, la recente normativa impone (art. 9 del Reg. 1169/2011), tra l'elenco di indicazioni obbligatorie, di fornire una dichiarazione nutrizionale. Questa dichiarazione deve recare il valore energetico dell'alimento, la quantità in grassi totali, in acidi grassi, la quantità di carboidrati totali, di zuccheri, di proteine totali e di sale. A queste possono essere integrate indicazioni su acidi grassi monoinsaturi, acidi grassi polinsaturi, polioli, amido, fibre (art. 30 Reg. 1169/2011). Per definire i profili nutrizionali di ciascun alimento, è obbligatorio, poi, tener conto del ruolo e dell'importanza per la dieta quotidiana di determinate categorie alimentari e del loro apporto di sostanze nutritive alla dieta complessiva della popolazione o di gruppi specifici (bambini, donne in gravidanza, anziani, soggetti con patologie) (Reg. N. 1924/2006). Inoltre, esistendo una variabilità nelle abitudini e nelle tradizioni alimentari tra gli Stati Membri, viene imposto che le informazioni nutrizionali si riferiscano alle linee guida degli Stati Membri sviluppate secondo le necessità dei propri cittadini (Reg. N. 1924/2006).

È stato dimostrato (Freisling et al. 2010), infatti, che, esistendo abitudini al consumo diverse in base alla zona di origine, i cittadini Europei non consumano i nutrienti principali in medesima misura. Per fare un esempio, il pattern nutrizionale dei cittadini del bacino Mediterraneo, come l'Italia e la Grecia, è dominato da alte concentrazioni di vitamina E e di MUFA (acidi grassi monoinsaturi), per via del forte consumo di olio d'oliva e di alimenti di origine vegetale. Contrariamente, sono presenti alte concentrazioni di SFA (acidi grassi

saturi), di vitamina A e D, così come basse concentrazioni di MUFA (acidi grassi monoinsaturi) ed alte concentrazioni di zuccheri semplici nei pattern nutrizionali dei cittadini tedeschi, inglesi o olandesi, fortemente abituati al consumo di latte e carne.

Per questo da qualche anno, con lo scopo di fornire al consumatore una serie di semplici informazioni alimentari e di proteggerne contemporaneamente la salute, molti Stati hanno favorito la creazione di banche dati alimentari nazionali, in cui vengono riportate tutte le informazioni sui prodotti più consumati, contemporaneamente alla compilazione ed alla diffusione di proprie linee guida.

Con l'idea di standardizzare le informazioni sugli alimenti (Egan et al., 2007), è parsa opportuna, in ambito europeo, la creazione di un'unica fonte a cui cittadini potessero riferirsi. Per questo, è nata EuroFIR, un'associazione *no-profit* inter-statale che mette a disposizione i dati sulle composizioni alimentari provenienti dai database dei singoli Stati Membri (<http://www.eurofir.net/home>). Per quanto riguarda i singoli Stati, gli enti principali a cui fare riferimento per la salute pubblica e, quindi, per la compilazioni delle banche date nazionali sono il 'Fødevareinstituttet' in Danimarca (http://www.foodcomp.dk/v7/fcdb_default.asp), il 'Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz' da cui si risale alla banca dati 'Bundeslebensmittelschlüssel' (BLS) in Germania (<http://www.bls.nvs2.de/index.php?id=39&L=1>), l'Agence nationale de sécurité sanitaire' (ANSES) in Francia (www.anses.fr/), l'Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición' (AESAN) in Spagna, la Società Italiana di Nutrizione Umana (SINU) (www.sinu.it) da cui è nato l'Istituto Nazionale di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione' (INRAN) (<http://www.inran.it/>) o la 'Banca Dati di Composizione degli Alimenti per Studi Epidemiologici (BDA) (<http://www.ieo.it/bda2008/homepage.aspx>) in Italia. Da menzionare, negli Stati Uniti, il Dipartimento di Agricoltura (USDA) (www.usda.gov) la cui divulgazione delle 'Dietary Guidelines for Americans' ha per molti anni ispirato le banche dati di altri Paesi nel mondo (Haytowitz et al., 2009).

In generale, le banche dati di ogni Paese sono organizzate più o meno nel medesimo modo. I prodotti alimentari sono identificati da un codice individuale, il valore di ogni componente nutritivo è abbinato ad un codice bibliografico, seguito dal codice specifico che identifica il prodotto alimentare nella sorgente originale. Inoltre, un ulteriore codice può essere aggiunto per indicare se il componente è mostrato esattamente come riportato nella pubblicazione originale o è stato ricalcolato. I calcoli sull'apporto nutrizionale si basano sapendo che vengono apportati 17 kJ (4 kcal) per ogni grammo di proteine, 16 kJ (3.75 kcal) per carboidrati disponibili (espressi come monosaccaridi equivalenti), 37 kJ (9 kcal) per

grammo di grassi totali e 29 kJ (7 kcal) per grammo di alcohol (Royal Society, 1972; Greenfield e Southgate, 2003)

IV.2 Linee guida per la popolazione Italiana

Secondo la definizione originale (Keys, 1995), la dieta mediterranea è caratterizzata da un alto consumo di olio d'oliva, di verdure, di legumi, di prodotti integrali, di frutta e noci. L'assunzione di grassi animali saturi è relativamente bassa ed un consumo moderato di pesce (a seconda della vicinanza al mare) fornisce un apporto sufficiente di grassi polinsaturi. Infine, il vino rosso, generalmente consumato durante i pasti, è la fonte alcolica principalmente assunta e relativamente più diffusa rispetto ad altre bevande. Tuttavia, è indubbio che non esiste una “unica” dieta “mediterranea”, poiché, come alcune recenti indagini nutrizionali hanno dimostrato (Belahsen e Rguib, 2006), le abitudini alimentari dei paesi che si affacciano sul Mediterraneo variano considerevolmente.

In Italia, fin dal 1986 l'INRAN si è fatto carico di analizzare e controllare gli alimenti più consumati nella penisola ed ha predisposto, e successivamente diffuso, le prime “Linee guida per una sana alimentazione italiana” che, prima nel 1997, poi nel 2003, sono state revisionate (Cialfa et al., 2003).

Alla base di queste modifiche, esiste la consapevolezza che, a causa della continua evoluzione delle conoscenze scientifiche circa il ruolo dei singoli nutrienti e i relativi bisogni nell'ambito di una dieta equilibrata, così come l'incessante mutamento dei consumi, delle abitudini e degli orientamenti alimentari e degli stili di vita, è necessario un continuo aggiornamento dei dati a disposizione, “nel quadro di una società che dimostra sempre più attenzione alle correlazioni fra alimentazione e salute, ma che contemporaneamente vede aumentare sia le patologie legate a una dieta abituale eccessiva e/o squilibrata, sia la confusione e la disinformazione circa ruoli e funzioni di alimenti e di nutrienti”. (Cialfa et al., 2003).

In sintesi, le linee guida redatte dall'INRAN consigliano movimento quotidiano, il consumo regolare di ortaggi e frutta fresca, l'aumento del consumo di acqua e la riduzione del consumo di alcolici, la riduzione di sale come condimento, la preferenza, come fonti di carboidrati, di amidi rispetto a zuccheri semplici e la riduzione del consumo di grassi.

Per quel che riguarda la fonte di grassi occorre però fare un piccolo inciso. I lipidi infatti, anche se forniscono energia in maniera concentrata e di conseguenza la loro

assunzione deve essere moderata (Cialfa et al., 2003), apportano anche composti essenziali quali gli acidi grassi della famiglia omega-6 (l'acido linoleico, LA, ed l'acido arachidonico, ARA) ed acidi grassi della famiglia omega-3 (l'acido linolenico, ALA, l'acido ecosapentaenoico, EPA, e l'acido docosaesaenoico, DHA), oltre che favorire l'assorbimento delle vitamine liposolubili A, D, E, K e dei carotenoidi. Quindi, anche se tutti i tipi di grassi risultano apportare energia in quantità doppia rispetto a carboidrati e proteine (9 cal/g contro 4 cal/g), sul piano della qualità, questi componenti possono essere molto diversi, differenza che può ripercuotersi sullo stato di nutrizione e di salute del consumatore.

In questo senso, i grassi da 'preferire' sono quelli ad elevato tenore in acidi grassi insaturi contenuti soprattutto in oli vegetali (di semi e di oliva), noci, nocciole, olive e nella polpa pesci marini a tenore lipidici un po' "sostenuto".

IV.3 Effetti benefici delle derrate ittiche

Come precedentemente riportato, per conseguire una dieta equilibrata, sarebbe meglio assumere alimenti che siano fonte di acidi grassi insaturi. Tra i prodotti di origine animale, gli alimenti ittici sono quelli che contengono maggiormente questo genere di componenti, tanto che l'assunzione di pesce, fresco o surgelato, è consigliata 2-3 volte a settimana (da "Eating any food sources of omega-3 fats may be beneficial for health", The European Food Information Council, <http://www.eufic.org/page/en/show/latest-science-news/page/LS/fftid/food-sources-omega-3-fats-beneficial-health/>)

Da un punto di vista nutrizionale, infatti, è stato dimostrato che gli alimenti ittici in senso lato (pesci, molluschi e crostacei), catturati in natura come pure derivanti da allevamento, possono essere considerati come una fonte di nutrienti indispensabili (proteine ad alto valore biologico, vitamine, minerali e PUFA n3) e quindi un aiuto nella prevenzione di malattie metaboliche croniche (Panchaud et al., 2006; Dullemeijer et al., 2007; Chong et al., 2008; Harris, 2008; Rudkowska, 2010; Saravanan et al., 2010; Welch et al., 2010; Bousquet et al., 2011; Sampath Kumar et al., 2012;). Di conseguenza, per mantenersi in salute e per prevenire e ridurre il rischio di malattie croniche infiammatorie, come malattie coronariche, diabete, demenza, asma ed infarto, l'utilizzazione di questi alimenti come apporto di PUFA n3 è aumentato rapidamente in tutto il mondo. È stato dimostrato (Watkins e German, 2002), infatti, che, poiché l'organismo umano non possiede enzimi specifici per introdurre doppi legami in posizione 3 o 6 a partire dal gruppo metilico della catena carbonilica, gli acidi grassi

n-3 ed n-6 devono necessariamente essere introdotti con la dieta.

In tal senso, la Comunità Europea, al fine di dare indicazioni utili ai propri cittadini su questo aspetto, ha chiesto all'Autorità preposta (EFSA, European Food Safety Authority) di calcolare il fabbisogno giornaliero della componente lipidica ed in particolare di acidi grassi essenziali (ovvero non sintetizzabili dall'organismo), prendendo in considerazione anche i diversi stati fisiologici (Agostoni et al., 2010b). Calcolando che le raccomandazioni per i diversi tipi di acidi grassi sono espresse in percentuale rispetto all'apporto energetico complessivo della dieta (E%) o come grammi al giorno, è stato stimato che l'apporto lipidico totale giornaliero debba variare dal 20 al 35 E% (intorno al 40 E% per neonati e bambini) e che l'apporto in l'acido linoleico (LA) debba essere non inferiore al 4 E%, quello in l'acido α -linolenico (ALA) non inferiore allo 0,5 E% e quello in acido eicosapentaenoico (EPA) più acido docosaesaenoico (DHA) non inferiore a 250 mg (aumentando di 50-100 mg/giorno se si tratta di bambini o donne in gravidanza).

Premesso questo, risulta ovvio che conoscere il contenuto degli alimenti in acidi grassi risulta importante per poter perseguire una dieta bilanciata. Negli ultimi anni, sono stati intrapresi sforzi analitici diretti alla caratterizzazione della componente lipidica di pesci, molluschi e crostacei quali prelevati in natura o allevati ed alimentati con diverse possibili diete, o, ancora, già "processati", tanto che in letteratura si trova una moltitudine di riferimenti per la maggior parte delle specie d'interesse commerciale (per citarne solo alcuni: Izquierdo et al., 2005; Torstensen et al., 2005; Bell et al., 2010; Lenas et al., 2011; Dernekbaş, 2012; Gül Harlioğlu et al., 2012; Łuczyńska et al., 2012; Satar et al., 2012).

Occorre considerare però che, in ambito domestico, la maggior parte delle matrici ittiche è sottoposta a diversi tipi di cottura (frittura, bollitura, cottura alla piastra, al forno "classico" o al forno a microonde, ecc.), metodiche che, a causa della natura facilmente ossidabile degli acidi grassi a lunga catena, potrebbero far variare la percentuale contenuta nella polpa di componenti essenziali (Gladyshev et al., 2006; Turkkan et al., 2008; Weber et al., 2008; Yagiz et al, 2009).

IV.4 Profilo acidico dell'alimento ittico cotto

Sebbene in Italia si preferisca il prodotto fresco a quello congelato (Esposito, 2000) ed esistano alcuni contesti in cui il pesce viene consumato crudo (come per esempio nelle regioni del Sud Italia), abitualmente l'alimento ittico viene sottoposto a cottura, anche attraverso

modalità differenti di preparazione.

Il principio per cui si sottopone l'alimento a cottura è che, oltre a migliorarne la sicurezza microbiologica, cuocere il pesce aggiunge sapore poiché vengono liberati quei composti volatili che ne esaltano le caratteristiche sensoriali (Morita et al., 2001). Durante la cottura però, si verificano reazioni chimico-fisiche che possono cambiare il valore nutrizionale del prodotto da consumare (Baylan et al., 2011).

Come precedentemente affermato, il pesce è un'ottima fonte di acidi grassi polinsaturi della serie omega-3 e, soprattutto per questo motivo, è tanto consigliato dai nutrizionisti. Purtroppo però, se proprio la presenza di doppi legami nella molecola di tali acidi grassi è utile per le normali funzioni dell'organismo, questa loro caratteristica è anche quella che li rende più vulnerabili all'ossidazione, diminuendone il contenuto nella matrice ittica (Sant'Ana e Mancini-Filho, 2000; Tarley et al., 2004).

Quindi, considerando che i dati concernenti la composizione acidica dei lipidi di specie ittiche sono per lo più riferiti allo stato crudo, trarre conclusioni circa il valore nutritivo delle stesse anche dopo cottura richiederebbe cautela. (Gladyshev et al., 2007). In questo senso, si è resa utile una “doppia” analisi della componente lipidica delle specie ittiche maggiormente consumate, confrontando cioè la componente lipidica presente allo stato crudo con quella emersa dopo cottura.

Per cominciare, occorre fare distinzione sia tra le specie in esame (Gladyshev et al., 2007), sia tra i metodi di cottura a cui le diverse matrici ittiche vengono sottoposte, poiché è stato dimostrato che non sempre gli acidi grassi a lunga catena risentono dell'effetto della cottura (Montano et al., 2001).

Tra i metodi di cottura, quelli dotati di minore “potere alterante” sono la bollitura (ancor meno drastica la cottura al vapore), la cottura al forno e la cottura al microonde. Sottoponendo a bollitura filetti di trota, di sogliola, di aringa, di merluzzo (Gladyshev et al., 2007) è emerso come non si producessero grandi cambiamenti nel profilo acidico andando dai campioni crudi a quelli cotti, se non, ma solo lievemente, nel caso della trota e dell'aringa. Su campioni di salmone (Gladyshev et al., 2006) e di pesce gatto (Weber et al., 2008), invece, questo metodo è risultato pressoché ininfluenza sulla composizione acidica totale e, in particolare, nei confronti degli acidi grassi a lunga catena. Il medesimo discorso vale per la cottura al forno e al microonde. Con questi metodi, si osserva che la composizione acidica dei lipidi di filetti di spigola (Türkkan et al., 2008) varia lievemente, vedendo un decremento nella concentrazione degli acidi grassi più rappresentativi (16:0, 18:1n-9, 18:2n-6, 20:5n-3 e 22:6n-3), così come quella di filetti di pesce gatto (Weber et al., 2008), che vedono aumentare

il contenuto in acidi grassi normalmente non rilevabili (C14:1n-5, C20:0, C22:0 e C22:1n-9), ma i cui livelli comunque rimangono trascurabili.

Un'altra tecnica di cottura comunemente usata è la frittura. Questa è la tecnica che modifica maggiormente il valore nutrizionale della matrice in esame. È stato dimostrato, infatti, che sottoponendo a frittura campioni di sardina (Candela et al., 1998; Garcia-Arias et al., 2003), di sgombro (Candela et al., 1998), di salmone (Candela et al., 1998; Gladyshev et al., 2006) e di pesce gatto (Weber et al., 2008), la quantità di lipidi totali aumenta e cambia il quadro acido. Questo accade perché, a causa dell'evaporazione di un'aliquota di acqua indotta dal calore, l'olio della frittura può penetrare meglio nei tessuti (Saguy e Dana, 2003) e, quindi, il suo assorbimento da parte del campione aumenta la quantità di materia grassa presente. Per quel che riguarda il profilo acido, invece, i cambiamenti non sono omogenei, ma dipendono dal tipo di olio da frittura usato. Per esempio, usare olio di colza o di soia fa aumentare molto il rapporto tra acidi grassi insaturi ed acidi grassi saturi (UFA/SFA), a causa dell'alto contenuto in acidi grassi mono e polinsaturi dei 2 oli. Tuttavia, mentre con l'utilizzo di olio di colza si vedono aumentare i MUFA rispetto ai PUFA, utilizzando l'olio di soia si osserva l'effetto contrario. Nel caso in cui, invece, si utilizzino oli vegetali idrogenati, il rapporto UFA/SFA scende a valori più bassi. Per quel che riguarda gli acidi grassi polinsaturi a lunga catena, quali l'intermedio DPA (acido docosapentaenoico) ed il più importante DHA, invece, le concentrazioni variano in misura più rilevante. Essendo acidi grassi altamente polinsaturi e, di conseguenza, altamente ossidabili, e non essendo presenti in nessun tipo di olio vegetale, la frittura comporta evidentemente la loro ossidazione, e quindi una minore rilevanza, in tutti i campioni in esame (Candela et al., 1998; Gladyshev et al., 2006; Türkkan et al., 2008; Weber et al., 2008).

IV. 5 Ritenzione vera

Da quanto precedentemente esposto, emerge la relativa utilità di conoscere la composizione nutrizionale di un prodotto facilmente alterabile come l'alimento ittico allo stato crudo, soprattutto se lo scopo è quello di fornire informazioni sui livelli nutrizionali di alimenti che in ambito domestico vengono quasi sempre cotti (Murphy et al., 1975; Erdogdu et al., 2004).

Per superare questo limite, molti alimenti ittici sono stati sottoposti ad analisi sia allo stato crudo, sia allo stato cotto (Puwastien et al., 1999; Gokoglu et al., 2004; Musaiger e

D'Souza, 2008), in modo da confrontarne le concentrazioni in nutrienti d'interesse, espresse sul secco, e calcolare il loro rapporto percentuale, ottenendo la cosiddetta “ritenzione apparente”, ovvero quanto nutriente presente in un alimento allo stato crudo rimane nel medesimo alimento dopo cottura, al netto delle variazioni intervenute nella componente “idrica” (Murphy et al., 1975).

Per calcolare la ritenzione apparente si usa la seguente formula:

$$AR (\%) = [N_c (\text{peso secco})] / [N_r (\text{peso secco})] * 100$$

dove,

N_c = il contenuto del nutriente in esame contenuto per grammo di alimento secco allo stato cotto;

N_r = il contenuto del nutriente in esame contenuto per grammo di alimento secco allo stato crudo.

Occorre subito precisare, però, che questo approccio di calcolo fornisce valori di ritenzione approssimativi, nel senso che, venendo il calcolo effettuato sulla sostanza secca, non si tiene conto delle perdite in umidità che l'alimento subisce durante la lavorazione e la cottura, qualsiasi tecnica venga utilizzata (Murphy et al, 1975).

Attribuire la giusta importanza alla perdita in acqua di un alimento durante la sua lavorazione sta alla base del concetto di “ritenzione vera”, introdotto da Murphy (Murphy et al, 1975) intorno alla metà degli anni '70 del secolo scorso ed usato ancora oggi per il rapido ed economico aggiornamento delle esaustive tabelle di composizione degli alimenti che il Dipartimento per l'Agricoltura degli Stati Uniti emana su base annuale (U.S.D.A., 2011), tabelle che a livello internazionale hanno letteralmente “fatto scuola”.

Per definizione, la “ritenzione vera” è, in percentuale, la quantità di nutriente presente in un alimento allo stato cotto in relazione alla quantità dello stesso nutriente che, originariamente, era presente nell'alimento allo stato crudo, tenendo contestualmente conto dei movimenti di acqua che all'interno dell'alimento si sono prodotti. Il calcolo della “ritenzione vera” è quindi espresso dalla seguente formula:

$$TRV (\%) = (N_c * G_c) / (N_r * G_r) * 100$$

dove,

N_c = il contenuto del nutriente in esame per grammo di alimento tal quale allo stato cotto;

G_c = il peso in grammi dell'alimento dopo cottura;

N_r = il contenuto del nutriente in esame per grammo di alimento tal quale allo stato crudo;

G_r = il peso in grammi dell'alimento prima della cottura.

Da sottolineare che il rapporto tra il peso in grammi dell'alimento dopo cottura e il

peso in grammi dell'alimento prima della cottura equivale alle “resa in cottura” (RC), così:

$$RC (\%) = G_C/G_R * 100 \text{ (Matthews e Garrison, 1975).}$$

L'importanza della formula di ritenzione vera sta nel fatto che, una volta calcolati i coefficienti di ritenzione vera per la maggior parte degli alimenti e per i diversi nutrienti di interesse in relazione alle tecniche di cottura più praticate, è possibile, con la formula inversa, stimare la quantità di un dato nutriente nella matrice allo stato cotto, limitandosi a determinare il tenore di quel nutriente nel crudo, una volta nota la resa di cottura. Più in chiaro:

$$N_C = [TRV * N_R] / [RC * 100]$$

Questo, da un punto di vista pratico, risulta essere molto utile perché permette di dimezzare il carico delle analisi in ambito di ricerca, con un'imponente risparmio di tempo e denaro. Per di più, la formula può essere utilizzata anche in ambito “casalingo”, se si considera che, oggi, il consumatore tramite internet può ottenere in tempo reale tutti i dati che gli servono per calcolare la ritenzione ed essere così consapevole delle quantità di nutrienti che effettivamente assume. Così può contenersi il consumatore medio statunitense, semplicemente applicando i coefficienti di ritenzione vera di cui dispone (U.S.D.A., 2007) agli alimenti che giornalmente sottopone a cottura e consuma, potendo avere una stima molto più accurata che per il pregresso del valore nutritivo di ciò che ingerisce.

Occorre ricordare, però, che ogni fattore di ritenzione è strettamente legato alla matrice in esame, al nutriente da indagare ed alla tecnica di cottura applicata al campione. Questo fatto comporta che, in ambito di laboratorio come in ambito casalingo, per stimare la quantità di un dato nutriente allo stato cotto ci si debba sincerare che il metodo di cottura sia lo stesso utilizzato per calcolare il coefficiente che si intende applicare.

IV.6 Scopo della ricerca

Negli ultimi anni, il consumo di derrate ittiche è aumentato notevolmente, sia per il loro sapore tipico e delicato, sia per l'importanza nutrizionale che questo genere di alimenti possiede e ciò risulta essere tanto più vero in Italia, dove pesci, molluschi e crostacei fanno parte della dieta abituale della popolazione (ISMEA, 2011).

Tra gli alimenti ittici più consumati, molluschi e crostacei ricoprono sicuramente un ruolo di rilievo, sia per il loro indubbio valore nutritivo [sono, infatti, pur nel contesto di un modesto tenore lipidico, un'ottima fonte di acidi grassi polinsaturi (Yanar e Celik, 2005), proteine e minerali (Yanar e Celik, 2006)], sia per il loro sapore e per l'assenza di lisce,

aspetti questi che li rendono molto apprezzati agli occhi dei consumatori (Fazzi, 2002; AA.VV., 2003). Per quanto vengano consumati crudi più facilmente e frequentemente dei pesci ossei, è solo dopo cottura, però, che il sapore di molluschi e crostacei diventa più intenso e ne rende ancora più gradevole il consumo (Erdogdu et al., 2004). Questo aspetto, quindi, richiama quanto esposto precedentemente sulle variazioni che un alimento alterabile quale quello ittico può subire durante la cottura e risulta, tra l'altro, tanto più importante per una matrice ipolipidica come quella derivante da crostacei e molluschi.

Detto ciò, con lo scopo di verificare pre e post cottura la composizione in acidi grassi dei lipidi totali di tre specie ittiche molto apprezzate e frequentemente consumate in Italia, ovvero la mazzancolla (*Peneaus kerathurus*), la canocchia (*Squilla mantis*) e la seppia (*Sepia officinalis*), è stato allestito il progetto di ricerca i cui esiti verranno discussi a seguire.

I presupposti alla base di questa indagine sono molteplici. Per prima cosa, per quanto a causa dell'elevato contenuto in colesterolo (Mathew et al., 1999), l'assunzione di crostacei (e, in minor misura, di molluschi) sia dibattuta nel caso di diete a ridotto tenore in colesterolo (Sampaio et al., 2006) e le specie in esame non siano “famose” per la loro ricchezza in lipidi (Passi et al., 2002; Ozogul et al., 2008), è innegabile come il loro consumo sia particolarmente apprezzato in Italia e quindi risulti più che opportuno indagare in merito. Inoltre, poiché mazzancolla, canocchia e seppia sono specie autoctone del Mar Adriatico, con questo lavoro si è voluto delineare il profilo lipidico di una matrice tipica della zona e disponibile in diverse stagioni (indagate, in particolare, autunno, inverno e primavera), con rese in parte edule da verificare in funzione della stagione di cattura.

Si è quindi voluto pervenire a stimare l'entità dei coefficienti di ritenzione vera per gli acidi grassi più rappresentativi in modo da potersene dotare in vista delle esigenze di allestimento di tabelle nutrizionali specifiche per le tre specie. Per inciso, è chiaro che la sola valutazione del profilo acidico è ben lontana dall'esaurire la “conoscenza” delle specie in esame. Tuttavia, l'intento che sta alla base della determinazione dei coefficienti di ritenzione vera è quello di esemplificare un approccio di ricerca per specie poco note che possa essere applicato alla ricerca di tutti i nutrienti presenti (proteine, minerali, vitamine, ecc.), in modo da poter così avere un profilo nutrizionale completo e coefficienti di ritenzione utilizzabili anche in ambito domestico. Sempre con il medesimo intento, quindi, fra le tante possibili tecniche di cottura se ne sono scelte tre (la cottura al vapore, il *pan frying* e la cottura in pentola a pressione) che fossero quanto più simili possibile a quelle più spesso impiegate dal consumatore medio.

E' da sottolineare il fatto che ci si è mossi in un ambito conoscitivo non del tutto

“dissodato”: la letteratura riguardante il profilo acidico delle tre specie di nostro interesse allo stato crudo è scarsa ed ancora più scarsa è la letteratura riguardante il profilo acidico degli stesse specie dopo cottura. Di quanto sopra asserito è controprova la esiguità numerica delle voci bibliografiche componenti i database (uno per i crostacei, l’altro per la seppia) allestiti per aiutarsi nel commento ai dati. E’ stato comunque piuttosto arduo, quando comunque è stato possibile, trovare lavori relativi alle specie di nostro interesse. Queste difficoltà sono da attribuirsi a varie cause. Anzitutto, le specie in esame sono autoctone dell'area mediterranea e pertanto non indagate fuori da questa area. La canocchia, in particolare, è quella che maggiormente risente di un 'vuoto' di letteratura; al di fuori del bacino del Mediterraneo, di fatto, si reperiscono generi consimili (*Oratosquilla* spp), generalmente usati nei Paesi asiatici come base per mangimi destinati ad animali terricoli (Ravinder Reddy et al., 1997; Ojewola et al., 2005). Per questo, come vedremo in seguito, i database cui si farà riferimento per conforto, soprattutto per i dati di mazzancolla e canocchia, sono stati per buona parte costruiti su specie, a volte generi, analoghi (entro le famiglie *Peneidae* per la mazzancolla, *Squillidae* per la canocchia). Infine, per quanto esistano in letteratura dati sui coefficienti di ritenzione per numerosi acidi grassi di alcune specie di pesce (Pirini et al., 2010), per le matrici di nostro interesse i dati di ritenzione sono praticamente assenti.

IV.7 Materiali e Metodi

IV.7.1 Campionamento e lavorazione

Numerosi esemplari di mazzancolla (*Penaeus kerathurus*), canocchia (*Squilla mantis*) e seppia (*Sepia officinalis*), catturati nel mare Adriatico al largo delle coste romagnole, sono stati acquistati al mercato ittico di Cesenatico (FC) in tre stagioni (autunno, inverno e primavera). I lotti (i.e. gruppo di esemplari omogenei per data di acquisto) di ciascuna specie (vedi **Tabella IV.1**) sono stati processati seguendo le modalità riportate di seguito.

IV.7.1.i Mazzancolla (*Penaeus kerathurus*) (Crostaceo Decapode)

Ogni lotto di mazzancolla era costituito da 30 esemplari. Ogni mazzancolla è stata pesata e misurata per poi essere privata di testa, carapace ed appendici fino all'ottenimento della sola polpa. A questo punto si separava la polpa secondo il piano sagittale, ottenendo così due “emicrostacei”. A fine lavorazione, per ogni lotto, si pesava il pool totale di esemplari per

poi dividere gli emicrostacei, destinandone una parte a costituire la matrice per le analisi del crudo e l'altra parte a costituire la matrice da cuocere e quindi avviare alle analisi del cotto.

Per ottenere la matrice cotta, gli emicrostacei adibiti allo scopo venivano sottoposti a cottura al vapore (calore umido) per circa 5 minuti. Né sale, né ulteriori ingredienti erano aggiunti. La temperatura di tre emicrostacei per pool è stata rilevata prima e dopo cottura, utilizzando una termocoppia (tipo J) connessa ad un potenziometro digitale (Termometro tipo J/K mod. 421502, Extech Instruments Corp., Waltham, MA, USA).

A fine cottura, dopo aver pesato il pool di emicrostacei cotti, si è determinata la resa di cottura (RC%) come rapporto percentuale tra il peso degli emicrostacei cotti (CkPK) e il peso dei corrispettivi emicrostacei crudi (RwPK), ovvero:

$$RC (\%) = (CkPK / RwPK) * 100$$

I pool crudo e cotto così ottenuti sono stati tagliati in piccoli pezzi, omogenati con l'aiuto di un *food processor* (MultiquickSystem ZK 100, Braun, Kronberg im Taunus, Germania) per poi essere insacchettati e stoccati a -20°C prima delle analisi lipidiche.

In **Tabella IV.1** sono riportati i dati morfometrici e le rese in parte edule forniti dai lotti di mazzancolle presi in esame.

IV.7.1.ii Canocchia (*Squilla mantis*) (Crosteaceo Stomatopode)

Ogni lotto era costituito da 20 esemplari. Ogni canocchia veniva pesata e misurata per poi essere privata di testa, carapace ed appendici fino all'ottenimento della sola polpa. Come per la mazzancolla, la polpa ottenuta da ogni crosteaceo veniva separata secondo il piano sagittale, ottenendo così due “emicrostacei” che venivano separati l'uno dall'altro in modo da costituire, da una parte, la matrice per le analisi del crudo e, dall'altra, la matrice da cuocere e avviare alle analisi del cotto.

Una volta concluse le operazioni sopra descritte, i 2 pool venivano pesati.

Per ottenere la matrice cotta, gli esemplari adibiti allo scopo sono stati saltati, senza sale né condimenti di sorta, in padella antiaderente preriscaldata a 170-175°C e cotti per un tempo di circa 4 minuti [in termini tecnici, sono stati sottoposti a *pan frying* sperimentale (calore secco)]. Prima della cottura e immediatamente dopo di essa, la temperatura veniva verificata su tre emicrostacei per lotto attraverso l'uso di una termocoppia (tipo J) connessa ad un potenziometro digitale (Termometro tipo J/K mod. 421502, Extech Instruments Corp., Waltham, MA, USA). A cottura ultimata, inoltre, veniva registrato il peso del pool di

emicrostacei cotti, in modo da poter calcolare la resa di cottura (RC%), come rapporto percentuale tra il peso degli emicrostacei cotti (CkSM) e il peso degli emicrostacei crudi (RwSM), ovvero:

$$RC (\%) = (CkSM / RwSM) * 100$$

I pool crudo e cotto così ottenuti sono stati tagliati in piccoli pezzi, omogenati mediante un *food processor* (MultiquickSystem ZK 100, Braun, Kronberg im Taunus, Germania) per poi essere insacchettati e stoccati a -20°C prima delle analisi lipidiche.

In **Tabella IV.1** sono riportati i dati morfometrici e le rese in parte edule forniti dai lotti di canocchie presi in esame.

IV.7.1.iii Seppia (*Sepia officinalis*) (Mollusco Cefalopode)

Ogni lotto era costituito da un numero di esemplari variabile da 7 a 15. All'interno del lotto, ogni seppia veniva pesata e misurata per poi essere privata di testa ed appendici, eviscerata e privata dell'osso fino all'ottenimento della sola parte muscolare del mantello e dei tentacoli.

Dopo aver pesato la totalità dei molluschi puliti entro lotto, ognuno di essi veniva tagliato in due metà sempre secondo il piano sagittale, quindi in “strisce” regolari, generando così due sottogruppi di campioni, il primo dei quali rappresentava la matrice per le analisi del crudo, il secondo la matrice da cuocere ed avviare alle analisi del cotto.

La tecnica di cottura messa in atto per la seppia era la cottura in pentola a pressione (calore umido) in assenza di sale o condimenti di sorta, protratta per 30 minuti dal momento del raggiungimento della voluta pressione all'interno del recipiente di cottura. Prima e dopo la cottura, su tre strisce di mantello si provvedeva a misurare la temperatura mediante una termocoppia (tipo J) connessa ad un potenziometro digitale (Termometro tipo J/K mod. 421502, Extech Instruments Corp., Waltham, MA, USA).

A cottura ultimata, veniva registrato il peso del pool di emiseppie cotte. La resa di cottura (RC %) veniva computata entro lotto come rapporto percentuale tra il peso degli emiseppie cotte (CkSO) e quello delle emiseppie crude (RwSO), ovvero:

$$RC (\%) = (CkSO / RwSO) * 100$$

I pool crudo e cotto così ottenuti sono stati tagliati in piccoli pezzi, omogenati con l'aiuto di un *food processor* (MultiquickSystem ZK 100, Braun, Kronberg im Taunus, Germania) per poi essere insacchettati e stoccati a -20°C prima delle analisi lipidiche.

In **Tabella IV.1** sono riportati i dati morfometrici e le rese in parte edule forniti dai lotti di seppie presi in esame.

Tabella IV.1

Specie prese in esame, stagione di cattura, struttura del campione e suoi parametri morfometrici (media \pm dev.st.)

Parametro ^A	Stagione di cattura	Nome scientifico		
		<i>Penaeus kerathurus</i> (PK)	<i>Squilla mantis</i> (SM)	<i>Sepia officinalis</i> (SO)
No. esemplari (lotti)	Autunno	150 (5)	80 (4)	45 (4)
	Inverno	120 (4)	80 (4)	40 (4)
	Primavera	60 (2)	80 (4)	28 (4)
Peso (g)	Autunno	28.0 \pm 7.5	57.4 \pm 8.4 a	105 \pm 71.5 b
	Inverno	34.5 \pm 4.6	33.5 \pm 0.8 c	136 \pm 6.5 b
	Primavera	35.7 \pm 0.3	45.2 \pm 4.7 b	317 \pm 29.7 a
Lunghezza (cm)	Autunno	15.5 \pm 1.5	16.8 \pm 0.9 a	9.0 \pm 2.5 c
	Inverno	17.2 \pm 0.7	14.2 \pm 0.2 c	10.5 \pm 0.3 b
	Primavera	17.6 \pm 0.02	15.7 \pm 0.5 b	14.5 \pm 0.2 a
Resa in parte edule (%)	Autunno	47.42 \pm 1.53	32.42 \pm 1.57 b	65.48 \pm 2.60 a
	Inverno	45.54 \pm 1.79	35.32 \pm 1.77 a	61.15 \pm 0.99 b
	Primavera	46.44 \pm 0.64	34.59 \pm 0.81 ab	52.01 \pm 2.38 c

^A Entro specie e parametro, medie seguite da lettere diverse differiscono significativamente (P 0.05).

IV.7.2 Analisi lipidiche

IV.7.2.i Estrazione dei lipidi totali

L'estrazione dei lipidi totali (LT) è stata eseguita in duplicato per tutti i lotti, seguendo il metodo di Bligh e Dyer (1959), come di seguito descritto. Ogni campione, composto da 4 g di omogenato ricavato dalla polpa di tutti gli esemplari del lotto, è stato posto in un provettone immerso nel ghiaccio, ed è stato nuovamente omogeneizzato due volte di seguito con Ultra-Turrax T25 per un minuto: la prima volta con 6 ml di cloroformio e 12 ml di metanolo, la seconda con altri 6 ml di cloroformio e 6 ml di acqua deionizzata. Dopo una centrifugazione a 4000 rpm a 4°C per 10 minuti, la fase superiore acquosa e la fase intermedia solida sono state eliminate, mentre la fase inferiore cloroformica contenente i LT estratti è stata filtrata attraverso sodio solfato anidro. Trasferito 1 ml esatto dell'estratto lipidico in un pesafiltro accuratamente tarato, fatto evaporare completamente il solvente su una piastra riscaldante a 50°C e pesato il residuo lipidico, la percentuale di LT è stata così calcolata:

$$\% \text{ LT} = (\text{g di lipidi in 1 ml} \times 12 / \text{g di campione}) \times 100$$

dove il numero 12 si riferisce ai ml di cloroformio complessivamente usati per l'estrazione.

IV.7.2.ii Preparazione dei metilesteri degli acidi grassi

I metilesteri degli acidi grassi dei LT sono stati preparati tramite transesterificazione con catalizzatore acido (Christie, 1989). I campioni sono stati portati a secco con flusso d'azoto entro provette di vetro con tappo a vite, diluiti con 100 μ l di toluene e 1 ml di una soluzione metilante composta da metanolo con l'1% di acido solforico 96% e posti in stufa a 50°C per 12 ore. Successivamente i metilesteri prodotti sono stati recuperati mediante l'aggiunta di 1 ml di una soluzione di NaCl al 5% e di 900 μ l di esano, seguita da agitazione con vortex, centrifugazione per 10 minuti a 2000 rpm e infine raccolta della fase superiore contenente i metilesteri.

IV.7.2.iii Analisi gascromatografica degli acidi grassi

I metilesteri degli acidi grassi sono stati analizzati quali-quantitativamente con un gascromatografo Varian 3380, dotato di un autocampionatore CP-8200 Varian, di un sistema d'iniezione split mantenuto a 230 °C, di un rivelatore a ionizzazione di fiamma a 300 °C e di una colonna capillare DB-23 J&W Scientific (30 m x 0.32 mm). La temperatura del forno è stata programmata da 150 a 230 °C con un incremento di 5 °C/min e isoterma finale. Come gas vettore è stato utilizzato azoto ad alta purezza, con un flusso di 1.2 ml/min. I dati ottenuti sono stati elaborati con Star Chromatography Workstation Varian.

Gli acidi grassi sono stati identificati confrontando il loro tempo di ritenzione con quello di una miscela di standard noti (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA; PUFA n° 1, di origine marina, e PUFA n° 3, Menhaden Oil, Supelco, Inc, Bellefonte, PA, USA).

Il contenuto degli acidi grassi è stato riportato come percentuale dei singoli metilesteri rispetto alla loro totalità (%FAME).

Con i dati ottenuti dall'analisi degli acidi grassi sono stati calcolati anche i seguenti indici:

ΣSFA : valore percentuale relativo alla somma degli acidi grassi saturi;

$\Sigma MUFA$: valore percentuale relativo alla somma degli acidi grassi monoinsaturi;

$\Sigma PUFA$: valore percentuale relativo alla somma degli acidi grassi polinsaturi;

$\Sigma PUFA / \Sigma SFA$: rapporto fra la somma degli acidi grassi polinsaturi e saturi;

$\Sigma PUFA n-3$: valore percentuale relativo alla somma dei PUFA n-3;

$\Sigma PUFA n-6$: valore percentuale relativo alla somma dei PUFA n-6;

$\Sigma n-3 / \Sigma n-6$: rapporto fra la somma dei PUFA n-3 e n-6;

$\Sigma n-6 / \Sigma n-3$: rapporto fra la somma dei PUFA n-6 e n-3;

EPA / DHA: rapporto fra gli acidi grassi C 20:5 n-3 (EPA) e C 22:6 n-3 (DHA);

EPA / AA: rapporto fra gli acidi grassi C 20:5 n-3 (EPA) e C 20:4 n-6 (AA).

Per ciascuna specie la quantificazione degli acidi grassi è stata effettuata trasformando ciascuna area percentuale in g/100 g di parte edule mediante il fattore di conversione proposto da Weihrauch et al. (1977) e tuttora utilizzato dallo United States Department of Agriculture per preparare ed aggiornare le sue tabelle di composizione degli alimenti (U.S.D.A., 2011).

Sempre per ciascuna specie, a sua volta cotta secondo una sua propria tecnica, il tenore in lipidi e nei singoli acidi grassi, combinati con le rese di cottura sono stati utilizzati per il computo dei pertinenti coefficienti di ritenzione vera, usando la formula riportata e ampiamente discussa nel paragrafo IV.5.

IV.7.3 Qualità del dato analitico

Le analisi sono state effettuate in duplicato, facendo ricorso a reagenti di grado analitico. La qualità dei risultati analitici è stata controllata analizzando un materiale standard di riferimento (SRM), nel quale la concentrazione dei nutrienti di interesse era definita come *certificata* oppure come *di riferimento*. Lo standard per composizione centesimale ed acidi grassi principali era rappresentato da “SRM 1946 – Lake Superior Fish Tissue” (NIST, National Institute of Standards & Technology, Gaithersburg, MD, USA). Per ciascun nutriente sono state effettuate determinazioni in doppio per tre volte durante la prova, seguendo le procedure analitiche usate in questo lavoro. L’esito delle analisi effettuate a carico dello SRM sopra menzionato è stato tabulato nella pagina successiva (**Tabella IV.2**).

Tabella IV.2

Concentrazione certificata (o di riferimento) in nutrienti dello Standard Reference Material (SRM) noto come Lake Superior Fish Tissue (NIST 1946) e livelli di presenza di quegli stessi nutrienti accertati in questo studio (dati espressi sul tal quale, n = 3, analisi effettuate in doppio, media \pm 95 % intervallo di confidenza, CI).

Nutriente	Unità di misura	Valore certificato o (di riferimento)	Questo studio
Sostanza secca	g/100 g (sul tal quale)	(28,6 \pm 0,1)	28,63 \pm 0,08
Protidi grezzi	“	(17,8 \pm 0,2)	17,91 \pm 0,50
Lipidi	“	10,17 \pm 0,48	10,41 \pm 0,25
Ceneri	“	(1,10 \pm 0,04)	1,12 \pm 0,14
C14:0	% (come trigliceridi)	0,316 \pm 0,009	0,217 \pm 0,023
C15:0	“	(0,0285 \pm 0,0016)	0,0259 \pm 0,023
C16:0	“	1,22 \pm 0,04	1,20 \pm 0,081
C16:1	“	0,816 \pm 0,026	0,717 \pm 0,054
C18:0	“	0,263 \pm 0,011	0,265 \pm 0,021
C18:1 n-9	“	2,64 \pm 0,08	2,67 \pm 0,188
C18:1 n-7	“	(0,373 \pm 0,005)	0,376 \pm 0,026
C18:2 n-6	“	0,348 \pm 0,023	0,367 \pm 0,024
C18:3 n-3	“	0,221 \pm 0,025	0,217 \pm 0,015
C18:4 n-3	“	(0,106 \pm 0,013)	0,094 \pm 0,007
C20:1 n-9	“	0,132 \pm 0,012	0,138 \pm 0,012
C20:2 n-6	“	0,0990 \pm 0,0043	0,111 \pm 0,011
C20:4 n-6	“	(0,212 \pm 0,019)	0,224 \pm 0,016
C20:5 n-3 (EPA)	“	0,296 \pm 0,019	0,327 \pm 0,026
C22:1 n-9	“	(0,0266 \pm 0,0060)	0,0188 \pm 0,002
C22:2 n-6	“	(0,0369 \pm 0,0011)	0,0337 \pm 0,0035
C22:5 n-3 (DPA)	“	0,335 \pm 0,026	0,336 \pm 0,028
C22:6 n-3 (DHA)	“	0,92 \pm 0,10	0,99 \pm 0,10

IV. 7.4 Analisi statistiche

Entro specie, e per ciascun parametro morfometrico come pure ciascun parametro connesso alla conduzione delle cotture, si è fatto ricorso alla analisi di varianza ad una via (ANOVA) per verificare l'esistenza di differenze significative legate alla stagione di cattura.

I dati compositivi espressi in % (tenore lipidico e composizione in acidi grassi, espressa come % FAME totali) sono stati convertiti in arcsen ed analizzati facendo ricorso ad una ANOVA a due vie “between group-within subjects”. Il fattore “between group” era la stagione di cattura (Sc), mentre il fattore “within subjects” era lo stato (St, crudo o cotto). Si è fatto ricorso ad un disegno fattoriale completo anche di interazione (Sc*St). Un disegno analogo è stato adottato anche per la composizione acidica quantitativa (lipidi ed acidi grassi espressi in mg per 100 gr di polpa) con la specie (Sp) come fattore “between” e lo stato (St)

come fattore “within”, per la quale analisi i dati non sono stati trasformati.

I dati di ritenzione, per finire, sono stati sottoposti ad ANOVA ad una via, dove il fattore in gioco era la specie. Le medie sono state separate al 5% di livello di probabilità facendo ricorso al test *post hoc* HDS di Tukey. Tutte le elaborazioni sono state effettuate mediante il pacchetto statistico denominato “Statistica”® (Release 7, 2005, Statsoft Inc., Tuba, OK, USA).

IV.8 RISULTATI E DISCUSSIONE

IV.8.1 Morfometria e resa in parte edule

In **Tabella IV.1** è riportata la caratterizzazione morfometrica, come pure la resa in parte edule, dei lotti di esemplari lavorati per le tre specie.

IV.8.2.i Mazzancolla (*Penaeus kerathurus*)

Gli esemplari presi in esame nelle tre stagioni non hanno manifestato differenze dimensionali, né di peso, per quanto le medie aumentino leggermente dall'autunno alla primavera. Considerando che in natura i crostacei del genere *Penaeus* migrano dal mare aperto alle coste e viceversa in base al loro ciclo vitale (Rothlisberg et al., 1995; Pérez-Castaneda e Defeo, 2001), quanto osservato potrebbe essere legato semplicemente al numero di lotti analizzati (la metà in primavera rispetto alle altre stagioni), ovvero all'impossibilità di reperire un numero di campioni tale da far emergere eventuali differenze significative fra i lotti.

Anche per quel che riguarda la resa in parte edule non si nota un'influenza stagionale. Questo aspetto può essere legato al fatto che le parti che di questo crostaceo normalmente vengono scartate (testa, zampe e carapace) crescono parallelamente al muscolo, senza incidere in modo preponderante sul peso finale.

Tabella IV.1Specie prese in esame, stagione di cattura, struttura del campione e suoi parametri morfometrici (media \pm dev.st.)

Parametro ^A	Stagione di cattura	Nome scientifico		
		<i>Penaeus kerathurus</i> (PK)	<i>Squilla mantis</i> (SM)	<i>Sepia officinalis</i> (SO)
No. esemplari (lotti)	Autunno	150 (5)	80 (4)	45 (4)
	Inverno	120 (4)	80 (4)	40 (4)
	Primavera	60 (2)	80 (4)	28 (4)
Peso (g)	Autunno	28.0 \pm 7.5	57.4 \pm 8.4 a	105 \pm 71.5 b
	Inverno	34.5 \pm 4.6	33.5 \pm 0.8 c	136 \pm 6.5 b
	Primavera	35.7 \pm 0.3	45.2 \pm 4.7 b	317 \pm 29.7 a
Lunghezza (cm)	Autunno	15.5 \pm 1.5	16.8 \pm 0.9 a	9.0 \pm 2.5 c
	Inverno	17.2 \pm 0.7	14.2 \pm 0.2 c	10.5 \pm 0.3 b
	Primavera	17.6 \pm 0.02	15.7 \pm 0.5 b	14.5 \pm 0.2 a
Resa in parte edule (%)	Autunno	47.42 \pm 1.53	32.42 \pm 1.57 b	65.48 \pm 2.60 a
	Inverno	45.54 \pm 1.79	35.32 \pm 1.77 a	61.15 \pm 0.99 b
	Primavera	46.44 \pm 0.64	34.59 \pm 0.81 ab	52.01 \pm 2.38 c

^AEntro specie e parametro, medie seguite da lettere diverse differiscono significativamente ($P \leq 0.05$).**IV.8.2.ii Canocchia (*Squilla mantis*)**

Le differenze significative su base stagionale che si riscontrano per questa specie in pesi e lunghezze non sono inaspettate. Come si può vedere, i valori più bassi di peso e lunghezza si hanno in inverno, mentre i valori più alti si riscontrano in autunno. Se si considera il ciclo biologico di questo crostaceo, emerge che esso depone le uova poco prima dell'inverno (massima taglia) e quindi i nuovi nati iniziano il proprio accrescimento durante la stagione fredda fino ad arrivare all'autunno, periodo in cui avverrà una nuova deposizione (De Ranieri e Mori, 1991; Maynouet al., 2004).

Per quel che riguarda la resa in parte edule, invece, la tendenza è inversa. La resa maggiore si ha in inverno con esemplari più piccoli, mentre in autunno, con esemplari più grandi, la resa è minore. Questa differenza potrebbe essere spiegata in base al ciclo riproduttivo del crostaceo. Durante la stagione riproduttiva, infatti, gonadi e uova potrebbero incidere molto di più sul peso finale del crostaceo, il che spiegherebbe perché la parte edule risulti inferiore nei mesi più caldi.

IV.8.2.iii Seppia (*Sepia officinalis*)

Per quel che riguarda la seppia, dalla stagione autunnale a quella primaverile la mole media degli esemplari campionati è venuta aumentando. Sia per il peso, sia per la lunghezza emergeva esiste una differenza statisticamente significativa ($P \leq 0,05$) tra i lotti degli esemplari

esaminati. Questa differenza è spiegabile attraverso la valutazione del ciclo del mollusco che, in natura, depone ad inizio estate, schiude in 2-3 mesi dopo i quali ha una crescita esponenziale, fino alla maturità sessuale che avviene intorno ai 3-6 mesi (Forsythe et al., 1994). Inoltre, è da considerare l'influenza della temperatura dell'acqua. Sebbene la seppia riesca a vivere bene anche a temperature non ottimali, è stato dimostrato che la maturazione del mollusco richiede più tempo nelle acque fredde rispetto a quelle calde (Önsoy e Salman, 2005) e questo spiega i valori tendenzialmente più alti di peso e lunghezza nella stagione primaverile (Forsythe et al., 1994).

Per quel che riguarda la resa in parte edule, il discorso è diverso. Per questa specie taglie raggiunte e rese fornite risultano inversamente proporzionali poiché si registra la più alta percentuale di resa in parte edule nei soggetti di mole più piccola. Evidentemente, all'incrementare della mole dell'animale cresce l'incidenza percentuale delle parti non eduli (per es.: osso, visceri, gonadi)

IV.8.2 Rese di cottura

In **Tabella IV.3** sono esplicitate le tecniche di cottura applicate a ciascuna specie e le rese di cottura ottenute.

Entro specie (a sua volta “annidata” entro una specifica tecnica di cottura), differenze significative fra le medie di stagione emergevano per l'*heating rate*, sistematicamente più elevato in primavera che non in autunno, con le medie invernali in posizione intermedia, evento che si ritiene in parte riconducibile alle condizioni termiche del locale di lavorazione, purtroppo solo parzialmente standardizzabili.

Entro specie, le rese di cottura non sembravano risentire della variazione dimensionale osservata procedendo dall'autunno alla primavera. Dalla comparazione fra le specie, e dunque fra le tecniche di cottura, emergeva la superiorità delle rese per la mazzancolla cotta al vapore, rispetto alla canocchia sottoposta al *pan frying*, rispetto, ancora, alla seppia sottoposta a cottura in pentola a pressione.

Tabella IV.3

Tecniche di cottura adottate, incremento termico specifico indotto per unità di tempo (*Heating rate*, °C/min) e rese di cottura (%) delle specie prese in esame (media ± dev.std.)

Parametro ^A	Stagione di cattura	Nome scientifico		
		<i>Penaeus kerathurus</i> (PK)	<i>Squilla mantis</i> (SM)	<i>Sepia officinalis</i> (SO)
Tecnica di cottura	Autunno Inverno Primavera	Cottura al vapore (calore umido)	<i>Pan frying</i> (calore secco)	Cottura in pentola a pressione (calore umido)
<i>Heating rate</i> (°C/min)	Autunno	13.0 ± 1.9 b	15.1 ± 2.3 b	2.52 ± 0.11 b
	Inverno	14.3 ± 0.6 ab	16.8 ± 2.0 ab	2.92 ± 0.21 ab
	Primavera	17.1 ± 0.8 a	19.3 ± 0.7 a	3.28 ± 0.25 a
Resa di cottura (%)	Autunno	79.10 ± 10.34	57.97 ± 3.71	54.08 ± 4.63
	Inverno	72.64 ± 2.77	60.01 ± 1.09	53.43 ± 7.43
	Primavera	69.90 ± 2.22	61.41 ± 6.65	58.35 ± 1.70

^A Entro specie e parametro, medie seguite da lettere diverse differiscono significativamente ($P \leq 0.05$).

IV.8.3 Profilo acido delle specie in esame

IV.8.3.i Mazzancolla (*Penaeus kerathurus*)

In **Tabella IV.4** sono riportati i valori relativi alla mazzancolla.

Per quanto concerne i **lipidi totali** allo stato crudo, i nostri esemplari, con il range 1,37÷1,45 g/100 g, si collocavano completamente entro l'intervallo dei dati di letteratura (**DB_Crostacei**). Non sembra esserci, inoltre, un'effetto stagione significativo. Allo stato cotto, invece, emergevano differenze statisticamente significative in base alla stagione. In inverno, infatti, si registravano i valori siano più alti. Quanto allo stato di presentazione (crudo o cotto), differenze significative emergevano in autunno ed in inverno, quando i lipidi totali allo stato cotto risultavano essere presenti in quantità maggiore.

Per quel che riguarda la **composizione acidica**, sia la stagione di campionamento, sia lo stato di presentazione risultavano esercitare una influenza significativa.

Considerando la matrice allo stato crudo e andando ad analizzare la somma degli acidi grassi saturi (Σ SFA), si osserva come in autunno si registrasse il valore più alto, in inverno il più basso, con il valore primaverile in posizione intermedia. Questi dati si collocano entro il range di valori di letteratura per crostacei "consimili" (vedi DB_Crostacei), risultando, inoltre, dello stesso ordine di grandezza rispetto ai valori pubblicati per *Penaeus kerathurus* (Zlatanov et al., 2009; Tsape et al., 2010). Con la cottura al vapore, la concentrazione in SFA della

mazzancolla aumentava significativamente in inverno e in primavera, mentre non emergevano differenze significative fra stagioni di cattura.

Quanto ai singoli SFA, si registra come quelli più importanti fossero l'acido stearico (C18:0), seguito dal palmitico (C16:0) e come, in generale, i risultati ottenuti fossero collocati entro i range di letteratura per questo gruppo di acidi grassi. Allo stato crudo l'effetto stagione non si manifestava. Con la cottura, il tenore nei singoli SFA aumentava significativamente, con la sola rimarchevole eccezione del C18:0. Allo stato cotto, solo il C15:0 (acido pentadecanoico) e il C16:0 risentivano dell'effetto stagione, i valori più elevati producendosi in primavera.

Consideriamo ora la somma degli acidi grassi monoinsaturi (Σ MUFA): il range di valori che emergeva allo stato crudo rientrava appieno nel range di valori reperiti in letteratura per crostacei consimili, per quanto fosse leggermente inferiore ai valori riportati da Zlatanov et al. (2009) e Tsape et al. (2010) per la specie di nostro specifico interesse. La cottura al vapore induceva un incremento nel livello complessivo di presenza dei MUFA e portava al manifestarsi di un effetto stagione, con valori invernali e primaverili non significativamente differenti l'uno dall'altro, ma superiori rispetto all'incidenza percentuale autunnale. Se ci si sofferma sui singoli MUFA, è subito evidente come solo quelli più rappresentati, vale a dire l'acido oleico (18:1n-9), il palmitoleico (16:1n-7) e il vaccenico (18:1n-7), risentissero della cottura, incrementando sempre di concentrazione, e, limitatamente al primo e al terzo, subendo anche un effetto stagione allo stato cotto. E' appena il caso di rilevare come il comportamento di questi acidi grassi decidesse di quello della loro somma, più sopra descritto.

Passiamo ora ad analizzare la somma degli acidi grassi polinsaturi (Σ PUFA). Allo stato crudo, il range coperto dai nostri dati si collocava non lontano dal margine superiore di quello desumibile dalla letteratura: la mazzancolla campionata in Adriatico arrivava ad avere, un'incidenza dei PUFA pari al 44% degli esteri metilici degli acidi grassi. Diversamente da quanto osservato per i MUFA, la cottura al vapore della mazzancolla induceva un sensibile calo nel livello di presenza dei PUFA, che andava da poco meno di 5 punti percentuali in autunno a quasi 10 punti percentuali in primavera, evidentemente compensati da variazioni di "segno" opposto in SFA e MUFA. In altre parole, mentre verso questi ultimi gruppi di acidi grassi la cottura manifestava un effetto 'concentrazione', nei confronti dei PUFA induceva perdite di non lieve entità. La cosa non deve stupire: i PUFA sono molecole altamente ossidabili e la cottura ne causa la perdita (Sant'Ana e Mancini-Filho, 2000; Tarley et al., 2004).

Il fenomeno in ogni caso appariva toccare molto più i PUFA della serie omega 3 che non quelli della serie omega 6. Quando poi si vanno ad analizzare i singoli acidi grassi, si nota come quelli più vistosamente influenzati dall'effetto cottura fossero per l'appunto l'EPA (C20:5n-3), il DPA (C22:5n-3) ed il DHA (C22:6n-3). L'unico acido grasso per il quale la cottura sembrava indurre un effetto di concentrazione era l'acido linoleico (C18:2n-6, LA), che, almeno in autunno e in inverno, si mostrava presente con valori più alti nella matrice allo stato cotto che non in quella allo stato crudo. Per l'appunto nell'ambito dei PUFA della serie omega 6, e rispetto ai rispettivi range desumibili dalla letteratura, allo stato crudo l'acido linoleico (LA) si collocava al margine inferiore, mentre l'acido arachidonico (C20:4n-6, AA) si collocava in posizione per così dire centrale. Per quel che riguarda i PUFA della serie omega 3, al crudo i livelli di presenza dell'EPA erano a ridosso del limite superiore degli intervalli di letterature, mentre per il DPA li superavano, per quanto di poco. Il DHA risultava invece perfettamente ricompresi entro i valori di letteratura. In merito ai più importanti PUFA della serie omega 3, non è irrilevante notare la suscettibilità del DPA, e più ancora del DHA, a risentire dell'effetto stagione in seguito a cottura: i livelli di presenza più elevati si producevano in autunno, condizionando al medesimo tipo di responso anche la somma dei PUFA n-3

Secondo le linee guida dell'INRAN (Cialfa et al., 2003), a livello di dieta giornaliera bisognerebbe prestare attenzione al rapporto fra gli acidi grassi della serie omega 3 ed omega 6, assicurandosi di stare intorno a 1:5. Per questo parametro è notorio come, delle due possibili opzioni, sia molto più facile e frequente andare incontro a diete in cui questo rapporto è squilibrato ad ulteriore vantaggio dei PUFA n-6 che non dei PUFA n-3. Alimenti come la mazzancolla, vale a dire ipolipidici e caratterizzati dal fatto di contenere molti più PUFA n-3 che non n-6, quando inseriti in diete normolipidiche, potrebbero essere particolarmente utili ad aiutare nel raggiungimento del giusto rapporto n-3/n-6. L'alimento "mazzancolla", è appena il caso di sottolineare, apparirebbe ancora più vantaggioso se consumato allo stato crudo che non dopo cottura al vapore.

Tabella IV.4Lipidi (g/100 g di polpa) e contenuto in acidi grassi (% FAME) per *Penaeus kerathurus* allo stato crudo (Cr) e cotto (Ck)

Nutriente ^A	St	Autunno	Inverno	Primavera	RMSE ^B	Sc	St ^a	Sc*St
Lipidi	Cr Ck	1.37 1.76	1.45 2.11	1.43 1.83	0.1265	*	***	n.s.
C 14:0	Cr Ck	0.68 0.73	y 0.64 x 0.76	y 0.60 x 0.73	0.0346	n.s.	***	+
C 15:0	Cr Ck	y 0.97 x 1.08 b	y 0.94 x 1.13 ab	y 0.96 x 1.25 a	0.0200	*	***	***
C 16:0	Cr Ck	y 14.10 x 15.32 b	y 13.31 x 15.72 ab	y 13.79 x 17.65 a	0.3578	*	***	***
C 17:0	Cr Ck	y 2.41 x 2.73	y 2.35 x 2.72	y 2.30 x 2.93	0.0436	n.s.	***	***
C 18:0	Cr Ck	10.58 10.88	9.23 10.04	8.86 7.72	1.0025	**	n.s.	n.s.
Σ SFA	Cr Ck	28.74 a 30.75	y 26.48 b x 30.36	y 26.51 ab x 30.27	1.0583	*	***	n.s.
C 16:1 n-7	Cr Ck	y 4.57 x 5.20	y 4.43 x 5.42	y 4.23 x 5.52	0.1054	n.s.	***	**
C 18:1 n-9	Cr Ck	y 7.92 x 9.05 b	y 9.10 x 10.71 a	y 9.93 x 12.29 a	0.4099	***	***	n.s.
C 18:1 n-7	Cr Ck	y 3.75 x 4.09 b	y 3.71 x 4.24 ab	y 3.91 x 4.71 a	0.1015	*	***	*
C 20:1 n-11	Cr Ck	0.50 0.52	0.56 0.56	0.54 0.57	0.0283	n.s.	n.s.	n.s.
C 20:1 n-9	Cr Ck	0,36 0,39	0,42 0,45	0,47 0,49	0.0283	*	n.s.	n.s.
C 20:1 n-7	Cr Ck	0.86 0.87	0.88 0.88	0.82 0.89	0.0224	n.s.	*	n.s.
Σ MUFA	Cr Ck	y 17.95 x 20.12 b	y 19.11 x 22.26 a	y 19.91 x 24.49 a	0.5762	***	***	*
C 18:2 n-6 (LA)	Cr Ck	y 1.12 x 1.22	y 1.10 x 1.23	1.20 1.33	0.0424	+	***	n.s.
C 20:2 n-6	Cr Ck	0.65 064	0.58 0.65	0.72 0.75	0.0714	n.s.	n.s.	n.s.
C 20:4 n-6 (AA)	Cr Ck	6.10 5.85	x 6.42 y 5.71	x 6.49 y 5.69	0.1960	n.s.	***	+
C 22:4 n-6	Cr Ck	x 0.69 y 0.61	x 0.76 y 0.62	x 0.74 y 0.58	0.0200	*	***	*
C 22:5 n-6	Cr Ck	x 1.17 y 0.96	x 1.02 y 0.78	x 0.99 y 0.71	0.0387	**	***	n.s.
Σ PUFA n-6	Cr Ck	9.72 9.27	x 9.88 y 8.99	x 10.14 y 9.06	0.2280	n.s.	***	+

(continua Tabella IV.4)

Nutriente ^A	St	Autunno	Inverno	Primavera	RMSE ^B	Sc	St ^a	Sc*St
C 18:3 n-3	Cr	0.38	0.31	0.30	0.0265	*	n.s.	n.s.
	Ck	0.38	0.33	0.32				
C 18:4 n-3	Cr	0.23	0.13	0.13	0.0387	**	n.s.	n.s.
	Ck	0.24	0.14	0.13				
C 20:4 n-3	Cr	0.22	0.15	0.15	0.0245	*	**	n.s.
	Ck	0.17	0.12	0.11				
C 20:5 n-3 (EPA)	Cr	16.39	x 17.50	x 16.60	0.6723	n.s.	***	*
	Ck	15.11	y 14.65	y 13.33				
C 22:5 n-3 (DPA)	Cr	x 1.63	x 1.67	x 1.57	0.0539	**	***	*
	Ck	y 1.40 a	y 1.31 ab	y 1.17 b				
C 22:6 n-3 (DHA)	Cr	x 14.73	x 14.43	x 13.99	0.4919	**	***	*
	Ck	y 11.96 a	y 10.38 b	y 9.21 b				
Σ PUFA n-3	Cr	x 33.57	x 34.19	x 32.75	1.1314	**	***	*
	Ck	y 29.26 a	y 26.93 ab	y 24.27 b				
Non identificati	Cr	10.02	10.34	10.70	0.6189	**	*	n.s.
	Ck	10.60 b	11.45 a	11.90 a				
Σ PUFA	Cr	x 43.29	x 44.07	x 42.88	1,3379	**	***	*
	Ck	y 38.53 a	y 35.93 ab	y 33.34 b				
Σ n-3/ Σ n-6	Cr	x 3.46	x 3.46	x 3.23	0.0656	***	***	*
	Ck	y 3.15 a	y 2.99 ab	y 2.68 b				
Σ n-6/ Σ n-3	Cr	y 0.29	y 0.29	y 0.31	0.0063	***	***	**
	Ck	x 0.32 b	x 0.33 b	x 0.37 a				
PUFA/SFA	Cr	x 1.51	x 1.66	x 1.62	0.0819	n.s.	***	*
	Ck	y 1.26	y 1.18	y 1.10				
EPA/AA	Cr	x 2.69	x 2.72	x 2.56	0.0436	*	***	n.s.
	Ck	y 2.58	y 2.56	y 2.34				
EPA/DHA	Cr	y 1.11	y 1.21	y 1.19	0.0283	*	***	*
	Ck	x 1.26	x 1.41	x 1.45				

^A Entro nutriente e stagione di cattura (Sc), medie precedute da lettere diverse differiscono significativamente (x, y: P 0.05); entro nutriente e stato (St), medie seguite da lettere diverse differiscono significativamente (a, b: P≤0.05).

^B RMSE (*Root Mean Square Error*) = radice dell'errore quadratico medio; *** P≤0.001; ** P≤0.01; * P≤0.05; + P≤0.10; n.s.: non significativo.

IV.8.3.ii Canocchia (*Squilla mantis*)

In **Tabella IV.5** sono riportati i valori relativi alla canocchia

Per quanto concerne i **lipidi totali**, allo stato crudo, con il range 1,70÷2,70 g/100 g (non suscettibile di risentire dell'effetto stagione), i nostri esemplari risultavano paragonabili a quelli esaminati da Passi et al. (2002) (come riportato nel **DB_Crostacei**). Indipendentemente dalla stagione, la cottura esercitava un effetto significativo su questo parametro, sempre nella direzione di un incremento di concentrazione.

Andando a considerare la **composizione acidica**, su questa la stagione di cattura produceva effetti sporadici quanto a significatività e ancor più sporadiche erano le occasioni in cui emergevano differenze legate alla cottura. Già così, dunque sembrava possibile concludere circa una semplice, quantitativa, concentrazione dei singoli acidi grassi.

Ciò premesso, valutiamo i singoli gruppi di acidi grassi. La Σ **SFA**, che allo stato crudo rappresentava dal 24,7 al 27,2 % dei FAME, era costituita eminentemente dal C16:0, seguito dal C18:0 e, buo terzo, dall'acido miristico (C14:0). Il range coperto nel cotto (24,9 ÷ 26,6 %) diceva della sostanziale stabilità di questa voce del quadro acidico. I valori disponibili per la famiglia dei saturi in *Oratosquilla oratoria* allo stato crudo (Li et al., 2011) sono paragonabili a quelli emersi dalla presente indagine. E' appena il caso di notare come allo stato cotto il saturo più abbondante, C16:0, risenta della stagione in cui gli animali sono stati catturati, risultando più abbondante in autunno che in inverno.

La Σ **MUFA** si presentava con un range di valori non suscettibile di variare per effetto della stagione né allo stato crudo (22,99 ÷ 24,12%), né dopo cottura (23,37 ÷ 24,61%). Il dato sul crudo è leggermente inferiore, ma dello stesso ordine di grandezza, rispetto all'unico valore disponibile per il genere *Oratosquilla* (Li et al., 2011), oltre che centrare il range individuato per i MUFA di un nutrito gruppo di specie di crostacei analizzati allo stato crudo. Quanto ai singoli acidi grassi, né stagione di cattura, né cottura andavano ad influenzarne la concentrazione finale nella matrice. Come da letteratura, gli acidi grassi più rappresentativi della serie risultavano essere il palmitoleico, l'oleico ed il vaccenico il 18:1n-9.

Al pari di quanto visto sino a questo punto per le famiglie degli acidi grassi saturi e monoinsaturi dei lipidi totali di *Squilla mantis*, la Σ **PUFA** non risentiva né dell'effetto stagione, né dello stato. Il range coperto dalla matrice allo stato crudo (38,69÷41,47%) accoglieva al proprio interno l'unico dato di letteratura disponibile, derivante, come già noto, dal genere *Oratosquilla*. I PUFA della serie omega 6 variavano di ben poco, fra 8,22 e 8,93% per il crudo, cui, con il suo valore medio di 9,10, si approssimava molto l'*Oratosquilla* di Li et al (2011). Entro questa famiglia l'acido grasso più rappresentato era AA, mentre LA,

presente a livelli sensibilmente minori, era pur sempre uno dei pochi toccati da un effetto stagione.

I PUFA della serie omega 3 variavano tra il 29,76 ed il 33,14% per il crudo (range entro il quale si accomodava anche la media per *Oratosquilla*), non facendo emergere alcuna variazione significativa con la cottura e tra 29,36 % ÷ 32,00 % per il cotto. In questa famiglia, l'acido grasso più abbondante era il DHA, seguito dall'EPA, a livelli di presenza superati leggermente da quelli registrati nell'ormai famosa *Oratosquilla*. Per inciso, l'unico PUFA n-3 a risentire dell'effetto stagione allo stato crudo era l'EPA, significativamente più rappresentato in inverno che in autunno.

Dal punto di vista strettamente nutrizionale, e per quel che riguarda il rapporto tra omega 3 ed omega 6, questo era ancora più sbilanciato a favore dei PUFA n-3 di quanto non sia precedentemente risultato nella mazzancolla. A maggior ragione, dunque, la polpa di canocchia sottoposta a *pan frying* si presterebbe a fornire un suo contributo nella direzione di un utile *redressing* del rapporto n-3/n-6, come detto sempre minacciato di stravolgersi per eccessive assunzioni di PUFA n-6.

Tabella IV.5Lipidi (g/100 g di polpa) e contenuto in acidi grassi (% FAME) per *Squilla mantis* allo stato crudo (Cr) e cotto (Ck)

Nutriente ^A	St	Autunno	Inverno	Primavera	RMSE ^B	Sc	St	Sc*St
Lipidi	Cr Ck	y 1.70 x 2.58	y 2.69 x 4.82	y 2.70 x 4.76	0.4194	*	***	*
C 14:0	Cr Ck	2.75 2.57	2.94 2.91	2.84 3.08	0.1536	n.s.	n.s.	+
C 15:0	Cr Ck	0.80 0.84	0.69 0.68	0.60 0.63	0.0283	+	n.s.	n.s.
C 16:0	Cr Ck	15.26 15.64 a	14.39 14.23 b	14.33 15.01 ab	0.4037	**	n.s.	n.s.
C 17:0	Cr Ck	1.28 1.40	1.26 1.36	1.15 1.11	0.0548	n.s.	+	+
C 18:0	Cr Ck	7.77 6.84	5.95 5.74	5.78 6.10	0.5765	*	n.s.	n.s.
Σ SFA	Cr Ck	27.22 26.59	25.23 24.92	24.72 25.94	1.0100	n.s.	n.s.	n.s.
C 16:1 n-7	Cr Ck	7.12 7.43	8.28 8.33	7.88 8.33	0.2345	n.s.	*	n.s.
C 18:1 n-9	Cr Ck	7.85 8.00	6.81 6.99	8.08 8.28	0.1732	n.s.	*	n.s.
C 18:1 n-7	Cr Ck	5.00 5.08	4.69 4.96	4.99 5.14	0.2304	n.s.	n.s.	n.s.
C 20:1 n-11	Cr Ck	1.06 1.01	1.07 1.02	0.93 0.87	0.0600	n.s.	+	n.s.
C 20:1 n-9	Cr Ck	x 0.53 y 0.49	0.47 0.44	0.49 0.48	0.0141	n.s.	**	n.s.
C 20:1 n-7	Cr Ck	0.90 0.87	1.08 1.04	0.97 0.91	0.0583	**	+	n.s.
C 22:1 n-11	Cr Ck	0.45 0.41	0.32 0.29	0.33 0.28	0.0400	n.s.	+	n.s.
C 22:1 n-7	Cr Ck	0.42 0.38	0.42 0.41	0.45 0.33	0.0975	n.s.	n.s.	n.s.
Σ MUFA	Cr Ck	22.99 23.37	23.14 23.49	24.12 24.61	0.0300	n.s.	**	n.s.
C 18:2 n-6 (LA)	Cr Ck	1.05 a 1.16 a	0.69 b 0.82 b	0.92 ab 1.02 ab	0.0883	**	*	n.s.
C 18:3 n-6	Cr Ck	0.40 0.42	0.34 0.37	0.32 0.30	0.0346	n.s.	n.s.	n.s.
C 20:2 n-6	Cr Ck	0.68 0.69	0.61 0.60	0.62 0.59	0.0173	n.s.	n.s.	n.s.
C 20:4 n-6 (AA)	Cr Ck	5.25 5.35	5.16 5.03	4.91 4.82	0.1393	n.s.	n.s.	n.s.

(continua)

(continua Tabella IV.5)

Nutriente ^A	St	Autunno	Inverno	Primavera	RMSE ^B	Sc	St [†]	Sc*St
C 22:4 n-6	Cr	0.79	0.87	0.88	0.0548	n.s.	n.s.	n.s.
	Ck	0.77	0.85	0.80				
C 22:5 n-6	Cr	0.96	0.97	0.88	0.0600	+	n.s.	n.s.
	Ck	0.97	0.93	0.78				
Σ PUFA n-6	Cr	8.93	8.65	8.22	0.1643	n.s.	n.s.	+
	Ck	9.16	8.60	7.99				
C 18:3 n-3	Cr	0.61	0.48	0.51	0.0400	*	n.s.	+
	Ck	0.60 a	0.51 ab	0.44 b				
C 18:4 n-3	Cr	0.43	0.46	0.33	0.0424	n.s.	n.s.	n.s.
	Ck	0.46	0.47	0.35				
C 20:4 n-3	Cr	0.28	0.31	0.29	0.0332	n.s.	n.s.	n.s.
	Ck	0.28	0.31	0.25				
C 20:5 n-3 (EPA)	Cr	12.22 b	14.80 a	14.00 ab	0.3701	**	n.s.	n.s.
	Ck	12.26	14.34	13.79				
C 22:5 n-3 (DPA)	Cr	1.97	1.97	2.25	2.0121	n.s.	n.s.	n.s.
	Ck	1.90	1.97	4.73				
C 22:6 n-3 (DHA)	Cr	14.25	14.80	15.83	3.0879	n.s.	n.s.	n.s.
	Ck	13.86	14.40	11.33				
Σ PUFA n-3	Cr	29.76	32.82	33.14	1.2610	**	*	n.s.
	Ck	29.36	32.00	30.80				
Non identificati	Cr	11.10	10.17	9.80	0.6542	n.s.	*	n.s.
	Ck	11.52	11.00	10.66				
Σ PUFA	Cr	38.69	41.47	41.36	1.3077	+	*	n.s.
	Ck	38.52	40.60	38.79				
Σ n-3/ Σ n-6	Cr	3.34	3.80	4.07	0.1520	*	+	n.s.
	Ck	3.22	3.72	3.90				
Σ n-6/ Σ n-3	Cr	0.30	0.26	0.25	0.0100	*	+	n.s.
	Ck	0.31	0.27	0.26				
PUFA/SFA	Cr	1.43	1.64	1.67	0.0959	*	n.s.	n.s.
	Ck	1.45	1.63	1.51				
EPA/AA	Cr	2.34	2.86	2.86	0.0574	**	n.s.	n.s.
	Ck	2.30 b	2.85 a	2.87 a				
EPA/DHA	Cr	0.86	1.01	0.88	0.0539	n.s.	n.s.	n.s.
	Ck	0.89	1.00	0.97				

^A Entro nutriente e stagione di cattura (Sc), medie precedute da lettere diverse differiscono significativamente (x, y: P 0.05); entro nutriente e stato (St), medie seguite da lettere diverse differiscono significativamente (a, b: P 0.05).

^B RMSE (*Root Mean Square Error*) = radice dell'errore quadratico medio; *** P 0.001; ** P 0.01; * P 0.05; + P 0.10; n.s.: non significativo.

IV.8.3.iii Seppia (*Sepia officinalis*)

In **Tabella IV.6** sono riportati i valori relativi alla seppia.

Per quanto concerne i **lipidi totali** allo stato crudo, i nostri esemplari, con un tenore lipidico oscillante fra 1,43 e 1,64 g/100 g, si collocavano completamente entro l'intervallo di dati per pari specie desumibile dalla letteratura (vedi **DB_Seppia**), cioè $0,85 \div 1,60$. Non sembra esserci un'influenza stagionale significativa, ma le matrici risentono dell'effetto cottura per cui le concentrazioni di lipidi totali allo stato cotto, entro stagione, sono più elevate rispetto alle controparti allo stato crudo.

Per quel che riguarda la **composizione acidica**, stagione di cattura e stato di presentazione non risultano esercitare un'influenza significativa. Entriamo comunque nel dettaglio e prendiamo in esame la Σ SFA, che si variava fra 32,40 e 34,59 % (risultando comunque compresa entro il range di letteratura). Con la cottura non si produceva alcuna variazione significativa nel livello di presenza dei SFA, il più rappresentativo dei quali era il palmitico, seguito dallo stearico.

Anche per quel che riguarda la Σ MUFA, in generale non sembrava esserci alcuna influenza, né di stagione, né di cottura ed il range di valori per lo stato crudo ($8,86 \div 9,11\%$) ricadeva entro quello desumibile dalla letteratura; la cottura, inoltre, non sembrava apportare alcuna modifica sostanziale al quadro acidico. Allo stato crudo, gli acidi grassi più rappresentati, oltre ai già noti acidi oleico e vaccenico, includevano l'acido eicosenoico (C20:1n-9), l'unico a risentire dell'effetto stagione allo stato cotto.

Passiamo ora ad analizzare la Σ PUFA. Anche in questo caso, né la stagione, né la cottura influenzavano il parametro, il cui campo di variazione andava dal 49,95 al 53,40 % per il crudo (in letteratura, sempre per *S. officinalis*, dal 45,43 al 56,28%), dal 46,50 al 52,99 % per il cotto. Andando ad esaminare i singoli acidi grassi, si osserva come quelli della serie omega 6 variassero fra 3,60 e 4,12 % per il crudo, fra 3,44 e 3,97 % per il cotto. Tra questi, l'acido grasso più rappresentato era l'AA, che variava tra 1,93 e 2,33 % per il crudo, tra 1,97 e 2,33 % per il cotto.

Gli acidi grassi della serie omega 3, invece, oscillavano fra 45,83 e 49,80 % per il crudo (superiore alla media dei dati in letteratura, ma compresi entro il limite superiore) e tra 42,53 e 49,49 % per il cotto. I PUFA della serie omega 3 incidono in misura piuttosto importante sui lipidi totali di questa specie; questo era vero, in particolare, per il DHA e, in subordine, per l'EPA. Come per i PUFA della serie n-6, anche per quelli della serie n-3 non emergevano differenze significative fra lo stato crudo e quello cotto. Comparati ai dati di letteratura come raccolti nel DB Seppia, i dati emersi in occasione di questa indagine per lo

stato crudo erano al limite superiore per l'EPA (in relazione al quale, su base stagionale, addirittura superavano il valore massimo riportato da Almansa et al. nel 2006). Il DHA, invece, rimaneva entro il valore limite riportato da Ozogul et al. (2008), pari al 32,99%. Il DB Seppie, lo si precisa per dovere di cronaca, contiene una coppia di dati profondamente anomali nella colonna relativa al rapporto EPA/AA; si tratta di dati di provenienza turca (Özyurt et al., 2006), la cui anomalia è dovuta al valore estremamente basso fornito per l'AA.

Da un punto di vista nutrizionale, per quel che riguarda il rapporto tra PUFA della serie omega 3 ed omega 6, questo oscillava fra 11:1 e 14.5:1, del tutto spostato a vantaggio del primo gruppo. Ancora una volta, è opportuno considerare che comunemente “non si vive di sole seppie” e dunque il contributo che questo alimento può dare nel contesto di una dieta a modesto tenore lipidico può essere solo benefico.

Tabella IV.6Lipidi (g/100 g di polpa) e contenuto in acidi grassi (% FAME) per la *Sepia officinalis* allo stato crudo (Cr) e cotto (Ck)

Nutriente ^A	St	Autunno	Inverno	Primavera	RMSE ^B	Sc	St	Sc*St
Lipidi	Cr Ck	y 1.43 x 2.51	y 1.64 x 2.36	y 1.55 x 2.57	0.1616	n.s.	***	n.s.
C 14:0	Cr Ck	2.14 2.21	1.89 2.05	1.85 1.56	0.2313	n.s.	n.s.	n.s.
C 15:0	Cr Ck	1.11 1.16 a	0.76 0.91 ab	0.79 0.72 b	0.1393	**	n.s.	n.s.
C 16:0	Cr Ck	21.12 22.58	19.54 20.40	20.51 20.29	2.5199	n.s.	n.s.	n.s.
C 17:0	Cr Ck	1.95 2.11	1.70 1.91	1.60 1.64	0.2392	*	n.s.	n.s.
C 18:0	Cr Ck	8.28 8.78	7.61 7.61	8.19 8.27	0.3821	n.s.	n.s.	n.s.
Σ SFA	Cr Ck	34.59 36.85	32.40 33.60	32.95 32.49	3.3136	n.s.	n.s.	n.s.
C 16:1 n-7	Cr Ck	0.80 0.83	0.75 0.81	0.69 0.70	0.0768	+	n.s.	n.s.
C 18:1 n-9	Cr Ck	3.49 3.34	2.67 2.96	2.56 2.69	0.3359	**	n.s.	n.s.
C 18:1 n-7	Cr Ck	1.79 1.94	2.00 2.00	2.03 1.88	0.2680	n.s.	n.s.	n.s.
C 20:1 n-11	Cr Ck	0.55 0.57	0.49 0.50	0.32 0.40	0.0500	*	+	n.s.
C 20:1 n-9	Cr Ck	2.30 2.26 b	2.84 2.75 ab	3.02 3.01 a	0.2818	**	n.s.	n.s.
C 20:1 n-7	Cr Ck	0.31 0.29	0.30 0.30	0.26 0.26	0.0332	n.s.	n.s.	n.s.
Σ MUFA	Cr Ck	9.11 9.08	8.86 9.10	8.86 8.96	0.3450	n.s.	n.s.	n.s.
C 18:2 n-6	Cr Ck	0.43 0.38	0.41 0.40	0.35 0.36	0.0374	n.s.	n.s.	n.s.
C 20:2 n-6	Cr Ck	0.28 0.27	0.32 0.30	0.33 0.33	0.0245	+	n.s.	n.s.
C 20:4 n-6 (AA)	Cr Ck	2.33 2.33	2.01 1.97	1.93 2.02	0.1517	+	n.s.	n.s.
C 22:4 n-6	Cr Ck	0.32 0.26	0.36 0.30	0.30 0.29	0.0539	n.s.	n.s.	n.s.
C 22:5 n-6	Cr Ck	x 0.70 a y 0.56	0.50 b 0.47	0.47 b 0.50	0.0469	*	*	*
Σ PUFA n-6	Cr Ck	4.12 3.97	3.60 3.44	3.38 3.50	0.2126	*	n.s.	n.s.

(continua)

(continua Tabella IV.6)

Nutriente ^A	St	Autunno	Inverno	Primavera	RMSE ^B	Sc	St	Sc*St
C 18:3 n-3	Cr	0.16	0.12	0.12	0.0141	*	n.s.	n.s.
	Ck	0.16	0.11	0.11				
C 18:4 n-3	Cr	0.08	0.15	0.10	0.0200	+	n.s.	n.s.
	Ck	0.11	0.13	0.11				
C 20:4 n-3	Cr	0.11	0.10	0.12	0.0173	+	n.s.	n.s.
	Ck	0.09	0.10	0.11				
C 20:5 n-3 (EPA)	Cr	18.02	19.68	18.47	0.7416	+	n.s.	n.s.
	Ck	18.69	19.58	19.21				
C 22:5 n-3 (DPA)	Cr	2.02	2.01	1.78	0.1612	n.s.	n.s.	n.s.
	Ck	1.85	1.99	1.73				
C 22:6 n-3 (DHA)	Cr	25.80	27.84	28.48	2.4310	n.s.	n.s.	n.s.
	Ck	23.80	26.77	28.33				
Σ PUFA n-3	Cr	45.83	49.80	48.96	2.7368	+	n.s.	n.s.
	Ck	42.53	48.58	49.49				
Non identificati	Cr	6.38	6.14	5.49	0.7941	n.s.	+	n.s.
	Ck	6.95	7.18	6.55				
Σ PUFA	Cr	49.95	53.40	52.34	2.8142	n.s.	n.s.	n.s.
	Ck	46.50	52.02	52.99				
Σ n-3/ Σ n-6	Cr	11.17	13.95	14.57	0.8781	**	n.s.	n.s.
	Ck	10.75	14.10	14.19				
Σ n-6/ Σ n-3	Cr	0.09	0.07	0.07	0.0045	**	n.s.	n.s.
	Ck	0.09	0.07	0.07				
PUFA/SFA	Cr	1.45	1.64	1.60	0.2347	n.s.	n.s.	n.s.
	Ck	1.25	1.51	1.68				
EPA/AA	Cr	7.80	9.97	9.66	1.0080	+	n.s.	n.s.
	Ck	8.28	9.92	9.56				
EPA/DHA	Cr	0.70	0.72	0.65	0.0566	n.s.	+	n.s.
	Ck	0.78	0.74	0.69				

^A Entro nutriente e stagione di cattura (Sc), medie precedute da lettere diverse differiscono significativamente ($x, y: P \leq 0.05$); entro nutriente e stato (St), medie seguite da lettere diverse differiscono significativamente (a, b: $P \leq 0.05$).

^B RMSE (*Root Mean Square Error*) = radice dell'errore quadratico medio; *** $P \leq 0.001$; ** $P \leq 0.01$; * $P \leq 0.05$; + $P \leq 0.10$; n.s.: non significativo.

IV.8.4 Ritenzioni vere dei lipidi e degli acidi grassi

Nella **Tabella IV.7** sono riportati i coefficienti di ritenzione vera (TRVs) calcolati escludendo l'effetto stagione, anche in considerazione del fatto che, escludendo la mazzancolla, la stagione di cattura solo sporadicamente fa sentire la sua influenza in relazione alla componente lipidica. L'elaborazione condotta e la conseguente tabulazione dei dati permettono di confrontare le tre specie in esame.

Per quel che riguarda i **lipidi totali**, nessuna differenza significativa emergeva fra le specie, per le quali TRVs quali quelli ottenuti esprimevano in chiaro il fatto che il nutriente in questione subiva un mero effetto di concentrazione. In altre parole, le tre tecniche di cottura poste a confronto in relazione alla quota lipidica non generavano responsi diversi in termini di ritenzione dei grassi. Non sfugge come, in realtà, il valore ottenuto per la seppia fosse alquanto più basso; la dispersione delle ritenzioni era evidentemente troppo alta perché questo si traducesse in una differenza significativa.

Per quel che riguarda gli **SFA**, anche in questo caso i TRVs superano il 100 % e non emergono differenze significative fra le tre specie (e tecniche di cottura), le cui matrici sembrano ritenere tutte, completamente, gli acidi grassi rappresentativi.

Ritenzioni superiori al 100% e l'emergere di differenze statisticamente significative fra le specie (e le tecniche ad esse applicate, lo si ricorda) si segnalano per numerosi **MUFA** (ivi compresa la loro somma). A comportarsi come la Σ **MUFA**, in realtà, sono i due acidi grassi maggiormente rappresentativi del gruppo dei monoinsaturi, almeno per i crostacei, vale a dire il C18:1n-9 e il C16:1n-7. E' la mazzancolla cotta al vapore che ritiene massimamente i propri monoinsaturi, in misura significativamente superiore alla seppia cotta in pentola a pressione, con la canocchia sottoposta a *pan frying* in posizione intermedia. A quanto appena osservato potrebbe aver contribuito il fatto che le rese di cottura superiori sono state rilevate per la mazzancolla, le minori per la seppia, ma non basta. Premesso che basta molto poco per ritrovarsi con ritenzioni superiori al 100% a carico della quota lipidica, giova qui ricordare quanto più volte osservato dai ricercatori statunitensi impegnati negli studi di ritenzione dei nutrienti negli alimenti muscolari, nel periodo a cavallo fra gli anni '80 e '90, come passati in rassegna da Badiani et al. (2002). Per spiegare l'evento "TRV dei lipidi di parecchio superiore al 100%" i ricercatori in questione chiamavano in causa due possibili cause (nell'ipotesi di poter escludere l'involontario *smearing* di grasso sottocutaneo sulla polpa cotta): l'apporto per fusione dal grasso sottocutaneo, oppure (o anche) un miglioramento della estraibilità dei lipidi dal cotto che non dal crudo.

Passando ai **PUFA**, dei due facenti parte della serie omega 6 il LA teneva un comportamento analogo a quello dei MUFA (con la sola differenza che il primato della ritenzione per questo acido grasso spettava alla canocchia sottoposta a *pan frying*), mentre l'AA si comportava come un acido grasso saturo. Anche la Σ **PUFA n-3**, almeno per gli acidi grassi EPA e DPA, nonché per la loro sommatoria, teneva un comportamento assimilabile a quello dei SFA, pur nel contesto di valori più modesti (per l'EPA, per esempio, si andava dal 93% della mazzancolla cotta al vapore al 108% della canocchia sottoposta al *pan frying*, con la seppia cotta in pentola a pressione ad occupare una posizione numericamente intermedia (e nessuna differenza statisticamente significativa fra le tesi a confronto).

Un discorso a parte merita il DHA, per il quale la ritenzione maggiore era fornita dalla canocchia sottoposta a *pan frying*, la minore dalla mazzancolla cotta al vapore, a significare come anche il calore secco, per lo meno quando applicato a quella certa matrice (la canocchia, per l'appunto) potesse essere “rispettoso” di un acido grasso così pregiato quale il DHA.

Tabella IV.7

Ritenzioni vere (%) dei lipidi e dei principali acidi grassi delle specie in esame ad effetto stagione collassato

Nutriente ^{A, B}	<i>Penaeus kerathurus</i> (PK)	<i>Squilla mantis</i> (SM)	<i>Sepia officinalis</i> (SO)	RMSE ^C	<i>P-value</i>
Lipidi	101	103	90	14.82	0.1029
C 16:0	124	112	103	20.21	0.0616
C 18:0	109	108	106	24.56	0.9339
Σ SFA^D	119	110	102	20.74	0.1534
C 16:1 n-7	128 a	114 ab	106 b	18.57	0.0282
C 18:1 n-9	126 a	113 ab	102 b	18.16	0.0144
C 18:1 n-7	121	115	101	22.04	0.1045
C 20:1 n-11	112	104	112	24.73	0.6494
C 20:1 n-9	116	105	100	23.74	0.2677
Σ MUFA^E	124 a	112 ab	101 b	17.86	0.0153
C 18:2 n-6 (LA)	119 ab	126 a	96 b	25.99	0.0288
C 20:4 n-6 (AA)	98	109	102	19.52	0.4048
Σ PUFA n-6^F	99	111	95	20.68	0.1451
C 20:5 n-3 (EPA)	93	108	103	19.33	0.1768
C 22:5 n-3 (DPA)	87	105	96	19.98	0.1015
C 22:6 n-3 (DHA)	80 b	104 a	97 ab	19.31	0.0199
Σ PUFA n-3^G	88	106	99	18.82	0.0777
Σ PUFA	90	107	99	18.69	0.1141

^A Entro nutriente, medie seguite da lettere diverse differiscono significativamente (a, b: P 0.05).

^B PK: cottura al vapore (calore umido); SM: *pan frying* (calore secco); SO: cottura in pentola a pressione (calore umido).

^C RMSE (*Root Mean Square Error*) = radice dell'errore quadratico medio.

^D Comprende anche C 14:0, C 15:0, C 17:0.

^E Comprende anche C 20:1 n-7, C 22:1 n-11 (per SM), C 22:1 n-7 (per SM).

^F Comprende anche C 18:3 n-6 (per SM).

^G Comprende anche C 18:3 n-3, C 18:4 n-3, C 20:4 n-3.

IV.8.4 Contenuto in lipidi ed acidi grassi nella polpa cruda e cotta

In **Tabella IV.8** sono riportati i valori relativi al contenuto (mg per 100 g eduli) in lipidi e in acidi grassi della polpa delle specie in esame allo stato crudo e dopo cottura, con l'esito di elaborazioni dirette a confrontarle proprio come fonte di questi nutrienti, secondo un approccio molto pragmatico, quale quello che potrebbe avere un semplice consumatore (che potrebbe chiedersi quale alimento ittico consumare, fra quelli qui esaminati, per approvvigionarsi di questo o quell'acido grasso).

Per quanto concerne i **lipidi totali**, le tre specie risentivano dell'effetto cottura, il che comportava sia concentrazioni più elevate di lipidi nella polpa cotta, sia l'insorgere di differenze significative fra le specie in post cottura. La canocchia cotta, per essere precisi, manifestava il tenore lipidico più elevato, mentre seppia e mazzancolla non si differenziavano significativamente.

Passando alla **composizione acidica**, appare anzitutto evidente, ed era peraltro prevedibile, come i contenuti registrati nella canocchia cotta fossero sempre significativamente più elevati di quelli reperiti nella mazzancolla e come, nel contempo, questo non fosse necessariamente sempre vero nei confronti della seppia.

Così, se si va al *core* della questione, nello specifico se si vanno ad esaminare le tre specie come fonte dei componenti lipidici più pregiati, vale a dire i PUFA a lunga catena della serie omega 3, più in chiaro EPA e DHA, allora è autoevidente che gli apporti maggiori venivano dalla canocchia. Se però si considera la cosa dal punto di vista della **Densità Nutritiva**, la specie da apprezzare maggiormente emerge essere la seppia. Una porzione (100 g) di “questa” seppia cotta, difatto, apportava il 378% dei fabbisogni quotidiani cumulati di EPA e DHA come prima definiti per l'adulto (e pari a 250 mg) contro il 404% dei fabbisogni quotidiani coperti da 100 g di canocchia cotta, i quali però, in compenso, apportavano molte più calorie da lipidi (il 163% in più), senza contare l'apporto molto più generoso in colesterolo.

Tabella IV.8 Contenuto in lipidi e nei principali acidi grassi (mg/100 g di polpa) delle specie in esame allo stato crudo (Cr) e cotto (Ck)

Nutriente ^A	St ^B	<i>Penaeus kerathurus</i> (PK)	<i>Squilla mantis</i> (SM)	<i>Sepia officinalis</i> (SO)	RMSE ^C	Sp	St	Sp*St
Lipidi	Cr Ck	y 1409 x 1900 b	y 2362 x 4052 a	y 1540 x 2480 b	361	***	***	***
C 16:0	Cr Ck	y 148 x 246 b	y 289 x 533 a	y 239 x 436 a	56.2	***	***	***
C 18:0	Cr Ck	y 105 x 154 b	y 122 x 216 a	y 94 x 165 ab	28.5	**	***	*
Σ SFA^D	Cr Ck	y 295 x 471 b	y 503 x 920 a	y 387 x 699 ab	98.3	***	***	**
C 16:1 n-7	Cr Ck	48 b 83 b	y 161 a x 299 a	8 b 16 b	30.7	***	***	***
C 18:1 n-9	Cr Ck	y 94 ab x 159 b	y 152 a x 281 a	32 b 61 b	27.6	***	***	***
C 18:1 n-7	Cr Ck	y 40 b x 66 b	y 97 a x 182 a	23 b 40 b	17.5	***	***	***
C 20:1 n-11	Cr Ck	6 b 8 b	y 20 a x 35 a	5 b 9 b	3.73	***	***	***
C 20:1 n-9	Cr Ck	4 b 7 c	y 10 b x 17 b	y 32 a x 56 a	4.39	***	***	***
Σ MUFA^E	Cr Ck	y 201 ab x 336 b	y 475 a x 871 a	105 b 189 b	84.0	***	***	***
C 18:2 n-6	Cr Ck	y 12 ab x 19	y 16 a x 32	5 b 7	2.98	***	***	***
C 20:4 n-6 (AA)	Cr Ck	y 68 ab x 89 b	y 99 a x 178 a	y 24 b x 44 b	15.4	***	***	***
Σ PUFA n-6^F	Cr Ck	y 106 ab x 141 b	y 167 a x 301 a	43 b 72 b	26.3	***	***	***
C 20:5 n-3 (EPA)	Cr Ck	181 225 b	y 274 x 491 a	y 221 x 398 a	52.8	***	***	***
C 22:5 n-3 (DPA)	Cr Ck	18 20 b	y 42 x 74 a	y 23 x 38 b	9.07	***	***	***
C 22:6 n-3 (DHA)	Cr Ck	156 166 b	y 300 x 519 a	y 322 x 547 a	66.0	***	***	***
Σ PUFA n-3^G	Cr Ck	362 422 b	y 639 x 1126 a	y 570 x 989 a	127	***	***	***
Σ PUFA	Cr Ck	467 563 b	y 806 x 1427 a	y 613 x 1061 a	150	***	***	***

^A Entro nutriente e specie (Sp), medie precedute da lettere diverse differiscono significativamente (x, y: P≤0.05); entro nutriente e stato (St), medie seguite da lettere diverse differiscono significativamente (a, b, c: P≤0.05).

^B PK: cottura al vapore (calore umido); SM: *pan frying* (calore secco); SO: cottura in pentola a pressione (calore umido).

^C RMSE (*Root Mean Square Error*) = radice dell'errore quadratico medio; *** P≤0.001; ** P≤0.01; * P≤0.05; + P≤0.10; n.s.: non significativo.

^D Comprende anche C 14:0, C 15:0, C 17:0.

^E Comprende anche C 20:1 n-7, C 22:1 n-11 (per SM), C 22:1 n-7 (per SM).

^F Comprende anche C 18:3 n-6 (per SM).

^G Comprende anche C 18:3 n-3, C 18:4 n-3, C 20:4 n-3.

IV.9 Considerazioni conclusive

Volendo esordire, in conclusione, con il cosiddetto *Take-home message*, preme sottolineare la valenza nutrizionale delle specie indagate. Dalle risultanze sperimentali, per l'appunto, emerge come la mazzancolla (*Penaeus kerathurus*), la canocchia (*Squilla mantis*) e la seppia (*Sepia officinalis*), per quanto a tenore lipidico alquanto modesto, presentino un tenore in acidi grassi polinsaturi della serie omega 3 (PUFA n-3) piuttosto interessante. Nell'ipotesi che si vogliano seguire i consigli nutrizionali di recente messi a punto dall'EFSA (Agostoni et al., 2010b), che vorrebbero un'assunzione di EPA + DHA pari ad almeno 250 mg/die, il consumo di 100 g eduli anche della specie meno ricca in questi preziosi micronutrienti (la mazzancolla allo stato crudo) consentirebbe di coprire i fabbisogni di un adulto in modo più che bastevole (per il 135% circa, nello specifico). Per completezza, si ricorda che la percentuale di copertura dei fabbisogni giornalieri possibile tramite il consumo di 100 g della polpa più ricca in assoluto fra quelle analizzate (la canocchia sottoposta a *pan frying*) arrivava al 404%.

Solo per la mazzancolla la stagione di cattura esercitava un certo effetto sulla composizione acidica (l'autunno risultando la stagione più interessante per quanto concerneva il tenore in PUFA n-3), mentre canocchia e seppia non ne rimanevano nel complesso interessate. Quanto alle cotture praticate, tutte messe a punto per risultare ampiamente ripetibili e riproducibili e, nel contempo, per esemplificare in modo accettabile i trattamenti termici praticati in realtà, solo la cottura a vapore della mazzancolla modificava alquanto il quadro acidico (espresso in % FAME), andando a incrementare la concentrazione di alcuni acidi grassi saturi e monoinsaturi, a ridurre quella di alcuni acidi grassi polinsaturi. Il *pan frying* della canocchia e la cottura della seppia in pentola a pressione, invece, non modificavano significativamente il quadro acidico della matrice rispetto a quello dello stato crudo.

Il passaggio dalla composizione acidica qualitativa a quella quantitativa secondo l'approccio praticato dalle più quotate *Food Composition Tables* e Database elettronici, combinato con l'utilizzazione delle rese di cottura come emerse dalla presente prova ha permesso di stimare (per la prima volta, per quanto ci è dato sapere) i coefficienti di ritenzione vera degli acidi grassi di queste tre matrici, la cui utilità è indubbia, in vista del frequente ed economico aggiornamento dei Database di composizione degli alimenti di cui ogni Paese ad economia avanzata è ormai dotato.

Aver acquisito i coefficienti di ritenzione vera per la componente lipidica di questi

alimenti, coefficienti che, oltretutto, si sono rivelata abbastanza alti per la natura dei nutrienti indagati, rappresenta solo una piccola parte di un più ampio lavoro che andrebbe svolto per caratterizzare a tutto tondo il loro profilo nutrizionale. Tra l'altro, se è vero che molluschi e crostacei sono molto apprezzati dagli Italiani e se è altrettanto vero che i possibili modi per cucinarli sono tanti e cambiano su base molto men che regionale, varrebbe la pena, a nostro avviso, di indagare più approfonditamente che per il pregresso su tutti i connotati nutrizionali che li contraddistinguono.

IV.10 Bibliografia

- AA.VV. (2003). *Enciclopedia della cucina regionale italiana*. Boroli Editore, Novara.
- Agostoni C., Bresson J.L. Fairweather-Tait S., Flynn A., Golly I., Korhonen H., Pagona L., Løvik M., Marchelli R., Martin A., Moseley B., Neuhäuser-Berthold M., Przyrembel H., Salminen S., Sanz Y., Strain S.J.J., Strobel S., Tetens I., Tomé D., van Loveren H., Verhagen H. (2010a). Scientific opinion on establishing food-based dietary guidelines. *EFSA Journal*, 8(3), 1460 [42 pp], DOI:10.2903/j.efsa.2010.1460.
- Agostoni C., Bresson J.L. Fairweather-Tait S., Flynn A., Golly I., Korhonen H., Pagona L., Løvik M., Marchelli R., Martin A., Moseley B., Neuhäuser-Berthold M., Przyrembel H., Salminen S., Sanz Y., Strain S.J.J., Strobel S., Tetens I., Tomé D., van Loveren H., Verhagen H. (2010b). Scientific opinion on dietary reference values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, trans fatty acids, and cholesterol. *EFSA Journal*, 8(3), 1461 [107 pp.], DOI:10.2903/j.efsa.2010.1461.
- Almansa E., Domingues P., Sykes A., Tejera N., Lorenzo A., Andrade J.P. (2006). The effects of feeding with shrimp or fish fry on growth and mantle lipid composition of juvenile and adult cuttlefish (*Sepia officinalis*). *Aquaculture*, 256, 403–413, DOI:10.1016/j.aquaculture.2006.02.025.
- AOAC (2000). *Official methods of analysis* (17th ed.). Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD, USA.
- Badiani A., Stipa S., Bitossi F., Gatta P.P., Vignola G., Chizzolini R. (2002). Lipid composition, retention and oxidation in fresh and completely trimmed beef muscles as affected by common culinary practices. *Meat Science*, 60, 169–186.
- Baylan M., Ozcan B.D., Kucukgulmez A., Yanar Y. (2011). Effects of cooking methods on electrophoretic patterns of rainbow trout. *Italian Journal of Animal Science*, 10, e33 DOI:10.4081/ijas.2011.e33.
- Belahsen R., Rguib M. (2006). Population health and Mediterranean diet in southern Mediterranean countries. *Public Health Nutrition*, 9(8A), 1130–1135, DOI:10.1017/S1368980007668517.
- Bell J.G., Pratoomyot J., Strachan F., Henderson R.J., Fontanillas R., Hebard A., Guy D.R., Hunter D., Tocher D.R. (2010). Growth, flesh adiposity and fatty acid composition of Atlantic salmon (*Salmo salar*) families with contrasting flesh adiposity: effects of replacement of dietary fish oil with vegetable oils. *Aquaculture*, 306(1–4), 225–232,

DOI:10.1016/j.aquaculture.2010.05.021.

- Bligh, E.G., Dyer, W.J. (1959). A Rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), 911-917.
- Bousquet M., Calon F., Cicchetti F. (2011). Impact of omega-3 fatty acids in Parkinson's disease. *Ageing Research Reviews* 10, 453–463.
- Bragagnolo N., Rodriguez-Amaya D.B. (2011). Total lipid, cholesterol and fatty acids of farmed freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) and wild marine shrimp (*Penaeus brasiliensis*, *Penaeus schimitti*, *Xiphopenaeus kroyeri*). *Journal of Food Composition and Analysis*, 14, 359–369.
- Candela M., Astiasaran I., Bello J. (1998). Deep-fat frying modifies high-fat fish lipid fraction. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46, 2793–2796.
- Chedoloh R., Karrila T.T., Pakdeechanuan P. (2011). Fatty acid composition of important aquatic animals in Southern Thailand. *International Food Research Journal*, 18, 758–765.
- Chong E.W-T., Kreis A.J., Wong T.Y., Simpson J.A., Guymer R.H.. (2008). Dietary n-3 fatty acid and fish intake in the primary prevention of age-related macular degeneration. A systematic review and meta-analysis. *Archives of Ophthalmology*, 126(6), 826–833.
- Christie W.W. (1989). *Gas chromatography and lipids - A practical guide*, 67–69. The Oily Press, Ayr, UK.
- Cialfa E., D'Amicis A., Leclercq C., Quaglia G.B., Sette S., Ticca M., Tomassi G. (2003). Linee guida per una sana alimentazione italiana.
In: http://www.inran.it/648/linee_guida.html (ultimo accesso 19/04/2012)
- Dernekbaş S. (2012). Digestibility and liver fatty acid composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed by graded levels of canola oil. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 12, 105–113, DOI:10.4194/1303-2712-v12_1_13.
- De Ranieri S., Mori M. (1991). Stomatopoda *Squilla* collected in the Northern Tyrrhenian sea. *Crustaceana*, 60(2), 218–222.
- Dullemeijer C., Durga J., Brouwer I.A., van de Rest O., Kok F.J., Brummer R-J.M., van Boxtel M.P.J., Verhoef P. (2007). n-3 Fatty acid proportions in plasma and cognitive performance in older adults. *American Journal of Clinical Nutrition*, 86, 1479–1485.
- Egan M.B., Fragodt A., Raats M.M., Hodgkins C., Lumbers M. (2007). The importance of harmonizing food composition data across Europe. *European Journal of Clinical Nutrition*, 61, 813–821.
- Erdogdu F., Balaban M.O., Otwell W.S., Garrido L. (2004). Cook-related yield loss for pacific

- white (*Penaeus vannamei*) shrimp previously treated with phosphates: effects of shrimp size and internal temperature distribution. *Journal of Food Engineering*, **64**, 297–300.
- Esposito (2000). I consumi di prodotti ittici delle famiglie residenti in Italia, 149–228. Progetto D2 UNIPROM – STOÀ, I consumi di prodotti ittici delle famiglie residenti in Francia, Germania, Italia, Spagna. In: <http://eprints.stoa.it/16/1/italia.pdf> (ultimo accesso 6/3/2012).
- Fazzi A. (2002). *Di pesce in pesce. 3. Molluschi, crostacei ed altro*. Maria Pacini Fazzi editore, Lucca.
- Flynn A., Hirvonen T., Mensink G.B.M., Ocké M.C., Serra-Majem L., Stos K., Szponar L., Tetens I., Turrini A., Fletcher R., Wildemann T. (2009). Intake of selected nutrients from foods, from fortification and from supplements in various European countries. *Food and Nutrition Research*, **53**, 1–51, DOI:10.3402/fnr.v53i0.2038.
- Forsythe J.W., Derusha R.H., Hanlon R.T. (1994). Growth, reproduction and life span of *Sepia officinalis* (Cephalopoda: Mollusca) cultured through seven consecutive generations. *Journal of Zoology London*, **233**, 175–192.
- Freisling H., Fahey M.T., Moskal A., Ocké M.C., Ferrari P., Jenab M., Norat T., Naska A., Welch A.A., Navarro C., Schulz M., Wirfält E., Casagrande C., Amiano P., Ardanaz E., Parr C., Engeset D., Grioni S., Sera F., Bueno-de-Mesquita B., van der Schouw Y.T., Touvier M., Boutron-Ruault M.-C., Halkjær J., Dahm C.C., Khaw K.-T., Crowe F., Linseisen J., Kröger J., Huybrechts I., Deharveng G., Manjer J., Agren A., Trichopoulou A., Tsiotas K., Riboli E., Bingham S., Slimani N. (2010). Region-specific nutrient intake patterns exhibit a geographical gradient within and between European Countries. *Journal of Nutrition*, **140**(7), 1280–1286, DOI:10.3945/jn.110.121152.
- Garcia-Arias M.T., Alvarez Pontes E., Garcia-Linares M.C., Garcia-Fernandez M.C., Sanchez-Muniz F.J. (2003). Cooking–freezing–reheating (CFR) of sardine (*Sardina pilchardus*) fillets. Effect of different cooking and reheating procedures on the proximate and fatty acid compositions, *Food Chemistry*, **83**, 349–356
- Gebauer S.K., Psota T.L., Harris W.S., Kris-Etherton P.M. (2006). n–3 Fatty acid dietary recommendations and food sources to achieve essentiality and cardiovascular benefits. *American Journal of Clinical Nutrition*, **83**(6), S1526– 1535S.
- Gladyshev M.I., Sushchik N.N., Gubanenko G.A., Demirchieva S.M., Kalachova G.S. (2006). Effect of way of cooking on content of essential polyunsaturated fatty acids

- in muscle tissue of humpback salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*). *Food Chemistry*, 96(3), 446–451.
- Gladyshev M.I., Sushchik N.N., Gubanenko G.A., Demirchieva S.M., Kalachova G.S. (2007). Effect of boiling and frying on the content of essential polyunsaturated fatty acids in muscle tissue of four fish species. *Food Chemistry*, 101, 1694–1700.
- Gnagnarella P., Parpinel M., Salvinic S., Franceschi S., Palli D., Boyle P. (2004). The update of the Italian Food Composition Database. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17 509–522.
- Gokoglu N., Yerlikaya P., Cengiz E. (2004). Effects of cooking methods on the proximate composition and mineral contents of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Food Chemistry*, 84, 19–22, DOI:10.1016/S0308-8146(03)00161-4.
- Greenfield H., Southgate D.A.T. (2003) Food composition data. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome.
- Gül Harlioğl A., Aydin S., Yilmaz Ö. (2012). Fatty acid, cholesterol and fat-soluble vitamin composition of wild and captive freshwater crayfish (*Astacus leptodactylus*). *Food Science and Technology International*, 18(1), 93–100, DOI: 10.1177/1082013211414261.
- Harris W.S. (2008). The omega-3 index as a risk factor for coronary heart disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, 87(suppl), 1997S–2002S.
- Haytowitz D.B., Lemar L.E., Pehrsson P.R. (2009). USDA’s nutrient databank system – A tool for handling data from diverse sources. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22, 433–441, doi:10.1016/j.jfca.2009.01.003.
- ISMEA (2011). Il mercato dei prodotti ittici freschi in Italia: produzione, consumi e canali distributivi.
In: <http://www.ismea.it/flex/cm/pages/ServeBLOB.php/L/IT/IDPagina/6598>.
- Izquierdo M.S., Montero D., Robaina, L. Caballero M.J., Rosenlund G., Ginés R. (2005). Alterations in fillet fatty acid profile and flesh quality in gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed vegetable oils for a long term period. Recovery of fatty acid profiles by fish oil feeding. *Aquaculture*, 250(1–2), 431–444.
- Karapanagiotidis I.T., Yakupitiyage A., Little D.C., Michael V., Bell M.V., Mente E. (2010). The nutritional value of lipids in various tropical aquatic animals from rice–fish farming systems in northeast Thailand. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(1), 1–8, DOI:10.1016/j.jfca.2009.08.001.
- Keys A. (1995). Mediterranean diet and public health. *The American Journal of Clinical*

- Nutrition*, 61(6), 13215–13235.
- Lenas D., Chatziantoniou S., Nathanailides C., Triantafillou D. (2011). Comparison of wild and farmed sea bass (*Dicentrarchus labrax* L) lipid quality. *Procedia Food Science*, 1, 1139–1145, DOI:10.1016/j.profoo.2011.09.170.
- Li G., Sinclair A.J., Li D. (2011). Comparison of lipid content and fatty acid composition in the edible meat of wild and cultured freshwater and marine fish and shrimps from China. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 1871–1881, DOI:10.1021/jf104154q.
- Łuczyńska J., Paszczyk B., Borejszo Z., Tarkowski Ł. (2012). Fatty acid profile of muscles of freshwater fish from Olsztyn markets, *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 62(1), 51–55.
- Luzia L.A., Sampaio G.R., Castellucci C.M.N., Torres E.A.F.S. (2003). The influence of season on the lipid profiles of five commercially important species of Brazilian fish. *Food Chemistry*, 83(1), 93–97, DOI:10.1016/S0308-8146(03)00054-2.
- Mathew S., Ammu K., Viswanathan Nair P.G., Devadasan K. (1999). Cholesterol content of Indian fish and shellfish. *Food Chemistry*, 66, 455–461.
- Matthews R.H., Garrison Y.J. (1975). Food yields summarized by different stages of preparation. U.S. Department of Agriculture, Agriculture Handbook 102.
- Maynou F., Abelló P., Sartor P. (2004). A review of the fisheries biology of the mantis shrimp, *Squilla mantis* (L., 1758) (Stomatopoda, Squillidae) in the Mediterranean. *Crustaceana*, 77(9), 1081–1099.
- McCann J.C., Ames B.N. (2005). Is docosahexaenoic acid, an n3 long-chain polyunsaturated fatty acid, required for development of normal brain function? An overview of evidence from cognitive and behavioral tests in humans and animals. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 82, 281–295.
- Mohan C.O., Ravishankar C.N., Bindu, J., Geethalakshmi V., Srinivasa Gopal T.K. (2006). Effect of thermal process time on quality of “shrimp kuruma” in retortable pouches and aluminum cans. *Journal of Food Science*, 71, S496–S500, DOI:10.1111/j.1750-3841.2006.00099.x.
- Montano N., Gavino G., Gavino V.C. (2001). Polyunsaturated fatty acid contents of some traditional fish and shrimp paste condiments of the Philippines. *Food Chemistry*, 75, 155–158.
- Morita K., Kubota K., Aishima T. (2001). Sensory characteristics and volatile components in aromas of boiled prawns prepared according to experimental designs. *Food Research*

- International*, 34, 473–481.
- Murphy E.W., Criner P.E., Gray B.C. (1975). Comparisons of methods for calculating retentions of nutrients in cooked foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 23(6), 1153–1157.
- Musaiger A.O., D’Souza R. (2008). The effects of different methods of cooking on proximate, mineral and heavy metal composition of fish and shrimps consumed in the Arabian Gulf. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 58(1), 103–109.
- Oksuz A., Ozyilmaz A., Aktas M., Gercek G., Motte J. (2009). A comparative study on proximate, mineral and fatty acid compositions of deep seawater rose shrimp (*Parapenaeus longirostris*, Lucas 1846) and red shrimp (*Plesionika martia*, A. Milne-Edwards, 1883). *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 8(1), 183–189.
- Önsoy B., Salman A. (2005). Reproductive biology of the common cuttlefish *Sepia officinalis* L. (*Sepiida: Cephalopoda*) in the Aegean Sea. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 29, 613–619.
- Ojewola G.S., Okoye F.C., Ukoha O.A. (2005). Comparative utilization of three animal protein sources by broiler chickens. *International Journal of Poultry Science*, 4(7), 462–467.
- Özden Ö., Erkan N., (2011). A preliminary study of amino acid and mineral profiles of important and estimable 21 seafood species. *British Food Journal*, 113(4), 457–469, DOI: 10.1108/00070701111123943.
- Ozogul Y., Duysak O., Ozogul F., Özkütük A.S., Türeli C. (2008). Seasonal effects in the nutritional quality of the body structural tissue of cephalopods. *Food Chemistry*, 108 (3), 847–852, DOI:10.1016/j.foodchem.2007.11.048.
- Özyurt G, Duysak Ö., Akamca E. Türeli C. (2006). Seasonal changes of fatty acids of cuttlefish *Sepia officinalis* L. (Mollusca: Cephalopoda) in the North Eastern Mediterranean sea. *Food Chemistry*, 95 (3), 382–385, DOI:10.1016/j.foodchem.2004.12.044.
- Panchaud A., Sauty A., Kernen Y., Decosterd L.A., Buclin T., Boulat O., Hug C., Pileta M., Roulet M. (2006). Biological effects of a dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids supplementation in cystic fibrosis patients: a randomized, crossover placebo-controlled trial. *Clinical Nutrition*, 25, 418–427.
- Passi S., Cataudella S., Di Marco P., De Simone F., Rastrelli L. (2002). Fatty acid composition and antioxidant levels in muscle tissue of different Mediterranean marine species of fish and shellfish. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50,

7314–7322.

- Pérez-Castaneda R., Defeo O. (2001). Population variability of four sympatric penaeid shrimps (*Farfantepenaeus spp.*) in a tropical coastal lagoon of Mexico. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 52, 631–641, DOI:10.1006/ecss.2001.0771.
- Pirini M., Testi S., Ventrella V., Pagliarani A., Badiani A. (2010). Blue-back fish: fatty acid profile in selected seasons and retention upon baking. *Food Chemistry*, 123, 306–314, DOI:10.1016/j.foodchem.2010.04.036.
- Puwastien P., Judprasong K., Kettwan E., Vasanachitt K., Nakngamanong Y., Bhattacharjee L. (1999). Proximate composition of raw and cooked Thai freshwater and marine fish. *Journal of Food Composition and Analysis*, 12, 9–16.
- Ravinder Reddy V., Ravindra Reddy V., Qudratullah S. (1997). Utilisation of squilla meal (a novel animal protein source) by broilers. *British Poultry Science*, 38(3), 263–269, DOI:10.1080/00071669708417984.
- Rosa R., Nunes M.L. (2004). Nutritional quality of red shrimp, *Aristeus antennatus* (Risso), pink shrimp, *Parapenaeus longirostris* (Lucas), and Norway lobster, *Nephrops norvegicus* (Linnaeus). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84 (1), 89–94, DOI:10.1002/jsfa.1619.
- Rothlisberg P.C., Church J.A., Fandry C.B. (1995). A mechanism for near-shore concentration and estuarine recruitment of post-larval *Penaeus plebejus hess* (Decapoda, Penaeidae). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 40(2), 115–138.
- Royal Society (1972). Metric units, conversion factors and nomenclature in nutritional and food sciences. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 23, 1383–1391, DOI:10.1002/jsfa.2740231115.
- Rudkowska I. (2010) Fish oils for cardiovascular disease: impact on diabetes. *Maturitas*, 67, 25–28.
- Saguy I.S., Dana, D. (2003). Integrated approach to deep fat frying: engineering, nutrition, health and consumer aspects. *Journal of Food Engineering*, 56, 143–152.
- Sampaio G.R., Bastos D.H.M., Soares R.A.M., Queiroz Y.S., Torres E.A.F.S. (2006). Fatty acids and cholesterol oxidation in salted and dried shrimp. *Food Chemistry*, 95, 344–351, DOI:10.1016/j.foodchem.2005.02.030.
- Sampath Kumar N.S., Satya Vijaya Kumar N., Jaiganesh R. (2012). Therapeutic drugs: healing power of marine fish. *Advances in Food Nutrition Research*, 65, 269–286.
- Sant'Ana L.S., Mancini-Filho J. (2000). Influence of the addition of antioxidants in vivo on the fatty acid composition of fish filets. *Food Chemistry*, 68, 175–178.

- Saravanan P., Davidson N.C., Schmidt E.B., Calder P.C. (2010). Cardiovascular effects of marine omega-3 fatty acids. *Lancet*, 375, 540–550, DOI:10.1016/S0140- 6736(10)60445-X.
- Satar E.İ., Uysal E., Ünlü E., Bashan M., Satar A. (2012). The effects of seasonal variation on the fatty acid composition of total lipid, phospholipid, and triacylglycerol in the dorsal muscle of *Capoeta trutta* found in the Tigris River (Turkey). *Turkish Journal of Biology*, 36, 113–123, DOI:10.3906/biy-1008-8.
- Sinanoglou V.J., Miniadis-Meimaroglou S. (1998). Fatty acid of neutral and polar lipids of (edible) Mediterranean cephalopods. *Food Research International*, 31(6-7), 467–473.
- Sofi F., Vecchio S., Giuliani G., Marcucci R., Gori A.M., Fedi S., Casini A., Surrenti C., Abbate R., Gensin G.F. (2005). Dietary habits, lifestyle and cardiovascular risk factors in a clinically healthy Italian population: the ‘Florence’ diet is not Mediterranean. *European Journal of Clinical Nutrition*, 59, 584–591.
- Sriket P., Benjakul S., Visessanguan W, Kijroongrojana K. (2007). Comparative studies on chemical composition and thermal properties of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and white shrimp (*Penaeus vannamei*) meats. *Food Chemistry*, 103(4), 1199–1207, DOI:10.1016/j.foodchem.2006.10.039.
- Tarley C.R.T., Visentainer J.V., Matsushita M., de Souza N.E. (2004). Proximate composition, cholesterol and fatty acids profile of canned sardines (*Sardinella brasiliensis*) in soybean oil and tomato sauce. *Food Chemistry*, 88, 1–6.
- Thanonkaew A., Benjakul S., Visessanguan W. (2006). Chemical composition and thermal property of cuttlefish (*Sepia pharaonis*) muscle. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19 (2-3), 127–133, DOI:10.1016/j.jfca.2005.04.008.
- Torstensen B.E., Bell J.G., Rosenlund G., Henderson R.J., Graff I.E., Tocher D.R., Lie Ø., Sargent J.R. (2005). Tailoring of atlantic salmon (*Salmo salar* L.) flesh lipid composition and sensory quality by replacing fish oil with a vegetable oil blend. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53(26), 10166–10178, DOI:10.1021/jf051308i.
- Tsape K., Sinanoglou V.J., Miniadis-Meimaroglou S. (2010). Comparative analysis of the fatty acid and sterol profiles of widely consumed Mediterranean crustacean species. *Food Chemistry*, 122(1), 292-299, DOI:10.1016/j.foodchem.2010.02.019.
- Turan H, Kaya Y, Erdem M.E. (2011). Proximate composition, cholesterol, and fatty acid content of brown shrimp (*Crangon crangon* L. 1758) from Sinop region, Black Sea. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 20(1), 100–107,

DOI:10.1080/10498850.2010.526753.

- Turkkan A.U., Cakli S., Kilinc B. (2008). Effects of cooking methods on the proximate composition and fatty acid composition of seabass (*Dicentrarchus labrax*, Linnaeus, 1758). *Food and Bioproducts processing*, 86, 163–166.
- Uauy R., Dangour A.D. (2006). Nutrition in brain development and aging: role of essential fatty acids. *Nutrition Reviews*, 64, S24–S33, DOI:10.1111/j.1753-4887.2006.tb00242.x
- U.S.D.A. (U.S. Department of Agriculture) (2007). *USDA Table of Nutrient Retention Factors Release 6*.
<http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/12354500/Data/retn/retn06.pdf>.
- U.S.D.A. (U.S. Department of Agriculture) (2011). *Composition of Foods Raw, Processed, Prepared USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 24*.
http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/12354500/Data/SR24/sr24_doc.pdf.
- U.S.D.A. (U.S. Department of Agriculture) , H.H.S. (U.S. Department of Health and Human Services). (2010). *Dietary Guidelines for Americans, 2010, 7th Edition*. U.S. Government Printing Office, Washington, DC, USA
- Yagiz Y., Kristinsson H.G., Balaban Murat O., Welt B.A., Ralat M., Marshall M.R. (2009). Effect of high pressure processing and cooking treatment on the quality of Atlantic salmon. *Food Chemistry*, 116, (4), 828–835.
- Yanar Y., Çelik M. (2005). Seasonal variations of fatty acid composition in wild marine shrimps (*Penaeus semisulcatus* De Haan, 1844 and *Metapenaeus monoceros* Fabricus, 1789) from the Eastern Mediterranean Sea. *Food Science and Technology International*, 11(5), 391–395, DOI: 10.1177/1082013205058245.
- Yanar Y., Çelik M. (2006). Seasonal amino acid profiles and mineral contents of green tiger shrimp (*Penaeus semisulcatus* De Haan, 1844) and speckled shrimp (*Metapenaeus monoceros* Fabricus, 1789) from the Eastern Mediterranean. *Food Chemistry*, 94(1), 33–36, DOI:10.1016/j.foodchem.2004.09.049.
- Yusuf S., Hawken S., Ounpuu S., Dans, T., Avezum A., Lanas F., McQueen M., Budaj A., Pais P., Varigo J. Lisheng A. (2004). Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 Countries (The INTERHEART Study): case-control study. *Lancet*, 364, 937–952, DOI:10.1016/S0140-6736(04)17018-9.
- Watkins S.M., German J.B., (2002). Unsaturated fatty acids, 577–606. In (C.C. Akoh, D.B. Min Eds): *Food Lipids: Chemical, Nutrition and Biotechnology*. 2nd edition. Marcel Dekker, Inc., New York, NY, USA.
- Weber J., Bochi V.C., Ribeiro C.P., Victorio A, Emanuelli T. (2008). Effect of different

- cooking methods on the oxidation, proximate and fatty acid composition of silver catfish (*Rhamdia quelen*) fillets. *Food Chemistry*, 106, 140–146.
- Weihrauch J.L., Posati L.P., Anderson B.A., Exler J. (1977). Lipid conversion factors for calculating fatty acid contents of foods. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 54, 36–40.
- Welch A.A., Shakya-Shrestha S., Lentjes M.A.H., Wareham N.J., Khaw K-T. (2010). Dietary intake and status of n3 polyunsaturated fatty acids in a population of fish-eating and non-fish-eating meat-eaters, vegetarians, and vegans and the precursor-product ratio of α -linolenic acid to long-chain n3 polyunsaturated fatty acids: results from the EPIC-Norfolk cohort. *American Journal of Clinical Nutrition*, 92, 1040–1051.
- World Health Organization. (2009). *Cardiovascular Disease*. Fact sheet N°317, Geneva, Switzerland. [Http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/print.html](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/print.html), (ultimo accesso 5 aprile 2012).
- Zlatanov S., Laskaridis K., Feist C, Sagredos A. (2006). Proximate composition, fatty acid analysis and protein digestibility-corrected amino acid score of three Mediterranean cephalopods. *Molecular Nutrition & Food Research*, 50(10), 967–970, DOI:10.1002/mnfr.200600003.
- Zlatanov S., Laskaridis K., Sagredos A. (2009). Determination of proximate composition, fatty acid content and amino acid profile of five lesser-common sea organisms from the Mediterranean Sea. *International Journal of Food Science & Technology*, 44(8), 1590–1594, DOI:10.1111/j.1365-2621.2008.01870.x.

REGOLAMENTI:

- Direttiva 90/496/CEE. Direttiva del Consiglio del 24 settembre 1990 relativa all'etichettatura nutrizionale dei prodotti alimentari. Gazzetta Ufficiale della Comunità Europea, L 276 del 06.10.1990, 40–44.
- Regolamento (CE) N. 1924/2006 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 20 dicembre 2006 relativo alle indicazioni nutrizionali e sulla salute fornite sui prodotti alimentari. Gazzetta Ufficiale dell'unione Europea, L 404 del 30.12.2006, 9–25.
- Regolamento (CE) 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 e abroga la direttiva 87/250/CEE della Commissione, la direttiva 90/496/CEE del Consiglio, la direttiva 1999/10/CE della Commissione, la direttiva

2000/13/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, le direttive 2002/67/CE e 2008/5/CE della Commissione e il regolamento (CE) n. 608/2004 della Commissione. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, L 304 del 22.11.2011, 18–63.