



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Scienze Animali

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN: SCIENZE ANIMALI

INDIRIZZO: ALLEVAMENTO, ALIMENTAZIONE, AMBIENTE, BENESSERE
ANIMALE E QUALITÀ DEI PRODOTTI

CICLO XXII

**CARATTERIZZAZIONE QUALITATIVA, EVOLUZIONE DELLA
FRESCHEZZA E IDENTIFICAZIONE DI SPIGOLE (*Dicentrarchus labrax* L.)
PROVENIENTI DA DIFFERENTI SISTEMI DI ALLEVAMENTO**

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Luigi Gallo

Coordinatore d'indirizzo: Ch.ma Prof.ssa Lucia Bailoni

Supervisore: Ch.mo Prof. Gerolamo Xiccato

Correlatore: Dott.ssa Angela Trocino

Dottorando: Duilio Majolini

Indice

Riassunto	- 3 -
Summary	- 17 -
1. Introduzione	- 29 -
1.1. <i>Le dimensioni del settore dell'acquacoltura</i>	- 29 -
1.1.1. L'acquacoltura nel mondo	- 29 -
1.1.2. L'acquacoltura nell'Unione Europea	- 31 -
1.1.3. L'acquacoltura in Italia	- 34 -
1.1.4. Importazione, esportazione e consumi in Italia	- 38 -
1.2. <i>La spigola</i>	- 40 -
1.2.1. Classificazione zoologica e descrizione della specie	- 40 -
1.2.2. Allevamento della spigola	- 41 -
1.2.3. Riproduzione artificiale e allevamento larvale	- 43 -
1.2.4. Tipologie di allevamento per l'ingrasso	- 44 -
1.3. <i>Caratterizzazione della qualità delle spigole</i>	- 48 -
1.3.1. Composizione chimica e valore nutrizionale del pesce e della spigola	- 48 -
1.3.2. Biometrie e caratteristiche della carcassa	- 53 -
1.4. <i>Freschezza del pesce</i>	- 55 -
1.4.1. Evoluzione della freschezza	- 55 -
1.4.2. Metodi di valutazione della freschezza	- 59 -
1.5. <i>Contaminanti ambientali</i>	- 61 -
1.5.1. Policlorobifenili (PCB) e altri organoclorurati	- 62 -
1.5.2. Caratteristiche chimiche e fisiche delle molecole di PCB	- 64 -
1.5.3. Nomenclatura dei PCB	- 65 -
1.5.4. Aspetti molecolari dei PCB diossina-simili	- 66 -
1.5.5. Bioaccumulo dei PCB e normative di riferimento	- 66 -
1.5.6. Assunzione di PCB da parte dell'uomo dai prodotti ittici e tossicologia	- 69 -
1.5.7. Accumulo di PCB nelle spigole	- 71 -
1.5.8. Metalli pesanti	- 72 -
1.5.8.1. Mercurio	- 74 -
1.5.8.2. Cadmio	- 75 -
1.5.8.3. Rame	- 76 -
1.5.8.4. Piombo	- 77 -
1.5.8.5. Zinco	- 78 -
1.5.8.6. Cromo	- 79 -
1.5.8.7. Arsenico	- 79 -
1.6. <i>Applicazione della spettrometria nel vicino infrarosso (NIRS) per la valutazione della qualità dei prodotti ittici</i>	- 81 -
1.6.1. Principi di funzionamento della tecnica NIRS	- 81 -
1.6.2. Vantaggi e svantaggi della tecnica NIRS	- 82 -
1.6.3. Analisi NIRS di pesci e derivati	- 84 -
2. Obiettivi	- 89 -
2.1. <i>Inquadramento generale del problema</i>	- 89 -
2.2. <i>Obiettivi generali e specifici</i>	- 90 -
3. Materiale e metodi	- 93 -
3.1. <i>Campionamenti</i>	- 93 -
3.2. <i>Cattura e macellazione degli animali</i>	- 95 -
3.3. <i>Preparazione dei campioni e analisi</i>	- 96 -
3.3.1. Valutazione sensoriale della freschezza	- 96 -
3.3.2. Biometrie e indici morfometrici	- 101 -
3.3.3. Determinazione del colore della pelle	- 101 -
3.3.4. Determinazione della tessitura del pesce intero (TPA)	- 102 -
3.3.5. Determinazione del pH oculare	- 103 -
3.3.6. Eviscerazione e pesatura degli organi interni	- 103 -
3.3.7. Sfilettatura della carcassa	- 104 -
3.3.8. Determinazione del colore del filetto	- 104 -
3.3.9. Determinazione del pH del filetto	- 104 -
3.3.10. Analisi della tessitura del filetto	- 104 -
3.3.11. Separazione della pelle e macinazione del filetto	- 105 -
3.3.12. Analisi NIRS del filetto fresco	- 105 -
3.3.13. Analisi del profilo acidico del grasso muscolare	- 106 -

Indice

3.3.14. Analisi dell'azoto basico volatile totale (TVBN)	- 106 -
3.3.15. Liofilizzazione del filetto	- 107 -
3.3.16. Determinazione delle caratteristiche chimiche del filetto liofilizzato	- 107 -
3.3.17. Analisi NIRS del filetto liofilizzato	- 107 -
3.3.18. Determinazione dei metalli pesanti nel filetto e nei mangimi	- 107 -
3.3.19. Determinazione dei PCB del filetto e dei mangimi	- 108 -
3.3.19.1. Determinazione dei 7 congeneri di riferimento dei PCB	- 108 -
3.3.19.2. Determinazione dei 12 congeneri diossina-simili dei PCB	- 109 -
3.4. <i>Trattamento dei dati e analisi statistica</i>	- 110 -
4. Risultati e discussione	- 113 -
4.1. <i>Obiettivo 1. QUALITÀ - Caratterizzare dal punto di vista morfologico, chimico e dietetico spigole provenienti da allevamenti italiani con diversi sistemi produttivi</i>	- 113 -
4.1.1. Caratteristiche morfologiche e reologiche della carcassa	- 113 -
4.1.2. Composizione chimica e profilo acidico del filetto	- 116 -
4.2. <i>Obiettivo 2. CONTAMINANTI - Determinare la presenza e il livello di contaminanti ambientali (PCB e metalli pesanti) in spigole provenienti da differenti sistemi di allevamento italiani</i>	- 121 -
4.2.1. Variazione dei livelli di PCB nei filetti di spigole e nei mangimi	- 121 -
4.2.2. Variazione dei metalli pesanti nei filetti di spigole e nei mangimi	- 128 -
4.3. <i>Obiettivo 3. FRESCHEZZA - Valutare l'evoluzione della freschezza in spigole d'allevamento in funzione del tempo di conservazione e del sistema produttivo</i>	- 132 -
4.3.1. Evoluzione della freschezza di spigole provenienti da un unico allevamento conservate per una durata di otto giorni	- 132 -
4.3.2. Evoluzione della freschezza di spigole provenienti da tre allevamenti e conservate per una durata di 17 giorni	- 138 -
4.4. <i>Obiettivo 4. NIRS - Utilizzare l'analisi NIRS per la caratterizzazione chimica e dietetica, la valutazione della freschezza e l'identificazione di origine di spigole provenienti da diversi sistemi di allevamento</i>	- 146 -
4.4.1. Previsione NIRS delle caratteristiche chimico-nutrizionali e morfologiche delle spigole	- 147 -
4.4.2. Previsione NIRS della freschezza e della durata di conservazione	- 153 -
4.4.3. Caratterizzazione di origine e tipologia di allevamento	- 160 -
5. Conclusioni	- 165 -
6. Bibliografia	- 171 -

Riassunto

Riassunto

Caratterizzazione qualitativa, evoluzione della freschezza e identificazione di spigole (*Dicentrarchus labrax* L.) provenienti da differenti sistemi di allevamento

La tesi di dottorato è suddivisa in quattro sezioni principali: introduzione, obiettivi, materiali e metodi, risultati e discussione e si conclude con alcune considerazioni generali e l'elenco bibliografico.

Introduzione

In questa sezione sono riportate le statistiche mondiali e nazionali del settore della pesca e dell'acquacoltura, con particolare riguardo alla produzione della spigola. Sono descritte le caratteristiche morfologiche e l'habitat naturale della spigola, i sistemi di allevamento, in particolare le tecniche di riproduzione e svezzamento, le strutture e i sistemi di ingrasso. La seconda parte del capitolo è dedicata a definire e tracciare lo stato dell'arte sugli aspetti più specifici oggetto di studio in questa tesi, ossia la caratterizzazione qualitativa, morfologica e nutrizionale dei prodotti ittici e della spigola in particolare, la sicurezza alimentare, con il problema della contaminazione da PCB e metalli pesanti, la caratterizzazione e l'evoluzione della freschezza, e, infine, vengono descritte la tecnica della spettroscopia nel vicino infrarosso (NIRS, *Near Infrared Reflectance Spectroscopy*) e le sue potenziali applicazioni, soprattutto nella qualificazione dei prodotti ittici.

La spigola, insieme con l'orata, rappresenta la principale specie ittica allevata in Italia dopo la trota. La forte competizione esistente tra i Paesi produttori dell'area mediterranea (in particolare Turchia, Grecia, Spagna, Croazia) e la conseguente pressione sui prezzi di mercato richiedono una caratterizzazione e una differenziazione della qualità e della sicurezza alimentari del prodotto nazionale.

Sebbene con una percezione diversificata da paese a paese è aumentata nel consumatore medio europeo l'attenzione verso la sicurezza delle derrate alimentari, in particolare la preoccupazione per la possibile presenza di sostanze tossiche inorganiche e organiche persistenti nei prodotti ittici dell'acquacoltura. Se da un lato ai prodotti della pesca e dell'acquacoltura è riconosciuta unanimemente una valenza dietetica superiore a quella dei prodotti di animali terrestri, dovuta all'elevata concentrazione di acidi grassi polinsaturi, in particolare della serie ω -3, dall'altro i prodotti ittici sono più suscettibili all'accumulo di contaminanti che si concentrano lungo la catena trofica naturale o si incontrano nei mangimi

Riassunto

commerciali. Il controllo della concentrazione di policlorobifenili (PCB) e metalli pesanti riveste un'importanza basilare, trattandosi di inquinanti che si accumulano nei tessuti degli organismi carnivori all'apice della catena trofica e il cui effetto, sebbene controverso, viene associato a varie malattie metaboliche, endocrine e riproduttive e all'insorgenza di tumori.

Nella fase *post-mortem*, la qualità dei prodotti ittici non può prescindere dal grado di freschezza e dallo stato di conservazione. Queste caratteristiche possono essere valutate con diversi metodi basati sulla determinazione in laboratorio della concentrazione di prodotti di degradazione, così come su valutazioni sensoriali eseguite con metodiche standard e non specifiche (Reg. EC 2406/96) o secondo schemi più recenti e adattati alla singola specie e tipologia di prodotto (Quality Index Method, QIM).

Tra le metodologie innovative, la l'analisi NIRS può essere utilizzata vantaggiosamente per la caratterizzazione globale dei prodotti ittici freschi e conservati. Già ampiamente utilizzata per la valutazione delle caratteristiche nutrizionali di alimenti zootecnici, per la caratterizzazione, autenticazione dell'origine e per l'individuazione di eventuali adulterazioni in un'ampia gamma di prodotti agro-alimentari, l'analisi NIRS è stata impiegata con successo anche nel settore dell'acquacoltura per predire la composizione chimica di carni di varie specie, oltre che identificare i pesci in funzione del sistema di allevamento e della freschezza.

Obiettivi

Con l'obiettivo generale di contribuire a rinforzare i programmi per la qualità totale, la sicurezza alimentare e la valorizzazione della spigola attraverso uno studio ad ampio raggio delle caratteristiche biometriche, chimico-nutrizionali, sensoriali e tossicologiche di pesci di diversa taglia commerciale, provenienti da diverse tipologie di allevamento e da diverse aree geografiche del territorio nazionale, la presente tesi ha sviluppato i seguenti obiettivi specifici:

Obiettivo 1 - QUALITÀ. Caratterizzare dal punto di vista morfologico, chimico e dietetico spigole provenienti da allevamenti italiani con differenti sistemi produttivi.

Obiettivo 2 - CONTAMINANTI. Determinare la presenza e il livello di contaminanti ambientali (PCB e metalli pesanti) in spigole provenienti da differenti sistemi di allevamento italiani.

Obiettivo 3 - FRESCHEZZA. Valutare l'evoluzione della freschezza in spigole d'allevamento in funzione del tempo di conservazione e del sistema produttivo.

Riassunto

Obiettivo 4 - NIRS. Utilizzare l'analisi NIRS per la caratterizzazione chimica e dietetica, la valutazione della freschezza e l'identificazione di origine di spigole provenienti da diversi sistemi di allevamento.

Materiali e Metodi

Campionamenti

Sono stati utilizzati quattro set di campioni prelevati e analizzati in tempi diversi:

Campionamento n. 1: 133 spigole provenienti da 4 impianti con diverso sistema di allevamento (estensivo in valle, semi-intensivo a terra, intensivo a terra, intensivo in gabbie a mare).

Campionamento n. 2: 170 spigole di due taglie commerciali (400-600 g e 700-1000 g) prelevate da 11 impianti distribuiti sul territorio nazionale appartenenti a tre sistemi di allevamento (estensivo in valle, intensivo a terra, intensivo in gabbie a mare). Ove utilizzato e disponibile, è stato campionato il mangime somministrato alle spigole nell'ultima fase di allevamento prima della cattura.

Campionamento n. 3: 90 spigole (peso medio circa 300 g) prelevate in una fase successiva dall'allevamento semi-intensivo già interessato al campionamento n. 1.

Campionamento n. 4: 90 spigole da tre impianti appartenenti a tre diversi sistemi di allevamento (estensivo in valle, intensivo a terra, intensivo in gabbie a mare), già interessati dal campionamento 2.

Preparazione dei campioni e analisi

I pesci catturati e sacrificati in acqua e ghiaccio sono stati sottoposti a:

- valutazione sensoriale della freschezza con l'utilizzo dello schema standard di valutazione UE (Reg. EC 2406/96) e due diversi schemi QIM (Quality Index Method);
- biometrie e indici morfometrici; sono stati misurati lunghezza totale, lunghezza standard, altezza massima e lunghezza della testa. Tali misure sono state utilizzate per calcolare fattore di condizione (FC), profilo relativo (PR) e indice craniale (IC);
- determinazione del colore ($L^*a^*b^*$) della pelle in tre punti dorsali e due ventrali mediante spettrofotometro;
- analisi della tessitura del pesce intero: è stata eseguita l'analisi del profilo della tessitura (Texture Profile Analysis, TPA) mediante dinamometro;
- determinazione del pH oculare;

Riassunto

- eviscerazione e pesatura degli organi interni: sono stati separati e pesati pacchetto viscerale, fegato, grasso periviscerale, gonadi, carcassa eviscerata, i singoli filetti con pelle e lo scarto, e calcolati indice epatosomatico, indice viscerosomatico, indice grasso mesenterico, indice gonadico, resa eviscerato, resa in filetti;
- determinazione del colore del filetto in tre punti dell'area dorsale, come sopra riportato per il colore della pelle;
- determinazione del pH del filetto in tre punti dell'area dorsale;
- analisi della tessitura del filetto, mediante analisi TPA;
- analisi NIRS del filetto fresco senza pelle e dopo macinazione con spettrometro monocromatore nell'intervallo di lunghezze d'onda fra 1100 e 2500 nm;
- analisi del profilo acidico del grasso muscolare mediante gas-cromatografo, previa estrazione dei lipidi;
- analisi dell'azoto basico volatile totale (TVBN) del campione di filetto macinato fresco;
- liofilizzazione del filetto;
- analisi NIRS del filetto liofilizzato, come per i filetti macinati freschi;
- determinazione delle caratteristiche chimiche (umidità, lipidi, proteina, ceneri) e del contenuto di energia lorda sul filetto liofilizzato;
- determinazione della concentrazione di metalli pesanti del filetto e dei mangimi con ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry) previa mineralizzazione;
- determinazione della concentrazione di PCB del filetto e dei mangimi. Per le spigole raccolte del campionamento n. 1, è stata determinata la concentrazione di 12 congeneri rappresentativi della contaminazione di PCB, tra cui i 7 congeneri indicatori (28, 52, 101, 118, 138, 153 e 180). Su 18 pool di spigole e su 7 mangimi provenienti dal campionamento n. 2, i PCB sono stati misurati come concentrazione e sommatoria di tossicità equivalente (Σ TEQ) dei 12 congeneri di PCB diossina-simili.

Trattamento dei dati e analisi statistica

Obiettivo 1 - Qualità: i dati biometrici e gli indici morfometrici (campionamenti n. 2, 3 e 4) e i dati analitici (campionamenti n. 1, 2, 3 e 4) sono stati sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA) mediante procedura GLM del SAS, considerando come fattori di variazione il sistema di allevamento e la taglia degli animali.

Obiettivo 2- Contaminanti: i dati relativi al contenuto di metalli pesanti e di PCB sono stati sottoposti ad analisi della varianza, considerando come fattore di variabilità l'allevamento di origine (campionamento n 1 e 2). Per il campionamento n. 2, il peso vivo degli animali al

Riassunto

momento della macellazione è stato incluso nel modello come covariata. Inoltre, sono stati calcolati i coefficienti di correlazione e le regressioni fra peso vivo degli animali e contenuto di estratto etereo; peso vivo degli animali e contenuto di PCB (ng/g di grasso); contenuto di estratto etereo e livello di PCB (ng/g di grasso).

Obiettivo 3 - Freschezza: i dati morfometrici e analitici sono stati sottoposti ad analisi della varianza considerando come fattori di variazione la durata della conservazione (campionamenti n. 3 e 4) e l'allevamento di origine (campionamento n. 4). I risultati della valutazione sensoriale sono stati analizzati con Proc UNIVARIATE del SAS. Le variabili con distribuzione normale sono state sottoposte ad analisi della varianza con procedura GLM; quelle con distribuzione non normale ad analisi della varianza non parametrica (test di Kruskal-Wallis e Mann-Whitney) con procedura NPAR1WAY.

Obiettivo 4 - NIRS: gli spettri sono stati acquisiti come dati in riflettanza, trasformati in assorbanza e in derivata seconda (2, 20, 20). Le calibrazioni per la predizione della composizione chimica del filetto e di alcune caratteristiche della carcassa sono state calcolate con *Partial Least Square Regression* (PLSR) sui dati trasformati in derivata seconda e validate utilizzando la *full cross-validation*. La *Principal Component Analysis* (PCA) e la *Soft Independent Modelling Class Analogy* (SIMCA) sono state utilizzate per la discriminazione e classificazione dei campioni in funzione dell'origine (campionamenti n. 2 e 4) e del tempo di conservazione (campionamenti n. 3 e 4).

Risultati

Obiettivo 1 - Qualità

Il *sistema di allevamento* ha significativamente modificato le caratteristiche morfologiche, biometriche e reologiche, oltre che la composizione chimica. Nel campionamento n. 2, la resa in carcassa eviscerata è stata significativamente maggiore ($P < 0,05$) nelle spigole provenienti da allevamenti estensivi (87,7%) in valle rispetto a quelle allevate intensivamente in gabbie a mare (85,9% in media) e simile a quella delle spigole allevate intensivamente a terra (87,0%). La resa in filetti è invece risultata inferiore nelle spigole di allevamento estensivo rispetto a quelle di altri sistemi (46,1 vs. 48,5%). Infine, l'indice del grasso mesenterico è risultato minore nei soggetti allevati in gabbie piuttosto che in sistemi estensivi e intensivi a terra (2,21 vs. 3,40 e 4,24%, rispettivamente; $P < 0,05$).

Nel campionamento n. 4, le differenze fra i sistemi sono risultate accentuate. In entrambi i campionamenti, l'intensità e la saturazione delle tonalità di rosso e giallo misurate sulle spigole sono risultate più marcate nelle spigole di allevamenti estensivi, rispetto a quelle di

Riassunto

allevamenti intensivi a terra e, in maniera ancora più evidente, in quelle provenienti da allevamenti in mare ($P < 0,05$).

Ulteriori differenze sono state evidenziate nelle caratteristiche di tessitura del pesce intero (campionamento n. 4), laddove la forza massima esercitata per la prima compressione del campione è risultata significativamente maggiore per le spigole di allevamento estensivo e di gabbia e minore per quelle di allevamento intensivo a terra (29,2 e 26,7 vs. 21,8 N; $P < 0,001$) ad indicare una maggiore consistenza strutturale delle spigole dei primi due gruppi. Il pH del filetto è risultato superiore ($P = 0,02$) nelle spigole di gabbia a mare (6,42) piuttosto che di allevamento estensivo e intensivo a terra (6,29 e 6,28).

In tutti i campionamenti (n. 1, 2), i filetti di spigole di allevamento estensivo sono risultati meno grassi ($P < 0,01$) rispetto a quelli dei pesci allevati intensivamente (in vasche a terra e in gabbie a mare). Inoltre, i filetti dei pesci provenienti da allevamenti a terra sono risultati più grassi rispetto a quelli delle spigole allevate in gabbie a mare ($P < 0,05$). Come ovvio, il contenuto energetico dei filetti è aumentato all'aumentare del contenuto lipidico, mentre il contenuto di acqua è diminuito.

La *taglia* delle spigole (small e large; campionamento n. 2 riguardante 11 allevamenti sparsi nel territorio nazionale) ha modificato in modo significativo, ma limitato in valore assoluto, gli indici biometrici di profilo relativo e indice craniale. Le spigole più pesanti hanno evidenziato un fattore di condizione superiore e una maggiore incidenza degli scarti all'eviscerazione (indice epatosomatico) ($P < 0,001$), seppure in assenza di differenze nelle rese in carcassa ($P > 0,05$). La resa in filetti è stata superiore nei pesci di taglia maggiore (48,2 vs. 47,2%; $P = 0,05$). La classe di taglia non ha influenzato gli indici di colore della livrea fatta eccezione per i valori di L^* in posizione dorsale (42,6 vs. 39,7; $P < 0,05$), che hanno evidenziato una maggiore luminosità delle spigole di piccola taglia. La composizione chimica non è stata invece influenzata significativamente dalla taglia considerata.

Con il campionamento n. 3, che ha interessato spigole provenienti da un unico allevamento semi-intensivo, sono state ottenute anche informazioni sulla variabilità del profilo acido del grasso delle spigole. Il contenuto in acidi grassi saturi rappresenta il 26,5% del totale e il maggiore rappresentante è l'acido palmitico. Gli acidi grassi monoinsaturi rappresentano il 34,5% del totale, rappresentati per il 50% dall'ac. oleico. Il contenuto in acidi grassi polinsaturi (PUFA) è risultato in media del 34,4%, equamente ripartito fra le serie ω -3 (17,3%) e ω -6 (15,8%). Per la serie ω -6 è risultato predominante l'acido alfa-linoleico, mentre per la serie ω -3 sono risultati predominanti gli acidi eicosapentaenoico e docosaenoico.

Riassunto

Obiettivo 2 - Contaminanti

Il sistema di allevamento ha significativamente influenzato la concentrazione totale dei 12 PCB più frequenti (PCB_{tot}) e dei 7 PCB indicatori (PCB_7) nelle spigole del campionamento n. 1, che è risultata minore nelle spigole di allevamento estensivo (112,0 e 74,6 ng/g grasso, rispettivamente) rispetto alle spigole degli altri sistemi di allevamento (in media 179,7 e 123,2 ng/g grasso, rispettivamente) ($P < 0,001$). Quando i valori sono stati espressi per g di muscolo fresco, le concentrazioni di PCB_{tot} e PCB_7 sono risultate inferiori nelle spigole di allevamento estensivo (3,412 e 2,266 ng/g peso fresco, rispettivamente), intermedie nei pesci degli stagni semi-intensivi (15,398 e 10,632) e delle gabbie a mare (13,123 e 8,882), e superiori nei campioni delle vasche di allevamento intensivo (18,176 e 12,440) ($P < 0,001$).

Entro allevamento, la concentrazione lipidica del filetto e il peso di macellazione sono risultati correlati positivamente ($r=0,79$). La concentrazione di PCB_7 espressa per g di grasso muscolare è risultata correlata positivamente sia con il peso di macellazione delle spigole ($r=0,71$) che con la concentrazione lipidica del filetto ($r=0,86$). La correlazione fra il peso delle spigole e la concentrazione lipidica del filetto è aumentata ($r=0,73$ e $0,96$, rispettivamente) quando la concentrazione di PCB_7 è stata espressa per g di peso fresco. La correlazione fra la concentrazione di PCB_7 sul peso fresco e il peso dei pesci è stata influenzata dal sistema di allevamento, mentre la correlazione dei PCB_7 e la concentrazione lipidica del filetto non è stata influenzata dal sistema di allevamento.

Il contenuto totale dei 12 PCB diossina-simili nei mangimi ottenuti dal campionamento n. 2 (relativi all'ultimo periodo di allevamento) è risultato maggiore negli allevamenti con gabbie in mare G1 (29,35 ng/g grasso) e G3 (15,80 ng/g grasso) seguiti dagli allevamenti intensivi I1 e I3 (12,72 e 12,62 ng/g grasso rispettivamente), mentre contaminazioni inferiori sono state riscontrate nei mangimi degli altri allevamenti. Nei filetti, in funzione del sistema di allevamento, è significativamente variato ($P < 0,05$) il contenuto di PCB dei soli congeneri n. 126 e 189, laddove è proprio la variazione del congenere n. 126, molto tossico, a determinare le maggiori ricadute sulla tossicità dei prodotti. Il valore maggiore di equivalenti di tossicità (TEQ) è stato infatti misurato per il PCB n. 126 nei filetti di spigole da allevamenti estensivi (19,7 pg/g grasso; $P=0,05$) piuttosto che in quelli di pesci da sistemi intensivi (7,58 pg) o da gabbie a mare (11,0 pg). Di conseguenza, la sommatoria di equivalenti di tossicità (ΣTEQ), espressa per g di grasso, è variata significativamente ($P=0,05$) in funzione del sistema di allevamento, con il valore maggiore per i sistemi estensivi rispetto a quelli intensivi a terra e in gabbie marine (21,9 vs. 8,89 e 12,6 pg/g grasso, rispettivamente). Esprimendo i dati sul peso

Riassunto

del campione fresco, tuttavia, la Σ TEQ è variata in modo non significativo fra i sistemi di allevamento (da 0,72 a 0,83 pg/g di peso fresco).

Non sono state osservate differenze significative nella concentrazione di PCB diossina simili e nella Σ TEQ, espressi sia sul contenuto lipidico che sul peso fresco, in funzione della *taglia* degli animali campionati.

Nelle spigole provenienti dal campionamento n. 1, la concentrazione dei PCB₇ (75-131 ng/g grasso) è risultata sempre inferiore al limite (200 ng/g grasso) stabilito nel 1999 dalla legislazione dell'Unione Europea per la carne suina e avicola fresca e i prodotti derivati destinati al consumo umano. Una recente normativa (2006) sancisce invece per i pesci e i prodotti ittici un contenuto massimo accettabile di diossine e furani pari a 4,0 pg TEQ/g di peso fresco e la somma di diossine, furani e PCB diossina-simili pari a 8,0 pg TEQ/g di peso fresco. Nei filetti provenienti dal campionamento n. 2, anche il valore più elevato di concentrazione di PCB diossina-simili riscontrato in un allevamento estensivo (TEQ 45,3 pg/g grasso, corrispondenti a 0,735 pg/g peso fresco) è risultato largamente inferiore ai limiti di legge.

Per i metalli pesanti, sono state evidenziate notevoli variazioni nella presenza dei singoli elementi nei mangimi in funzione dell'allevamento considerato: la concentrazione dell'arsenico è risultata superiore negli allevamenti G1 e I2 e inferiore negli allevamenti E3, I1, I3, G3 e G4. La concentrazione degli altri metalli è risultata meno variabile tra i diversi mangimi. In nessuno dei campioni analizzati, è stato possibile rilevare presenza di mercurio, mentre zinco e rame sono risultati più abbondanti, anche in relazione alla probabile integrazione effettuata negli stessi mangimi.

Nei filetti, laddove determinabile, il mercurio è stato rilevato a livelli compresi tra 0,023 e 0,152 mg/kg s.s., con i valori maggiori negli allevamenti estensivi, sebbene a livelli nettamente inferiori ai 0,5 mg/kg peso fresco fissati dalla normativa UE. L'arsenico è stato rilevato in concentrazioni elevate (12-15 mg/kg s.s.) nei filetti di uno degli allevamenti estensivi, mentre in tutti gli altri allevamenti i valori sono risultati compresi tra 1 e 3 mg/kg s.s. e anche inferiori a 1 mg/kg s.s. La concentrazione di rame nelle spigole provenienti da allevamenti estensivi è risultata inferiore rispetto agli allevamenti intensivi a terra o in gabbia (0,82 vs. 1,03 e 1,06 mg/kg peso fresco; $P < 0,01$). La concentrazione di piombo nei filetti, seppure non diversa significativamente tra sistemi di allevamento, è risultata superiore nell'allevamento intensivo (0,13 mg/kg peso fresco). In due dei quattro allevamenti intensivi, tale concentrazione è risultata superiore (0,22 e 0,30 mg/kg peso fresco) ai suddetti limiti, fissati in 0,20 mg/kg di muscolo fresco dal Regolamento EC 466/2001 (modificato dal Reg. EC 78/2005). Anche l'arsenico è stato dosato a livelli 3-4 volte superiori nei pesci allevati con

Riassunto

sistema estensivo rispetto all'intensivo a terra e in gabbia, seppure con livelli di probabilità statistica non significativi ($P=0,12$). Nessuna differenza di concentrazione dei metalli pesanti è stata individuata in funzione della taglia del pesce.

Obiettivo 3 - Freschezza

La valutazione dell'evoluzione della freschezza e del sistema di allevamento è stata effettuata su due gruppi di spigole provenienti dal campionamento n. 3, dove è stato valutato l'effetto del *tempo di conservazione*, e dal campionamento n. 4 dove è stato valutato sia l'effetto del *tempo di conservazione* che del *sistema di allevamento*.

Con il campionamento n. 3 sono state prelevate 90 spigole provenienti da un unico allevamento semi-intensivo e conservate in gruppi di 15 esemplari per 0, 1, 2, 4, 6 e 8 giorni in cassette senza ghiaccio e in cella frigorifera a 2°C.

I rilievi biometrici e le caratteristiche della carcassa sono variate poco durante la conservazione.

Alla valutazione sensoriale, 8 giorni dopo la macellazione, le spigole presentavano ancora un grado di freschezza accettabile, anche se alcuni tratti (brillantezza, muco, durezza per l'aspetto generale; odore e muco delle branchie) hanno evidenziato una degradazione più rapida rispetto ad altri caratteri. Le caratteristiche dell'occhio sono rimaste invariate e lo scolorimento dell'addome limitato, mentre la compattezza dell'addome e l'odore della cloaca hanno presentato una degradazione intermedia. La regressione fra i punteggi QIM nel periodo da 0 a 8 giorni di conservazione è stata spiegata da un elevato coefficiente di determinazione ($R^2=0,95$), con un'evoluzione lineare (aumento con il tempo di conservazione) e quadratica (rallentamento dell'incremento di valore col tempo di conservazione).

Tra le misure reologiche di freschezza, il pH oculare è diminuito da 7,25 al giorno 0 a 7,04 al giorno 4 per aumentare a 7,48 a 8 giorni di conservazione (componenti lineare e quadratica della varianza, $P<0,001$), mentre il pH del filetto non è stato modificato. Durante la conservazione, la luminosità della livrea è aumentata linearmente all'aumentare del numero di giorni da 44,8 a 52,3, con il valore maggiore misurato dopo 2 giorni di conservazione; l'indice del rosso si è spostato da valori positivi vicini allo zero verso valori minori e tendenti al verde; la riduzione dell'indice b^* ha evidenziato una corrispondente diminuzione della colorazione gialla (da 5,63 a 2,42) con un andamento di tipo quadratico ($Q=0,02$). Per quanto attiene il colore del filetto, la luminosità è aumentata con i giorni di conservazione ($L<0,001$ e $Q<0,01$). Gli indici di colore a^* e b^* sono invece aumentati ai giorni 1 e 2 per poi diminuire significativamente dopo 6-8 giorni di conservazione ($L<0,01$; $Q<0,05$).

Riassunto

La struttura del filetto è variata significativamente: la durezza è aumentata dalla macellazione (4,86 N al giorno 0) al giorno 4 di conservazione (7,20 N) per poi diminuire ai giorni 6 e 8 ($L < 0,001$; $Q = 0,02$) seguendo l'instaurarsi e la risoluzione del *rigor mortis*. Il valore di elasticità è linearmente diminuito ($L = 0,09$), anche se i valori più bassi sono stati misurati 1 e 2 giorni dopo la macellazione ($Q < 0,01$).

In quanto alla composizione chimica, nel corso della conservazione, la concentrazione di azoto basico volatile totale è aumentata (da 15,6 a 16,5 mg/100 g; $L < 0,001$). Per quanto riguarda il profilo acidico del grasso muscolare, la concentrazione di acido palmitico è diminuita linearmente dal 17,8 al 17,1% all'aumentare del tempo di conservazione, mentre la variazione a carico dell'acido stearico, sebbene significativa, è apparsa limitata in termini assoluti per la sua bassa percentuale (inferiore allo 0,5%). Non è variata la concentrazione di acidi grassi monoinsaturi, mentre, fra gli acidi grassi polinsaturi della serie ω -6, la concentrazione di acido alfa-linoleico è risultata superiore dopo 8 giorni di conservazione. L'acido arachidonico, comunque poco rappresentato, è significativamente diminuito durante la conservazione. Fra gli acidi grassi della serie ω -3, l'acido linolenico è aumentato linearmente (da 2,04 a 2,23%), mentre EPA e, soprattutto, DHA sono significativamente diminuiti con i giorni di conservazione.

L'esame di altre 90 spigole (campionamento n. 4) provenienti da 3 allevamenti (estensivo, intensivo a terra e intensivo in gabbie marine) e conservate per 3, 6, 10, 13 e 17 giorni in cassette coperte di ghiaccio e mantenute in cella frigorifera a 2°C ha confermato l'assenza di un effetto del *tempo di conservazione* sulle misure biometriche e le rese in carcassa e filetto.

La valutazione sensoriale ha confermato l'aumento significativo del punteggio QIM e una correlazione sempre elevata (R^2 da 0,84 a 0,95 a seconda dell'allevamento considerato) con i giorni di conservazione. L'evoluzione del QIM ha però evidenziato un andamento curvilineo, con una degradazione della freschezza più rapida nei primi giorni, quindi rallentata fino a 10-13 giorni di conservazione (QIM normalizzato pari al 30-35% della perdita completa di freschezza) e infine accelerata tra 13 e 17 giorni di conservazione quando il livello di degradazione ha raggiunto il 65-70%. La perdita completa dello stato di freschezza nelle condizioni di conservazione utilizzate è stata stimata attorno a 20-21 giorni. L'andamento curvilineo del punteggio QIM va attribuito alla diversa velocità di degradazione delle diverse caratteristiche sensoriali analizzate: l'aspetto della pelle e la consistenza delle spigole già dopo 3 giorni di conservazione hanno presentato una discreta degradazione, così come le caratteristiche delle branchie (odore e colore). Al contrario, le caratteristiche dell'occhio

Riassunto

(cornea, pupilla, forma) e quelle dell'addome (colore e aspetto sfintere anale) sono risultate più stabili e peggiorate in maniera apprezzabile solo a partire dai 13 giorni di conservazione.

Durante la conservazione, la colorazione della livrea e la struttura del pesce hanno mostrato un'evoluzione simile a quanto descritto per le spigole del campionamento n. 3: la durezza misurata sul pesce intero è progressivamente diminuita dal giorno 3 di conservazione al giorno 17 (da 28,9 a 23,4 N; $P < 0,01$) seguendo la risoluzione del *rigor*. Il pH del filetto è rimasto stabile fino a 13 giorni (6,30 circa) per poi aumentare a 6,45 ($P = 0,10$) al 17° giorno.

In quanto al *sistema di allevamento*, i pesci provenienti dall'allevamento estensivo hanno evidenziato alla valutazione sensoriale una degradazione più lenta rispetto a quelli dell'allevamento intensivo e, soprattutto, delle gabbie ($P < 0,001$), mentre non sono state misurate differenze significative per le altre variabili. Nei pesci provenienti dalle gabbie, a parità di tempo di conservazione, l'aspetto della pelle, la consistenza del pesce e le caratteristiche dell'occhio sono risultati più degradati rispetto agli altri allevamenti, mentre le altre caratteristiche sensoriali sono risultate più stabili nel tempo. Le spigole di allevamento intensivo hanno ricevuto la classificazione migliore per quanto attiene la presenza di emorragie ($P < 0,10$), il che lascia supporre una diversa gestione dei pesci prima e durante la macellazione nei diversi allevamenti campionati.

Obiettivo 4 - NIRS

La predizione NIRS della *composizione chimica* dei filetti di spigola è risultata adeguata e soddisfacente sia sui campioni macinati freschi (campionamento n. 3) che liofilizzati (campionamento n. 2) con coefficienti di determinazione in validazione (R^2_v) elevati per contenuto di acqua (0,95-0,97), estratto etereo (0,96-0,98) ed energia lorda (0,94-0,95). La predizione del contenuto di proteina grezza ha evidenziato in entrambi i campionamenti un grado di correlazione ($R^2_v = 0,72-0,73$) fra dato spettrale e contenuto nel campione minore rispetto agli altri costituenti chimici, seppure buono in valore assoluto. L'errore di predizione in validazione (SECV) per i diversi costituenti chimici è risultato diverso in funzione della variabilità dei dati nel set di campioni considerato, ma sempre tale da dare un'accuratezza di predizione buona (acqua, estratto etereo, energia) o comunque accettabile (proteina grezza).

La predizione NIRS della percentuale di acidi grassi dei lipidi muscolari realizzata sugli spettri dei filetti macinati freschi (campionamento n. 3) non ha fornito risultati molto incoraggianti. Solo per poche variabili, le calibrazioni hanno prodotto un coefficiente di correlazione in calibrazione superiore a 0,50 (acido palmitico, acidi grassi saturi, acido alfa-linoleico, acido docosaenoico) e comunque con un elevato SECV.

Riassunto

Nel set di calibrazione delle spigole provenienti dal campionamento n. 2 (11 allevamenti di diversa tipologia), l'analisi NIRS è stata estesa anche alla predizione di alcune variabili legate alla morfologia dell'animale e alle caratteristiche della carcassa. La predizione NIRS del fattore di condizione è stata realizzata con successo e con un limitato errore ($R^2_{cv}=0,79$, $SECV=0,09$); quella per il peso di macellazione e la resa in filetti è risultata accettabile ($R^2_{cv}=0,48-0,55$), mentre la predizione della resa in carcassa è stata debole.

L'analisi NIRS dei filetti macinati delle spigole conservate per 8 giorni (campionamento n. 3) ha evidenziato una buona correlazione fra dati spettrali e *durata della conservazione* espressa in giorni ($R^2_{cv}=0,95$; $SECV=0,89$ giorni). Il raggruppamento dei campioni più freschi (ai giorni 0, 1 e 2) e di quelli sottoposti a una maggiore conservazione (4, 6 e 8 giorni) ha migliorato, riducendolo, l'errore di predizione (0,75 giorni). Utilizzando la SIMCA, è stata misurata una distanza fra modelli insufficiente per la discriminazione fra i campioni conservati per 1 vs. 2 giorni (2,083) e fra i campioni conservati per 4 vs. 6 giorni (2,673). Viceversa, la distanza fra il modello calcolato sui campioni freschi (al giorno 0) e gli altri campioni è aumentata progressivamente con la durata della conservazione. I campioni al giorno 0 sono stati classificati correttamente per l'87% e nessun campione è stato assegnato ad una classe errata. Nel caso dei campioni conservati per 1 o 2 giorni, solo il 43% delle spigole è stato classificato correttamente, evidenziando la difficoltà del metodo di distinguere in modo efficace fra campioni conservati per tempi vicini (1 e 2 giorni vs. 4 e 6 giorni). Nel caso dei filetti analizzati dopo 4 giorni, il 53% dei campioni è stato assegnato correttamente, mentre il 47% degli stessi è stato assegnato anche ad una delle classi adiacenti. Per il 33% dei campioni più vecchi (6-8 giorni), infine, l'assegnazione è stata corretta, mentre il 53% è stato assegnato a entrambe le classi. A un nuovo raggruppamento dei campioni in due classi, pesce fresco (giorni 0, 1 e 2) e pesce conservato più a lungo (giorni 4, 6 e 8), la distanza fra i due modelli è risultata inferiore a 3 (2,575). Tuttavia la percentuale di campioni classificati correttamente nella classe corrispondente è stata elevata e pari in media a 71% dei campioni, mentre il 18% ha ricevuto una classificazione errata.

Anche i filetti liofilizzati delle spigole provenienti dal campionamento n. 4 sono stati sottoposti ad analisi NIRS e gli spettri analizzati con PCA per valutare la *durata della conservazione* (3-17 giorni). Lo score plot della PCA non ha permesso l'identificazione di alcun cluster. Pertanto, anche l'analisi SIMCA non ha prodotto modelli utili per la classificazione dei campioni. La scarsa variabilità degli spettri NIRS delle spigole di questo campionamento, rispetto al precedente, in funzione dei giorni di conservazione potrebbe essere spiegata con le seguenti argomentazioni: il pesce intero stoccato in ghiaccio (campionamento

Riassunto

n. 4) è stato conservato meglio rispetto al pesce in cassetta all'aria (campionamento n. 3) e ha manifestato una minore degradazione chimica; la liofilizzazione del campione sottoposto ad analisi NIRS potrebbe aver uniformato le caratteristiche strutturali e chimiche del campione e quindi ridotto le informazioni contenute nello spettro NIR; le prime analisi di freschezza sono state realizzate dopo 3 giorni di conservazione, laddove, sulla base dei risultati ottenuti sugli spettri delle spigole provenienti dal campionamento n. 3, le migliori discriminazioni erano state fatte rispetto ai campioni freschi e appena pescati (giorno 0).

L'analisi NIRS è stata utilizzata con un discreto successo anche per la discriminazione dei campioni in funzione del *sistema di allevamento*. La PCA sugli spettri delle spigole sia macinate fresche che liofilizzate (campionamento n. 4) ha evidenziato il raggruppamento dei campioni in funzione del sistema di allevamento con una separazione delle spigole di allevamento intensivo (I) rispetto a quelle di allevamento estensivo, mentre gli spettri delle spigole pescate da gabbie (G) hanno mostrato una distribuzione più dispersa e sovrapposta al gruppo estensivo (E). L'analisi PCA degli spettri dei filetti liofilizzati delle spigole del campionamento n. 2 ha invece evidenziato la separazione delle spigole allevate con sistemi estensivi (E) rispetto a quelle provenienti da sistemi intensivi (I e G). Inoltre, la distanza misurata nell'analisi SIMCA fra i modelli PCA relativi alle spigole di sistema estensivo rispetto a quelli di sistemi intensivi e gabbie a mare è risultata sempre superiore a 3 (17,3 e 12,9, rispettivamente), evidenziando così la buona capacità di classificazione dell'analisi NIRS. La distanza dei modelli per le spigole di allevamento intensivo e quelle provenienti da gabbie a mare (2,3) non è invece risultata sufficiente per un'adeguata separazione dei campioni. Nel loro insieme, le spigole sono state correttamente attribuite al relativo cluster (sistema di allevamento) nel 60% dei casi, mentre il 13% è stato attribuito a 2 cluster e il 21% non è stato assegnato a nessun cluster. Solo il 6% dei campioni è stato però assegnato ad una classe errata. All'interno della tipologia di allevamento, il maggior grado di precisione nell'attribuzione al cluster corrispondente ha riguardato i campioni provenienti dagli allevamenti estensivi, mentre le spigole provenienti dalle gabbie a mare sono state classificate correttamente con minor frequenza.

Conclusioni

I risultati ottenuti con le sperimentazioni oggetto di questa tesi di dottorato ribadiscono nel complesso l'eccellente valore dietetico delle spigole provenienti dagli allevamenti nazionali campionati, caratterizzato da un buon livello proteico (19%) e livelli lipidici e calorici crescenti con l'intensità produttiva (estensivo < semi-intensivo e gabbie a mare < intensivo a terra). Il

Riassunto

livello medio e il profilo acidico dei lipidi misurati nelle carni di spigola permette di classificare questa specie nella categoria dei pesci semi-grassi, con un contenuto elevato di acidi grassi polinsaturi a favorevole rapporto ω -3/ ω -6.

Con riferimento alla salute umana e alla sicurezza alimentare, le spigole di allevamenti nazionali sono risultate prodotti sicuri con una concentrazione di PCB e metalli pesanti sempre inferiore ai limiti di legge. Fra i diversi sistemi produttivi, la contaminazione finale del pesce è risultata più dipendente dalla contaminazione ambientale piuttosto che dalla contaminazione dei mangimi eventualmente somministrati.

Lo studio dell'evoluzione del grado di freschezza della spigola ha evidenziato una buona resistenza della specie alla degradazione, qualora manipolata con cura e conservata in ghiaccio, e ritmi di degradazione più lenti nel caso di spigole derivate dall'allevamento estensivo.

Per tutti questi aspetti qualitativi, è stato evidenziato un ruolo importante del sistema di allevamento piuttosto che della taglia, rinforzando la necessità di una caratterizzazione qualitativa e dello sviluppo di indici, criteri e tecniche analitiche innovative e rapide quale quella NIRS utili allo sviluppo di sistemi di tracciabilità, certificazione e identificazione di origine, strumenti questi indispensabili per orientare le scelte di consumo e incontrare le preferenze del consumatore, al fine di accrescere la competitività del settore sui mercati nazionali e internazionali.

Summary

Summary

Qualitative characterization, freshness evolution and identification of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) from different rearing systems

This PhD thesis is divided into four main sections: introduction, objectives, material and methods, results and discussion and is concluded by general considerations and reference list.

Introduction

In this section, world and national statistics on wild captures and cultivated fish production are reported, with detailed information on European sea bass production in the Mediterranean basin. Morphological traits and ecological needs of sea bass are described, as well as the equipments and techniques for artificial reproduction and fattening. The second part of the work is dedicated to outline the state of art on the specific items that have been investigated here, that are the characterization of biometric traits, chemical composition and dietetic value of fish and sea bass, the food safety, with the problem of PCB and heavy metal contamination, the assessment of freshness evolution and, lastly, the possible utilization of NIR spectroscopy for the characterization and origin identification of fish and fish product.

European sea bass, together with sea bream, is the main fish species reared in Italy after trout. The great competition existing among producing Countries of the Mediterranean area (especially Turkey, Greece, Spain, Croatia) and the relative consequences on market prices require the national product to be characterized for quality and food safety at origin.

Even if with some differences among Countries, European consumers give increasing attention to food safety and are especially worried about the possible presence of inorganic and organic persistent pollutants in fish products. On one hand wild and cultivated fish have recognized higher nutritional quality in comparison with terrestrial animals, thanks to the high concentration in poly-unsaturated fatty acids of the ω -3 series, on the other hand fish products are more sensible to accumulate contaminants which concentrate along the natural trophic chain or may be present in commercial feeds. The control of heavy metals and polychlorinated biphenyl (PCB) concentration has a key role, because these pollutants are concentrated in the meat of carnivorous animals at the top of the trophic chain and their presence, even if still debated, is associated to various metabolic, hormonal and reproductive diseases as well as the occurrence of cancers.

Summary

In *post-mortem*, fish product quality is strictly correlated to the degree of freshness and storage condition. These characteristics may be evaluated by different means based on analytical determination of degradation metabolites, as well as on sensory methods based on standard EU methods (Reg. EC 2406/96) or more recently-developed schemes adapted to the different species and product category (Quality Index Method, QIM).

Among innovative methodologies, Near Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS) may be successfully used for a full evaluation of fresh and stored fish products. Largely used to evaluate nutritional characteristics of livestock feedstuffs, characterize and identify the origin, and detect adulterations in a wide range of products, NIRS analysis has been successfully apply also to fish products to predict flesh composition of various species, besides identify their origin and evaluate their freshness.

Objectives

With the main aim of contributing to reinforce programs for global quality, food safety and sea bass promotion by means of a wide study about biometric, chemical, dietetic, sensorial and toxicological traits of fish of various commercial sizes and coming from farms with different productive systems as well as geographic locations along Italy, the present thesis developed the following specific objectives:

Objective 1 - QUALITY. Characterization of morphological, chemical and nutritional traits of sea bass coming from Italian farms with different rearing systems.

Objective 2 - POLLUTANTS. Determination of the presence and concentration of persistent environmental pollutants (PCB and heavy metals) in sea bass from Italian farms with different rearing systems.

Objective 3 - FRESHNESS. Evaluation of freshness change in reared sea bass as affected by storage duration and productive system.

Objective 4 - NIRS. Using NIRS analysis to characterize chemical and nutritional composition, to evaluate freshness and identify the origin of sea bass from different rearing systems.

Summary

Material and Methods

Sampling

Four groups of sea bass were caught and analysed at different moments:

Sampling no. 1: 133 sea bass from four farms with different rearing system (extensive valley, semi-intensive ponds, intensive tanks, intensive sea cages).

Sampling no. 2: 170 sea bass of two commercial sizes (400-600 g and 700-1000 g) coming from 11 Italian farms and belonging to three rearing systems (extensive valley, intensive tanks, intensive sea cages). Where used and when possible, the commercial diet fed to sea bass during the last period of growth before caught was sampled.

Sampling no. 3: 90 sea bass taken in a different moment from the same semi-intensive farm used for the sampling no. 1.

Sampling no. 4: 90 sea bass from three farms with different rearing systems (extensive valley, intensive tanks, intensive sea cages) and already used for sampling no. 1 and 2.

Sample preparation and analyses

After caught and sacrificed in water and ice, sea bass were submitted to the following preparation and analyses:

- sensorial evaluation of freshness by the standard EU scheme (Reg. EC 2406/96) and two QIM (Quality Index Method) schemes;
- biometries and morphometric indexes: total length, standard length, maximum height and head length were measured and used to calculate the condition factor, relative profile, and cranial index;
- skin colour ($L^*a^*b^*$) at 3 dorsal and 2 ventral points by spectrophotometer;
- texture profile analysis (TPA) of the whole fish by dynamometer;
- eye pH;
- gut and internal organs were removed and weighed: gut, liver, perivisceral fat, gonads; fillets with skin were separated from eviscerated carcass and weighed; hepatosomatic index, viscerosomatic index, mesenteric fat index, gonadic index, carcass and fillet percentages were calculated;
- fillet colour ($L^*a^*b^*$) at 3 dorsal and 2 ventral points by spectrophotometer
- fillet pH at three dorsal points;
- fillet texture profile analysis (TPA);

Summary

- NIRS analysis of fresh minced fillet without skin by monochromator spectrometer within 1100 and 2500 nm wavelengths;
- lipid extraction and fatty acid profile of muscular fat by gas-chromatography;
- total volatile basic nitrogen (TVBN) in fresh minced fillet;
- freeze-drying of fillets;
- NIRS analysis of freeze-dried fillets as for fresh fillets;
- chemical characteristics (water, ether extract, protein, ash) and energy content of freeze-dried fillets;
- heavy metals concentration in fillets and diets by ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry) after sample mineralization;
- PCB concentration in fillets and diets. For sea bass of sampling no. 1, 12 congeners were determined representative of PCB contamination, among which the 7 indicator congeners (28, 52, 101, 118, 138, 153 e 180). On 18 pool of fillets and 7 diets of sampling no. 2, PCB were measured as concentration and sum of equivalent toxicity (Σ TEQ) of the 12 dioxin-like PCB congeners.

Data treatment and statistical analyses

Objective 1 - Quality. Biometric data and morphometric indexes (samplings no. 2, 3, and 4) and analytical data (samplings no. 1, 2, 3, and 4) were submitted to analysis of variance (ANOVA) by GLM procedure (SAS), considering as main variability factors the rearing system and fish size.

Objective 2 - Pollutants. Data of heavy metals and PCB concentrations were submitted to analysis of variance considering the rearing system as main factor (samplings no. 1 and 2). For data of sampling no. 2, fish live weight at slaughter was included as covariate in the model. Besides, correlation coefficients and regressions were calculated between fish live weight and ether extract concentration; fish live weight and PCB concentration (ng/g fat); ether extract and PCB concentration (ng/g fat).

Objective 3 - Freshness. Morphometric and analytical data were submitted to analysis of variance with storage time (samplings no. 3 and 4) and rearing system (sampling no. 4) as main factors. The results of sensory evaluation were analyzed by Proc UNIVARIATE (SAS). Data with normal distribution were submitted to Proc. GLM; data with non-normal distribution were analysed by non-parametric analysis of variance (Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests) with Proc. NPAR1WAY.

Summary

Objective 4 - NIRS. Spectra were taken in reflectance, transformed in absorbance and derivatized (2, 20, 20). Calibrations to predict the chemical composition of fillets and some carcass characteristics were calculated by Partial Least Square Regression (PLSR) on derivatized spectra and validated by full cross-validation. Principal Component Analysis (PCA) and Soft Independent Modelling Class Analogy (SIMCA) were used to discriminate and classify samples according to origin (samplings no. 2 and 4) and storage time (samplings no. 3 and 4).

Results

Objective 1 - Quality

The *rearing system* significantly affected morphologic, biometric and reologic traits, besides chemical composition of sea bass. In fish of sampling no. 2, the carcass percentage was significantly higher ($P<0.05$) in sea bass from extensive systems (87.7%) in comparison with those reared intensively in sea cages (85.9%) and similar to that of sea bass reared intensively in concrete tanks (87.0%). Fillet percentage was lower in extensively-reared sea bass compared to fish of the other systems (46.1 vs. 48.5%). The index of mesenteric fat was lower in sea bass reared in sea cages in comparison with those from extensive valleys or land intensive systems (2.21 vs. 3.40 and 4.24%; $P<0.05$). In sampling no. 4, differences among rearing systems were even accentuated. In both samplings, the intensity and saturation of red and yellow colour indexes were greater in sea bass from extensive rather than from land intensive system and, even more, than in those from sea cages ($P<0.05$).

Further differences were evidenced in the TPA of whole fish (sampling no. 4), with the maximum force for the first compression significantly higher in sea bass from extensive and sea cages systems compared to those from land intensive systems (29.2 and 26.7 vs. 21.8 N; $P<0.001$). Fillet pH was higher ($P=0.02$) in fish from sea cages (6.42) than in those from extensive or land intensive systems (6.28 and 6.29).

In all samplings (no. 1, 2), fillets from extensive farms had less muscular fat ($P<0.01$) compared to intensively-reared sea bass (in tanks, ponds or sea cages). Moreover, fillets from fish coming from intensive tanks were fatter than those from sea cages ($P<0.05$). Energy content of fillets increased with fat content, while water concentration decreased.

The *size* of sea bass (small and large; sampling no. 2 on 11 farms distributed along Italy) affected significantly biometric traits, relative profile and cranial index, but to a limited extent in absolute value. Heavier sea bass showed higher condition factor and higher incidence of losses at evisceration (hepatosomatic index) ($P<0.001$), even if carcass percentage did not

Summary

change ($P>0.05$). The percentage of fillets was higher in large than in small fish (48.2 vs. 47.2%; $P=0.05$). The size of sea bass did not affect the skin colour indexes except for L^* values in the dorsal side of fish, showing higher brightness in sea bass of small size (42.6 vs. 39.7; $P<0.05$). Fillet chemical composition was not significantly affected by the commercial size of sea bass.

Sampling no. 3, with sea bass from only one farm with semi-intensive system, was used to obtain information on acidic profile of muscular fat. Saturated fatty acids were 26.5% of total fatty acids, with palmitic acid as the most represented. Monounsaturated fatty acids were 34.5%, with oleic acids reaching 50% of them. The content of polyunsaturated fatty acids (PUFA) was 34.4% on average, with a light prevalence of ω -3 PUFA (17.3%) on ω -6 PUFA (15.8%) series. Within ω -6 PUFA, the main acids was alpha-linoleic; within ω -3 PUFA, eicosapentaenoic and docosaenoic acids were the most abundant.

Objective 2 - Pollutants

In sea bass of sampling no. 1, the *rearing system* significantly affected the total concentration of the 12 most abundant PCB (PCB_{tot}) and the 7 PCB indicators (PCB_7), which were less concentrated in extensively-reared sea bass (112.0 and 74.6 ng/g fat, respectively) in comparison with sea bass from the other rearing systems (on average 179.7 and 123.2 ng/g fat, respectively) ($P<0.001$). When concentrations were given on fresh muscle weight instead of on fat weight, PCB_{tot} and PCB_7 levels were lower in extensively-reared sea bass (3,412 and 2,266 ng/g fresh weight, respectively), intermediate in sea bass from semi-intensive ponds (15,398 and 10,632) and from sea cages (13,123 and 8,882), and higher in intensively-reared sea bass (18,176 and 12,440) ($P<0.001$).

Within rearing system, ether extract concentration of the fillet and slaughter live weight were positively correlated ($r=0.79$). PCB_7 concentration expressed on g fat was positively correlated with both sea bass slaughter weight ($r=0.71$) and fillet fat concentration ($r=0.86$). The correlation between fish slaughter weight and fillet fat concentration increased ($r=0.73$ and 0.96, respectively) when PCB_7 was given on fresh weight basis. The correlation degree between PCB_7 concentration on fresh weight and sea bass slaughter weight was affected by the rearing system, while the correlation between PCB_7 and fat concentrations in fillets was not.

The total content of the 12 dioxin-like PCB in diets obtained in the frame of sampling no. 2 (and fed to sea bass during the last period of growth) was higher in sea-cage farms G1 (29.35 ng/g fat) and G3 (15.80 ng/g fat) followed by the intensive farms I1 and I3 (12.72 and 12.62 ng/g fat, respectively), while very low contaminations were found in diets of the other farms.

Summary

In fillets, depending on the rearing systems, only concentrations of PCB congeners no. 126 and 189 significantly changed, but the variations in PCB no. 126, low concentrated but very toxic, determine the major changes in fish toxicity equivalent (TEQ). The highest value of TEQ was in fact measured for PCB no. 126 in fillets of sea bass from extensive systems (19.7 pg/g fat; $P=0.05$) rather than in those from intensive systems (7.6 pg) or sea cages (11.0 pg). As a consequence, the sums of toxicity equivalents (Σ TEQ), expressed in g fat, significantly changed ($P=0.05$) according to the rearing system with the highest values in extensive farms compared to land or sea cage intensive systems (21.9 vs. 8.89 and 12.6 pg/g fat, respectively). When expressing data on fresh weight basis, however, Σ TEQ was not significantly different among rearing systems (from 0.72 to 0.83 pg/g fillet).

The *size* of fish did not affect dioxin-like PCB concentrations and Σ TEQ, both when expressed on fat and on fresh weight.

In sea bass of sampling no. 1, PCB₇ concentration (75-131 ng/g fat) was always lower to the limit (200 ng/g fat) established in 1999 by the European Union Regulations for swine and poultry meat and derived products for human consumption. On 2006, the European legislation established for fish and fish products a maximum concentration of dioxins and furans equal to 4.0 pg TEQ/g fresh weight and the sum of dioxins, furans and dioxin-like PCB equal to 8.0 pg TEQ/g fresh weight. In fillets coming from sampling no. 2, also the highest dioxin-like PCB concentration found in an extensive farm (TEQ 45.3 pg/g fat equal to 0.735 pg/g fresh weight) was largely below law limits.

As what concerns heavy metals, great differences were found in the metal concentrations in the feed sampled in the different farms: arsenic concentration was higher in farms G1 and I2 and lower in farms E3, I1, I3, G3 and G4. The concentration of the other metals was less variable among diets. None of the analysed samples contained mercury at a detectable level, while zinc and copper concentrations were rather abundant, likely because of the commercial diet supplementation.

Rearing system significantly affected heavy metal concentration in flesh. When detectable, mercury concentration ranged from 0.023 to 0.152 mg/kg DM, with the highest values in extensively-reared sea bass, but always lower than the 0.5 mg/kg fresh weight established by the EU rules. Arsenic was found at high concentrations (12-15 mg/kg DM) in one of the extensive farms, while ranged from 1 to 3 mg/kg DM in most cases, and was even below 1 mg/kg DM in some farms. Copper concentration of extensively reared sea bass was lower than in fish from land and sea cage intensive systems (0.82 vs. 1.03 and 1.06 mg/kg fresh weight; $P<0.01$). Fillet lead concentration, even if not statistically different, was higher in sea

Summary

bass from intensive systems (0.13 mg/kg fresh weight). In two out of the four intensive farms, this value (0.22 and 0.30 mg/kg fresh weight) was higher than the law limits, that is 0.20 mg/kg fresh weight. Also arsenic concentration was 3-4 fold higher in extensively-reared sea bass than in sea bass from land or sea cages intensive systems, even if with a low statistical significance ($P=0.12$). The *size* of fish did not affect heavy metal concentrations.

Objective 3 - Freshness

Freshness evolution was evaluated on sea bass of sampling no. 3, for which the effect of *storage time* was considered, and on Set n. 4 for which the effects of both *storage time* and *rearing systems* were evaluated.

The sampling no. 3 consisted of 90 sea bass coming from a semi-intensive farm and stored in groups of 15 specimens during 0, 1, 2, 4, 6 and 8 days in boxes without ice and in a refrigerated room at 2°C.

During storage, biometric and carcass traits little varied. At the sensorial evaluation, 8 days after slaughter, sea bass showed a still acceptable degree of freshness, even if some traits (shining, mucus presence, hardness for general aspect; gill odour and mucus) degraded quickly in comparison with other traits. Eye characteristics did not change and the loss of colour at abdomen was limited, while abdomen consistency and the odour of cloacae impaired to an intermediate degree. The regression between QIM scores from 0 to 8 days of storage was explained by a high coefficient of determination ($R^2=0.95$), with a linear (increase with the time of storage) and quadratic evolution (reduction of the increase in value with the days of storage).

Among rheological measurements, eye pH decreased from 7.25 at day 0 to 7.04 at day 4 to increase again at 7.48 after 8 days of storage (linear and quadratic component of variance, $P<0.001$), while fillet pH did not change. During storage, skin lightness linearly increased with days from 44.8 to 52.3, with the highest value after 2 days of storage; the red index moved from positive values around zero to minimum values tending to green; the reduction of b^* index evidenced a corresponding reduction of yellow component (from 5.63 to 2.42) with a quadratic trend ($Q=0.02$). As what concerns fillet colour, lightness increased with storage length ($L<0.001$ and $Q<0.01$). The indexes a^* and b^* increased on day 1 and 2 and then decreased after 6-8 days of storage ($L<0.01$; $Q<0.05$).

Fillet texture significantly changed: hardness increased from slaughter (4.86 N on day 0) to day 4 of storage (7.20 N), then decreased on days 6 and 8 ($L<0.001$; $Q=0.02$) according to

Summary

the onset and resolution of *rigor mortis*. The value of elasticity linearly decreased ($L=0.09$), even if the lowest values were measured 1 and 2 days after slaughter ($Q<0.01$).

As what regards the chemical composition, during storage, the total volatile basic nitrogen concentration increased (from 15.6 to 16.5 mg/100 g; $L<0.001$). When considering the fatty acid profile of sea bass fillet fat, the concentration of palmitic acid decreased linearly from 17.8 to 17.1% with increasing days of storage, while changes in stearic acid were limited in absolute value even if significant at a statistical level. The concentration of mono-unsaturated fatty acids did not change, while, among ω -6 polyunsaturated fatty acids (PUFA), the concentration of alpha-linoleic acid was higher after 8 days of storage. Arachidonic acid, present in small amounts, significantly decreased its concentration during storage. Among ω -3 PUFA, linolenic acid linearly increased (from 2.04 to 2.23%), while eicosapentaenoic and, especially, docosahexaenoic acids significantly diminished with the days of storage.

The analyses of further 90 sea bass (sampling no. 4) from three farms with different rearing systems (extensive, land intensive and intensive sea cages) and stored for 3, 6, 10, 13 and 17 days in boxes covered with ice and kept in a refrigerated room at 2°C confirmed the absence of an effect of the *storage time* on biometric traits and carcass and fillet percentages.

The sensorial evaluation confirmed a significant increase of QIM scores and a high correlation (R^2 from 0.84 to 0.95 depending on the farm considered) with the days of storage. The QIM evolution, however, evidenced a curvilinear trend, with a quick freshness degradation during the first days, which was slow until 10-13 days of storage (normalized QIM corresponding to 30-35% of the total loss of freshness) and, at last, fast between 13 and 17 days of storage, when freshness impairment reached 65-70%. The complete loss freshness in the storage conditions used in the present trial was estimated to occur around 20-21 days. The curvilinear trend of QIM score has to be attributed to the different speed of degradation of the different sensorial traits analysed: skin aspect and sea bass consistency impaired quickly after 3 days of storage, as well as gills traits (odour and colour). On the contrary, eye (cornea, pupil, shape) and abdomen traits (colour and appearance of the cloaca) were rather stable and impaired to an appreciable extent only after 13 days of storage.

During storage, skin colour and sea bass texture changed as described for fish of sampling no. 3: hardness of the whole fish progressively diminished from 3 to 17 days of storage (from 28.9 to 23.4 N; $P<0.01$) according to *rigor* resolution. Fillet pH was stable until 13 days (about 6.30) and then increased to 6.45 ($P=0.10$) on day 17.

As what concerns the *rearing system*, fish coming from extensive systems showed a slower impairment of freshness at the sensorial evaluation compared to intensively-reared sea

Summary

bass and, especially, specimens from sea cages ($P < 0.001$), while other variables did not change. In fish from sea-cages, within day of storage, skin appearance, fish consistency and eye traits were less “fresh” in comparison with fish from the other rearing systems. On the other hand, sea bass from intensive systems were also scored better for haemorrhages occurrence ($P < 0.10$), that is there were likely some differences in sea bass management before and during slaughter in the different farms.

Objective 4 - NIRS

NIRS prediction of sea bass *chemical composition* was suitable and satisfying on both fresh minced (sampling no. 3) and freeze-dried fillets (sampling no. 2) with determination coefficients in validation (R^2_v) that were high for water (0.95-0.97), ether extract (0.96-0.98) and gross energy (0.94-0.95). The prediction of crude protein on both samplings gave a lower correlation degree between spectral data and fillet composition ($R^2_v = 0.72-0.73$) compared to the other chemical constituents, even if good in absolute value. The validation error (SECV) for the various chemicals varied with the range of variability in the sample set, but always gave a good (water, ether extract, energy) or acceptable (crude protein) accuracy of prediction.

NIRS prediction of fatty acid concentration in sea bass muscles on fresh minced fillets (sampling no. 3) was not encouraging. Only for few variables, the correlation coefficient in calibration was higher than 0.50 (palmitic acid, saturated fatty acids, alpha-linoleic acid, docosaenoic acid) and always with a too high SECV.

In the calibration set of sea bass of sampling no. 2 (11 farms with different rearing systems), NIRS analysis was used also for predicting some variables linked to the animal morphology as well as some carcass traits. NIRS prediction of the condition factor was successful and with a limited error ($R^2_{cv} = 0.79$, SECV = 0.09); calibrations for slaughter weight and fillet percentages were acceptable ($R^2_{cv} = 0.48-0.55$), while the prediction of carcass percentage was weak.

NIRS analysis of fresh minced fillets of sea bass stored along 8 days (sampling no. 3) showed a good correlation between spectral data and *storage duration* expressed in days ($R^2_{cv} = 0.95$; SECV = 0.89 days). Grouping the most fresh samples (at days 0, 1 and 2) with those stored for some time (4, 6 and 8 days) improved the error of prediction, by reducing it to 0.75 days. The model-to-model distance in SIMCA was insufficient to classify fillets stored for 1 and 2 days (2.083) or for 4 and 6 days (2.673). On the contrary, the distance between the model calculated on fresh samples (on day 0) and the other samples increased progressively with the duration of storage. The 87% of fresh samples (day 0) was correctly assigned to the

Summary

corresponding class, while no sample was attributed to a wrong class. Only 43% of sea bass stored for 1 and 2 days was correctly assigned, showing the difficulty of distinguishing among samples with very similar conservation (1 and 2 days vs. 4 and 6 days). For fillets analysed after 4 days, 53% of them was successfully assigned, while the remaining 47% was also attributed to one of the close classes of storage. At last, only 33% of long-stored samples (6-8 days) was assigned correctly, while 53% was given to two classes. When grouping again fillets into to further classes, fresh fish (days 0, 1 and 2) and stored fish (days 4, 6 and 8), the distance between the two model was less than 3 (2.575). However the percentage of correctly-classified samples was rather high and equal to 71% of samples, while 18% of them was attributed erroneously.

Also freeze-dried fillets of sea bass belonging to the sampling no. 4 were analysed at NIRS and their spectra submitted to PCA to evaluate the *storage duration* (3-17 days). The score plot of PCA did not permit to find any cluster. Therefore, also SIMCA did not give models to be used for sample classification. The limited variability of NIRS spectra in this last sampling, compared to the previous, according to the days of storage could be explained by different reasons: whole fish stored in ice (sampling no. 4) maintained better its freshness compared to a storage at air (sampling no. 3) and showed a minor chemical degradation; freeze-drying of samples submitted to NIRS analysis could have standardized texture and chemical characteristics of samples and therefore reduced information contained in the NIR spectra; first NIRS analysis were made only after 3 days of storage, whereas basing on results obtained on sea bass spectra of sampling no. 3, the best discriminations were made between just caught fresh samples (day 0) and other fishes.

Results by NIRS were quite satisfactory also for differentiating samples according to the *rearing system*. PCA on both fresh minced and freeze-dried fillets (sampling no. 4) showed clusters of samples according to the rearing system with a clear separation of intensively-reared sea bass (I) from those of extensive systems, while spectra of sea bass from sea cages (G) were more distributed and sometimes overlapping the extensive cluster (E). Differently, PCA analysis of spectra from sampling no. 2 separated extensively-reared sea bass (E) from those of intensive systems (I and G). Moreover, model to model distance in SIMCA was always higher than 3 for extensively-reared sea bass in comparison with sea bass from intensive systems or sea cages -(17.3 and 12.9, respectively). The distance between the model of intensively-reared sea bass and sea bass from sea cages (2.3) was not sufficient for a suitable classification and separation. On the whole, 60% of sea bass was correctly assigned to the corresponding cluster (rearing system), 13% of them was attributed to two clusters and 21% of spectra was not

Summary

assigned at all. Only 6% of spectra was attributed to a wrong class. Within rearing system, the major power of classification was measured for extensively-reared sea bass, while the lowest result was obtained with sea bass from sea cages.

Conclusions

The results obtained in the frame of the present PhD thesis confirm the high nutritional value of sea bass coming from national farms, which show a good protein level (19%) and fat and energy levels which raise with the intensity of rearing techniques (extensive < semi-intensive and sea cages < intensive on land). The average value and the fatty acid profile of fat contained in sea bass fillets put this species among medium-fat fish, with a high PUFA concentration and a favourable ω -3 to ω -6 ratio.

With regards to human health and food safety, sea bass of national farms were safe with a concentration in PCB and heavy metals always lower than law limits. Among the different productive systems, the final fish contamination depended more on environmental pollution than on contamination of commercial diets, when administered.

The study of the freshness evolution in sea bass showed a good resistance to degradation, when manipulated with attention and stored with ice, as well as a slower freshness impairment in sea bass from extensive systems compared to those from the other production systems.

Because of all these qualitative traits, a key role of the rearing system, rather than of the animal size, was evidenced, sustaining the need of a qualitative characterization and the development of indexes, criteria and innovative and quick analytical techniques, like NIRS, to develop systems of traceability, certification and identification of origin, which are indispensable to guide the consumer's choices and meet his preference, with the final aim of increasing the competitiveness of the this sector at national and international markets.

1. Introduzione

1. Introduzione

1.1. Le dimensioni del settore dell'acquacoltura

L'acquacoltura è un settore molto vario, che comprende l'allevamento non soltanto di pesci di mare o d'acqua dolce, ma anche di molluschi e di crostacei, prodotti in vari tipi e secondo diversi metodi di allevamento: aperti o chiusi, estensivi o intensivi, a terra, nei laghi, nei bacini (alimentati da fiumi o da acque sotterranee), nelle acque litoranee o al largo delle coste. Anche se all'inizio si trattava di un'attività artigianale, alcuni rami del settore hanno attualmente tutte le caratteristiche di un'industria di punta. Sebbene il settore resti ancora in larga misura strutturato in piccole e medie imprese, alcune grandi imprese integrano ormai le principali fasi della filiera (riproduzione e ingrasso dei pesci, alimentazione, trasformazione, commercializzazione).

L'acquacoltura è un settore in espansione essendo il prodotto che ne deriva considerato un alimento sano per il consumatore grazie alle sue caratteristiche chimico-nutrizionali che lo rendono appetibile nella società attuale, in cui si cerca di mantenersi in salute attraverso diete che permettano anche di ottenere una buona immagine di se stessi. L'espansione di questo settore è dovuta anche al declino della pesca, attività che diventa sempre meno conveniente a causa della forte diminuzione delle risorse ittiche selvatiche, del continuo rincaro del prezzo del carburante e della diminuzione del personale addetto alla pesca. Questi fattori hanno portato ad un forte e continuo aumento della quota di produzione di pesce derivato dall'acquacoltura che, ad oggi, fornisce a livello mondiale quasi il 40% dei pesci, dei crostacei e dei molluschi destinati al consumo umano.

1.1.1. L'acquacoltura nel mondo

Nel 2006 la produzione mondiale di prodotti ittici derivanti dalla pesca e dall'acquacoltura è stata di circa 144 milioni di t (Figura 1.1). Più di 110 milioni di t (77%) sono state destinate al consumo umano con un quantitativo teorico pro-capite di 16,7 kg che è tra i più alti mai registrati (Tabella 1.1), mentre i restanti 33 milioni di t sono stati destinati alla produzione di farine e oli di pesce.

L'acquacoltura è il settore agricolo in cui si registra la crescita più consistente a livello mondiale, con una media annuale compresa tra il 6 e l'8%. Nel 2006 la produzione mondiale raggiungeva i 52 milioni di t (esclusi i prodotti vegetali) che rappresentano il 36% del totale,

1. Introduzione

con un aumento di un terzo dall'inizio del 2000. Tale aumento è dovuto principalmente a un'enorme crescita delle produzioni in Asia e nell'America del Sud. Esclusa la Cina, l'apporto procapite ha mostrato un modesto tasso di crescita di circa lo 0,5% all'anno, a partire dal 1992.

Milioni di tonnellate

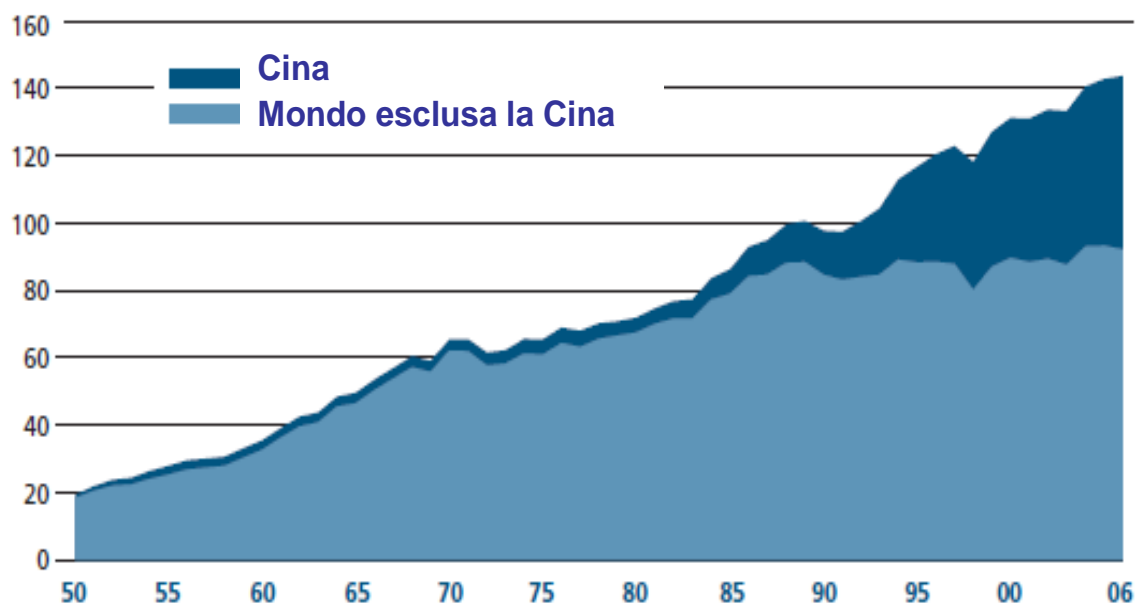


Figura 1.1. Produzione mondiale della pesca e dell'acquacoltura (FAO, 2008)

Tabella 1.1. Produzione e destinazione della pesca e dell'acquacoltura mondiale (milioni di t) (FAO, 2008)

	2002	2003	2004	2005	2006
Produzione acque interne:					
- Pesca	8,7	9,0	8,9	9,7	10,1
- Acquacoltura	24,0	25,5	27,8	29,6	31,6
Totale	32,7	34,4	36,7	39,3	41,7
Produzione acque marine:					
- Pesca	84,5	81,5	85,7	84,5	81,9
- Acquacoltura	16,4	17,2	18,1	18,9	20,1
Totale	100,9	98,7	103,8	103,4	102,0
Produzione mondiale totale:					
- Pesca	93,2	90,5	94,6	94,2	92,0
- Acquacoltura	40,4	42,7	45,9	48,5	51,7
Totale	133,6	133,2	140,5	142,7	143,6
Utilizzi:					
- Consumo umano	100,7	103,4	104,5	107,1	110,4
- Utilizzi non alimentari	32,9	29,8	36,0	35,6	33,3
- Popolazione (miliardi)	6,3	6,4	6,4	6,5	6,6
- Consumo procapite (kg)	16,0	16,3	16,2	16,4	16,7

1. Introduzione

Complessivamente, il pesce fornisce a circa 3 miliardi di persone oltre il 15% dell'assunzione media di proteine animali, passando dal 14,9% nel 1992 al 16,0% nel 1996 per poi calare al 15,3% nel 2005. I settori della pesca e dell'acquacoltura giocano entrambi un ruolo fondamentale nel sostentamento di milioni di persone in tutto il mondo. Nel 2006, 43,5 milioni di persone erano direttamente occupate, part-time o full-time, nella produzione primaria di pesce, sia nella pesca che nell'acquacoltura (FAO, 2008). L'86% degli allevatori e dei pescatori di tutto il mondo si trovano in Asia e soprattutto in Cina (8,1 milioni di pescatori e 4,5 milioni di allevatori). Nel 2006 si è stimato un numero di impiegati nel settore dell'acquacoltura nel mondo prossimo ai 9 milioni, di cui il 94% operanti in Asia.

1.1.2. *L'acquacoltura nell'Unione Europea*

Nel 2006, le circa 16.400 imprese presenti in UE, in cui lavorano quasi 64.000 addetti, hanno prodotto circa 1,3 milioni di t di pesce per un valore complessivo di circa 3 miliardi di € (Figura 1.2).

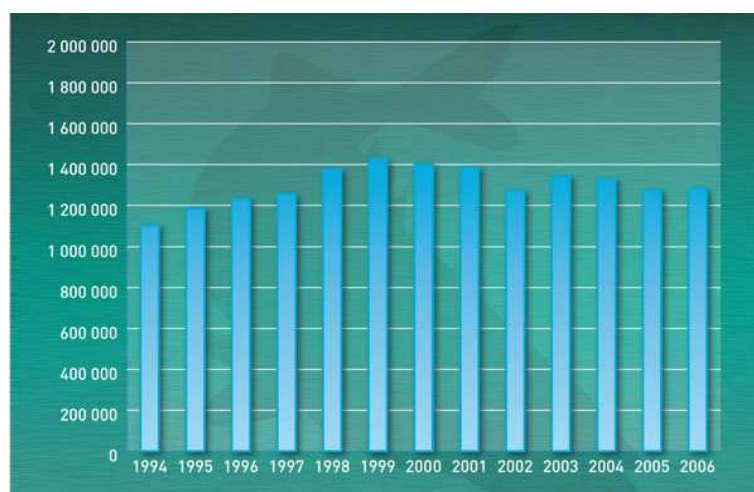


Figura 1.2. Evoluzione della produzione dell'acquacoltura in Unione Europea (UE-27, t peso vivo) (Eurostat, 2006)

I cinque principali Paesi produttori (Francia, Spagna, Italia, Regno Unito e Grecia) producono circa il 75% del valore e del volume totale, e i cinque Paesi seguenti per quantità di produzione rappresentano il 17% del totale (Figura 1.3). Questo significa che la produzione di pesce derivante dall'acquacoltura è a livelli molto bassi nei restanti 17 Stati Membri.

1. Introduzione

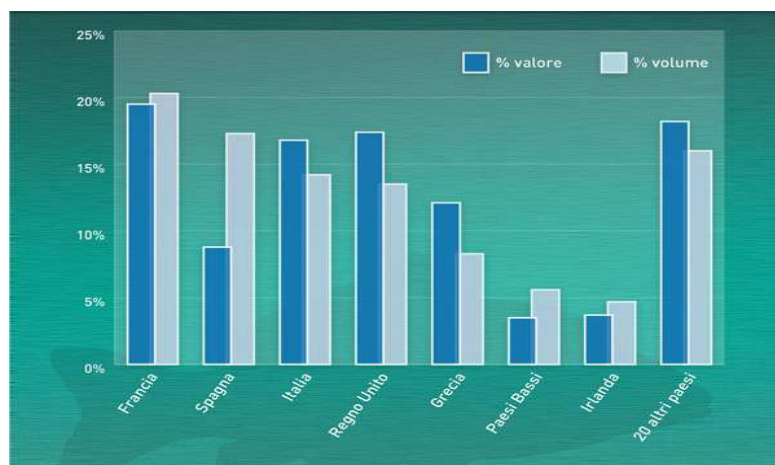


Figura 1.3. Incidenza (%) in valore e in volume della produzione dell'acquacoltura nei principali Paesi produttori dell'Unione Europea (UE-27) (Eurostat, 2005)

L'acquacoltura si concentra su un numero relativamente ristretto di specie, raggruppabili in pesci di acqua dolce, pesci di mare, crostacei e molluschi (Figura. 1.4).

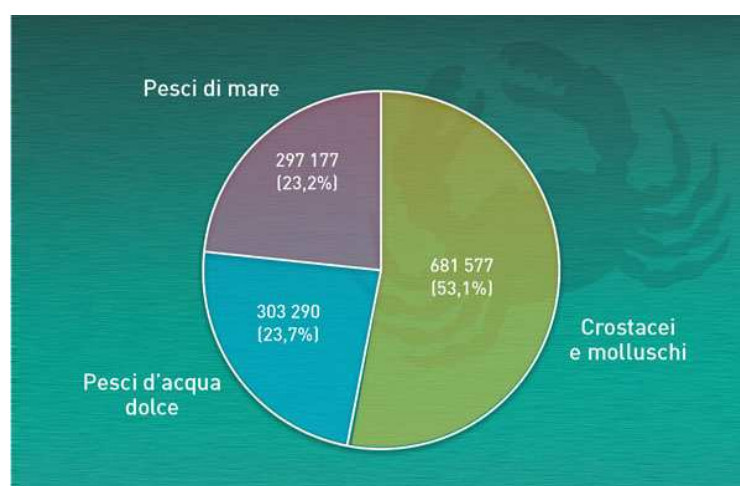


Figura 1.4. Ripartizione (%) della produzione dell'acquacoltura nei Paesi dell'UE-27 per gruppi di specie (Eurostat, 2006)

La produzione di pesci acqua dolce è lentamente scesa, passando da circa 316.000 t per un valore 803 milioni di € nel 1991 a 303.000 t e 702 milioni di € nel 2006. Ciò implica una diminuzione annua in volume dello 0,7% e in valore dello 0,9%. Tuttavia possono essere distinti due diversi periodi. Durante il primo decennio (1991-2000) il volume delle produzioni è stato relativamente stabile. Nel secondo periodo, tra il 2001 e il 2006, il valore è diminuito del 7,1% l'anno ed il volume del 3,7%.

Diversamente, il volume della produzione delle specie d'acqua salata (pesci, molluschi e crostacei) mostra una crescita del 7-8% all'anno dal 1993 al 1999, dopodiché la produzione si è stabilizzata a circa 1 milione di t per un valore di circa 2 miliardi di € con un tasso medio di

1. Introduzione

crescita del 2% annuo fino al 2006. Ne deriva che lo sviluppo complessivo dell'allevamento di pesci e molluschi nella Unione Europea è piuttosto modesto se comparato allo sviluppo globale del settore dell'acquacoltura a livello mondiale.

Attualmente, tra i pesci allevati la specie più importante in termini di quantità è la trota (16% del totale), seguita da salmone (11%), orata (6%) e spigola (4%), e da carpa (6%) (Figura 1.5). I molluschi rappresentano oltre il 50% della produzione complessiva, costituiti principalmente da cozze (37%), ostriche (10%) e vongole (circa 5%).

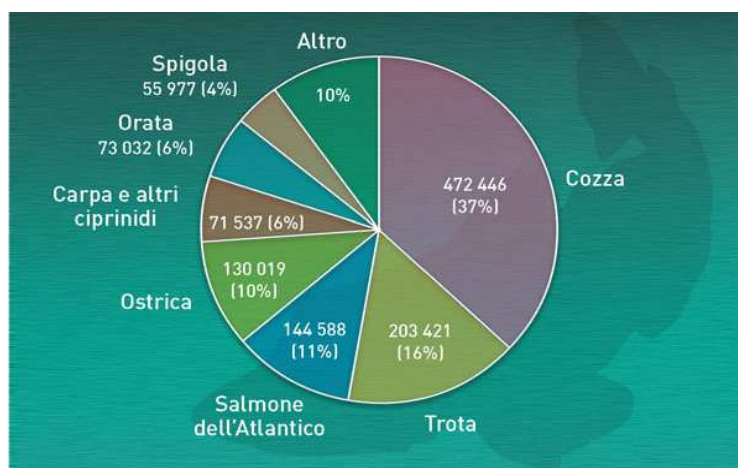


Figura 1.5. Volume di produzione (t di peso vivo) e ripartizione (%) delle principali specie allevate nei Paesi dell'UE-27 (Eurostat, 2006)

A causa del prezzo molto diversificato delle specie, che penalizza in particolare trote e mitili, il valore complessivo delle produzioni (circa 3 miliardi di €) vede in testa il salmone seguito da trota, orata e spigola, mentre tra i molluschi, il valore delle produzioni di mitili (e cozze) è simile a quello delle ostriche e appena superiore al valore delle vongole (Figura 1.6).

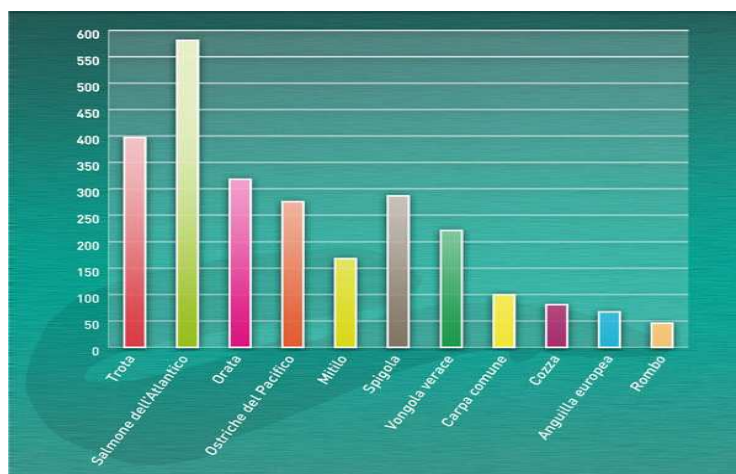


Figura 1.6. Valore (in milioni di €) delle diverse specie allevate nell'UE-27 (Eurostat, 2006)

1. Introduzione

Guardando l'andamento produttivo degli ultimi anni, le sole specie che presentano una crescita costante in valore e volumi di produzione sono la spigola e l'orata. La produzione del salmone si è sviluppata con successo tra il 1991 e il 2000, dopodiché si è stabilizzata fino ai giorni nostri. Nel 2005, la spigola e l'orata insieme sono diventate le specie di maggior valore allevate in UE. I volumi di produzione delle altre specie non mostrano nessuna tendenza evidente, salvo che per la carpa il cui allevamento sta subendo un lento declino. Il valore delle produzioni di queste specie è determinato dai prezzi di mercato che possono variare notevolmente. È quindi evidente come le performance economiche dipendano dalla situazione del mercato globale, che è determinato a sua volta da una complessità di fattori inclusi la domanda e l'offerta di una determinata specie, la disponibilità di prodotti alternativi (sostitutivi) e i tassi di cambio internazionale.

I prezzi dei molluschi sono in aumento dal 2001 circa e attualmente sono ben al di sopra del livello medio del periodo 1991-2000. D'altro canto, i prezzi di alcune specie di pesci sono diminuiti notevolmente (spigola e orata) o sono rimasti pressoché invariati (salmone e carpa).

1.1.3. L'acquacoltura in Italia

Un'indagine sull'acquacoltura italiana relativa al 2006 ha identificato 715 aziende che impiegano 7.764 persone di cui 4.747 a tempo pieno e 3.017 lavoratori stagionali (European Commission, 2009; Ismea, 2009).

Il biennio 2006-2007 è stato caratterizzato da un lieve aumento dei livelli di produzione dell'acquacoltura italiana rispetto agli anni precedenti, rappresentando ben il 48% della produzione complessiva (pesca + acquacoltura) (Figura 1.7). Nel 2007 la produzione nazionale fu di 247.000 t con un aumento rispetto al periodo precedente dovuto in particolare alla ripresa della produzione di vongole penalizzata da una grave moria del 2003 e non completamente recuperata negli anni immediatamente successivi (Tabella 1.2).

In termini di produzione lorda vendibile, si è avuto un totale di 655 milioni di €. Come risulta dal grafico (Figura 1.7), nel corso degli ultimi 10 anni si è assistito ad un rafforzamento dell'acquacoltura italiana, attribuibile al consolidamento della produzione in vasche e allo sviluppo di tecniche di allevamento di pesce off-shore (in gabbie a mare). Le voci negative sono rappresentate invece dalla diminuzione della produzione di pesci d'acqua dolce (in particolare trota) e dal calo dei prezzi delle specie eurialine.

1. Introduzione

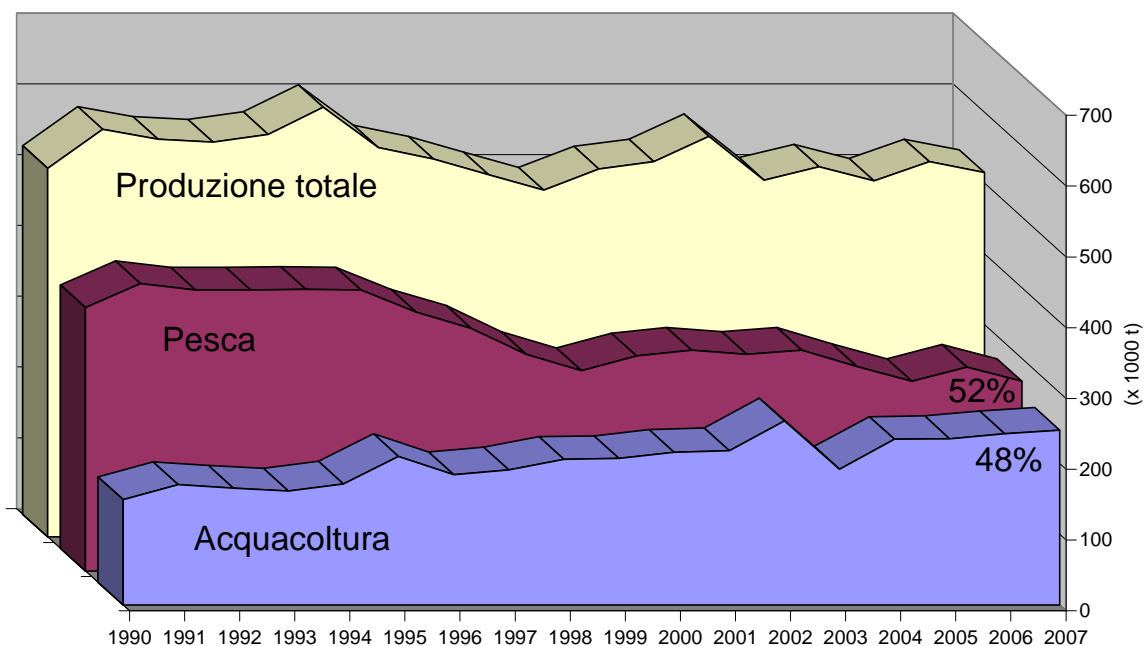


Figura 1.7. Evoluzione della produzione italiana di prodotti ittici provenienti dalla pesca e dall'acquacoltura (FAO, 2010)

Tabella 1.2. Volumi e valori delle produzioni dell'acquacoltura italiana nel 2007 (Ismea, 2009)

Specie	Quantità (t)	Valore (Milioni di €)
Pesci:	72.120	348
Trote	39.700	133
Spigole	9.900	70
Orate	9.800	64
Cefali	3.000	13
Anguille	1.700	15
Storioni	1.350	12
Altre specie	6.670	41
Molluschi:	175.000	307
Mitili	125.000	82
Vongole veraci	50.000	225
Totale	247.120	655

Per quanto riguarda la distribuzione delle produzioni, l'itticoltura apporta circa il 30% del volume, ma ben il 53% del valore. La molluschicoltura vede in prima fila la produzione di mitili (72% del volume) che rappresentano tuttavia solo il 27% del valore del settore.

L'allevamento di specie di acqua dolce, in particolare della trota, rappresenta il settore tradizionale dell'acquacoltura italiana. Questo è caratterizzato da piccole e medie imprese spesso a conduzione familiare. In questo settore trovano impiego 900 ETP (Equivalenti Tempo Pieno). Questo tipo di acquacoltura ha raggiunto un picco nell'anno 1997 con una produzione di 56.100 t seguito da una diminuzione progressiva fino all'anno 2003 stabilizzandosi quindi

1. Introduzione

ad una produzione di circa 40.000 t. La produzione lorda vendibile ha raggiunto un valore di 133 milioni di € ed ha registrato un incremento nell'ultimo decennio. Questa tendenza è dovuta principalmente alla produzione e vendita di trote fresche che rappresenta il sottosistema principale nell'acquacoltura d'acqua dolce. Ultimamente si assiste ad una lieve ripresa nella produzione di trote, dovuta all'innovazione dei processi di vendita del prodotto, che oltre ad essere venduto fresco e intero, viene commercializzato come prodotto trasformato (European Commission, 2009).

Le aziende del settore dell'acquacoltura di acqua salata sono per lo più società per azioni con una produzione media per unità di oltre 100 t. Si stima che il numero degli impiegati in questo settore sia pari a 926 ETP. La produzione è aumentata progressivamente fino a raggiungere le 30.000 t nell'anno 2007. La produzione lorda vendibile ha mostrato un trend analogo passando dai 106 milioni di € nel 1997 ai circa 200 milioni nel 2007. Questo settore produce prevalentemente spigole (*Dicentrarchus labrax*) e orate (*Sparus aurata*) che hanno raggiunto livelli di produzione di 19.700 t, per un valore di 134 milioni di €. Bisogna poi aggiungere che alcuni di questi impianti di allevamento di spigole e orate hanno diversificato la loro produzione includendo l'allevamento di specie innovative quali il sarago maggiore (*Diplodus sargus*), il sarago pizzuto (*Puntazzo puntazzo*), il dentice (*Dentex dentex*) e l'ombrina (*Ombrina cirrosa*). Queste "nuove" specie hanno raggiunto livelli di produzione di 5.400 t. In questo contesto l'allevamento dell'anguilla, con una produzione attuale di 1.700 t, ha gradualmente perso importanza. L'allevamento di anguille che ha avuto il suo massimo sviluppo nel 1999 con una produzione che raggiungeva le 3.000 t è andato poi calando fino al suo minimo storico nel 2003 con una produzione che non raggiungeva le 1.500 t. Questa situazione è dovuta sia alla difficoltà di reperimento degli avannotti selvatici, sia al rallentamento della domanda da parte dei principali mercati di riferimento nell'Europa centrale e settentrionale (European Commission, 2009).

Il settore della molluschicoltura è composto da cooperative di pescatori e dai loro consorzi che operano attraverso contributi pubblici finalizzati alla gestione di un'area marina. Si stima che gli impiegati in questo settore siano circa 3347 ETP. La produzione è caratterizzata dalla predominanza di due specie: mitilo e vongola. La tendenza, generalmente positiva, di questo settore, è legata ad un andamento altalenante delle produzioni. Questi allevamenti sono infatti influenzati dalle condizioni ambientali dei tratti di acqua (mare) in cui sono installate le aziende, dove i livelli di produzioni possono dipendere da fenomeni meteorologici e da sporadiche epidemie, come accadde nel 2003, anno in cui la produzione

1. Introduzione

precipitò a 125.000 t. In seguito, una lenta ripresa ha portato la quantità di produzioni ad un livello medio oscillante attorno alle 170.000 t. In termini di produzione lorda vendibile, è da sottolineare che, a parità di livelli quantitativi di produzione all'inizio e alla fine del periodo 1996-2007, il valore è pressoché duplicato passando da 150 a 307 milioni di €, soprattutto in conseguenza all'aumento del prezzo medio delle vongole (European Commission, 2009; Ismea, 2009).

Come già accennato, negli ultimi anni il settore dell'acquacoltura si è aperto anche ad altre specie quali il sarago maggiore, il sarago pizzuto, l'ombrina, il rombo (*Psetta maxima*), la sogliola (*Solea solea*), il tonno (*Thunnus thynnus*), ecc. L'allevamento del sarago e dell'ombrina sono ormai realtà consolidate e per entrambe le specie sono attualmente disponibili tecniche di controllo della riproduzione in grado di produrre un quantitativo di avannotti tale da soddisfare la domanda del mercato. La produzione avviene sia in vasche a terra che in gabbie in mare. L'allevamento dell'ombrina ha raggiunto un livello di produzione di circa 370 t nell'anno 2007 (European Commission, 2009; Ismea, 2009).

L'allevamento del rombo e della sogliola è ancora in fase sperimentale. In particolare, per quanto riguarda la riproduzione e la fase iniziale di crescita della sogliola, è stata perfezionata una tecnica abbastanza affidabile per la produzione di avannotti. Le fasi seguenti di allevamento fino al raggiungimento della taglia commerciale sono in fase avanzata di sperimentazione.

Per quanto riguarda l'allevamento del tonno rosso in Italia, nel 2006 erano presenti nove installazioni attive distribuite in tre regioni del sud della penisola, con una concentrazione di capacità produttiva del 51% nella sola Sicilia. L'allevamento del tonno è fondamentalmente legato alla disponibilità di pesce selvatico pescato. I tonni di piccole e medie dimensioni catturati vengono immessi in gabbie di grandi dimensioni (diversi milioni di metri cubi) dove vengono allevati per brevi periodi (2-7 mesi) fino al raggiungimento della taglia commerciale. I limiti che influenzano direttamente l'allevamento del tonno sono rappresentati, da un lato, dalla scelta del luogo di installazione dell'allevamento e, dall'altro lato, dalla difficoltà di produrre i mangimi per questa specie. Ulteriori limiti allo sviluppo della tonnicoltura derivano dall'impatto negativo di questa attività su altre realtà economiche, quali il turismo e la navigazione nelle medesime aree marine (European Commission, 2009).

1. Introduzione

1.1.4. *Importazione, esportazione e consumi in Italia*

A fronte di una produzione interna (da pesca e acquacoltura) stabile negli ultimi anni, dopo il calo dal 2000 al 2003, le importazioni mostrano una crescita costante dal 2000 al 2007 (Figura 1.8).

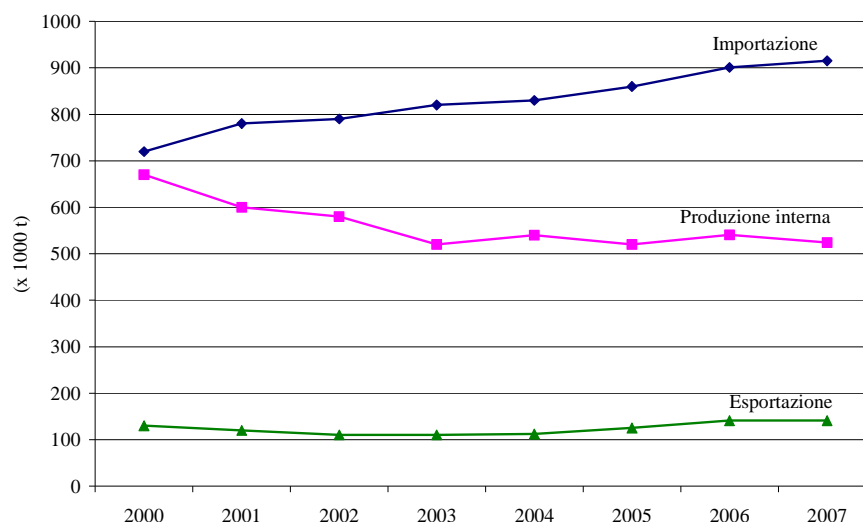


Figura 1.8. Evoluzione dei volumi di produzione, import e export di prodotti ittici freschi (2000-2005) (Elaborazione Ismea su fonti: a) Mipaaf-Irepa, Api/Icram, Api, Istat; b) Istat)

Nel 2006 e 2007, le esportazioni sono ritornati ai livelli del 2000, dopo una leggera flessione negli anni intermedi (European Commission, 2009; Ismea, 2009).

Al di là delle lievi variazioni annuali, emerge chiaramente la grande dipendenza dall'estero per la fornitura di prodotti ittici destinati al mercato interno. Tale dipendenza è in costante aumento e, attualmente, il valore delle importazioni nel loro insieme pesa per circa tre quarti sul valore dell'intero comparto dei prodotti ittici (saldo normalizzato -74%) (Ismea, 2009) (Figura 1.9).

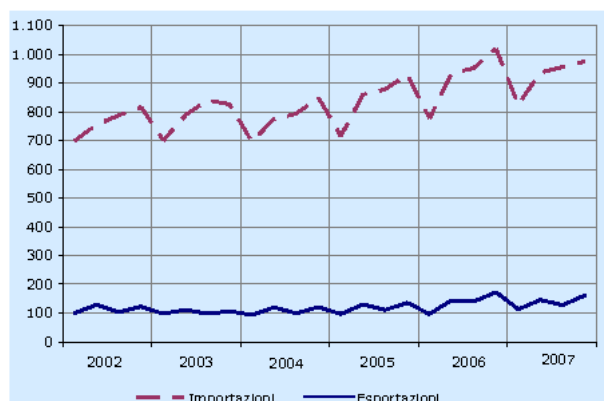


Figura 1.9. Dinamica delle esportazioni e importazioni di pesci, molluschi e crostacei (dati trimestrali, milioni di €) (Ismea, 2009)

1. Introduzione

L'andamento della bilancia commerciale italiana dei prodotti ittici nel 2006 e 2007 è riportata in Tabella 1.3 (Ismea, 2009).

Tabella 1.3. Bilancia commerciale dei prodotti ittici (in milioni di €) nel 2006 e 2007

Settori	2006	2007
<i>Esportazioni</i>		
Agroalimentare	22.284	23.709
- Prodotti ittici freschi	236	221
- Prodotti ittici trasformati	320	327
Totale settore ittico	556	548
<i>Importazioni</i>		
Agroalimentare	32.180	33.088
Prodotti ittici freschi	833	834
Prodotti ittici trasformati	2.847	2.856
Totale settore ittico	3.681	3.690
<i>Saldo commerciale</i>		
Agroalimentare	-9.896	-9.379
- Prodotti ittici freschi	-597	-613
- Prodotti ittici trasformati	-2.527	-2.529
Totale settore ittico	-3.125	-3.142

In termini di valore, il settore ittico rappresenta appena il 2,3% delle esportazioni dell'intero comparto agroalimentare, mentre rappresenta ben l'11,2% del valore delle importazioni, rappresentando pertanto un settore fortemente penalizzante per la bilancia commerciale agroalimentare. Il disavanzo commerciale è dovuto per l'80% ai prodotti ittici trasformati che incidono per il 60% sul valore delle esportazioni e il 77% su quello delle importazioni.

1. Introduzione

1.2. *La spigola*

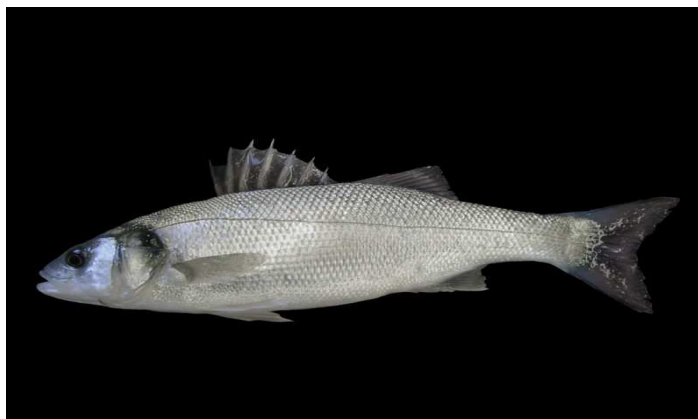


Figura 1.10. Esemplare di spigola allevata

1.2.1. Classificazione zoologica e descrizione della specie

La classificazione zoologica della spigola è la seguente:

Regno: *Animalia*

Sottoregno: *Eumetazoa*

Ramo: *Bilateria*

Phylum: *Chordata*

Subphylum: *Vertebrata*

Superclasse: *Gnathostomata*

Classe: *Actinopterygii*

Sottoclasse: *Osteichthyes*

Superordine: *Acanthopterygii*

Ordine: *Perciformes*

Sottordine: *Percoidei*

Famiglia: *Moronidae*

Genere: *Dicentrarchus*

Specie: ***Dicentrarchus labrax***, Linneo 1758.

La spigola, detta comunemente anche branzino, appartiene alla famiglia dei Moronidi. Se ne conoscono due specie autoctone, *Dicentrarchus labrax* e *Dicentrarchus punctatus*. la seconda, la spigola macchiata, è caratterizzata dalla punteggiatura cutanea e dalla presenza di 50-60 scaglie sulla linea laterale, contro le 71-72 della prima.

Il *D. labrax* è la sola specie attualmente allevata in Italia. Presenta colore argenteo, grigio verdastro nelle parti superiori, bianco inferiormente; ha denti sottili e aguzzi e possiede due pinne dorsali nettamente separate (Figura 1.10). Può raggiungere 1 m di lunghezza e superare i 12 kg di peso.

1. Introduzione

In natura è frequente lungo le coste dell'Oceano Atlantico, dalla Norvegia alle Canarie, nel Mar Mediterraneo e nel Mar Nero (Figura 1.11). L'habitat del *D. labrax* è rappresentato dai fondali costieri dove conduce regime alimentare carnivoro spingendosi sovente nelle lagune. La spigola è infatti una specie eurialina: può adattarsi a salinità assai basse, permettendo penetrazioni nelle acque salmastre e lagunari e dolci dei fiumi, come pure tollerare salinità elevate (fino a 45 g/l).

La fascia di temperatura operativa è compresa tra 12 e 26°C, quella ottimale varia tra 22 e 24°C; la temperatura minima vitale è di 2-3°C, quella massima di 30-32°C (Saroglia e Ingle, 1992).

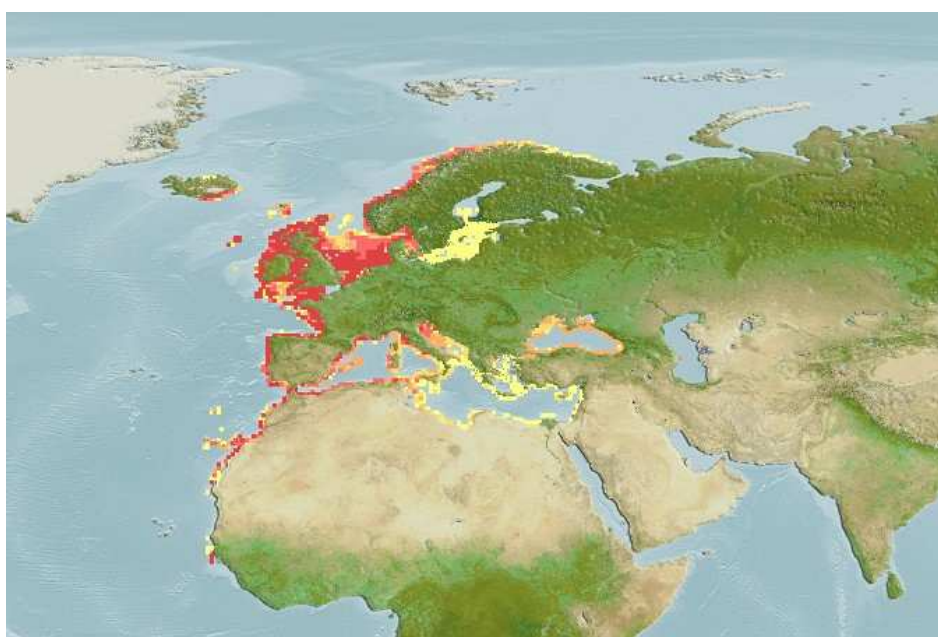


Figura 1.11. Distribuzione geografica della spigola in natura

1.2.2. Allevamento della spigola

Per le caratteristiche termiche e ambientali, la spigola ha trovato il suo areale ottimale di allevamento nelle acque del bacino del Mediterraneo e nelle coste atlantiche di Spagna e Francia (Figura 1.12).

L'allevamento della spigola interessa circa 15 Paesi, per la maggior parte affacciati sul Mar Mediterraneo. Dopo gli anni '90, in cui l'allevamento si è sviluppato soprattutto nei paesi europei, alcuni di questi come Italia, Francia, Croazia, Portogallo hanno raggiunto un certo grado di saturazione, con incrementi produttivi limitati negli ultimi anni (Tabella 1.4).

L'Italia, primo produttore negli anni '90-'95, ha visto le sue produzioni assestarsi su volumi oscillanti tra le 6000 e le 9000 t nel periodo 2000 e il 2007.

1. Introduzione



Figura 1.12. Principali paesi produttori di spigola nell'Atlantico e nel Mediterraneo (FAO Fishery Statistics, 2006)

Tabella 1.4. Evoluzione della produzione di spigole allevate (tonnellate) (FAO, 2010)

Paese	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007
Croazia	1300	1520	1800	1813	2300	2000	2400	2800
Francia	3020	2721	3536	3876	3438	3913	3239	3240
Grecia	26653	25342	23860	27324	25766	30959	34040	34760
Italia	8100	9500	7176	9600	6831	6262	8335	8505
Malta	234	196	50	93	125	196	155	75
Portogallo	653	925	808	1384	1235	1530	1584	1391
Spagna	1837	2307	3339	3840	3802	5713	7763	9152
Totale Europa	41850	42580	40719	48070	43667	50709	57645	60033
Cipro	299	383	422	448	698	583	590	740
Emirati Arabi	0	0	0	750	190	190	190	190
Israele	150	337	385	361	349	199	158	160
Turchia	17877	15546	14339	20982	26297	37490	38408	41900
Totale Asia	18326	16266	15146	22541	27534	38462	39346	42990
Egitto	10031	841	1239	1789	1812	4192	372	598
Libia	0	0	0	0	170	170	170	170
Marocco	250	202	325	389	370	845	36	79
Tunisia	202	461	649	457	466	633	492	793
Totale Africa	10483	1504	2213	2635	2818	5840	1070	1640
Totale Mondo	70659	60350	58078	73246	74019	95011	98061	104663

Sono esclusi i Paesi con produzioni inferiori alle 100 t annue (Bosnia Erzegovina, Germania, Gran Bretagna, Islanda).

La Spagna, partendo da produzioni limitate, ha mostrato una costante crescita dei volumi prodotti, fino a superare l'Italia nel 2007. La Grecia, già maggiore produttore mondiale nel 2000, dopo un assestamento negli anni 2001 e 2002, ha mostrato un buon aumento delle produzioni negli anni successivi fino a rappresentare nel 2007 il 58% della produzione europea e il 33% della produzione mondiale.

1. Introduzione

La Turchia, secondo produttore mondiale nel 2000, dopo un assestamento dei livelli produttivi nel 2001 e 2002 analogo alla Grecia, ha mostrato una crescita vigorosa della produzione fino a sostituire nel 2004 la Grecia al primo posto nella classifica mondiale con il 40% della produzione nel 2007.

L'Africa vede la presenza di alcuni Paesi con modeste produzioni, tra cui l'Egitto che mostra tuttavia livelli produttivi molto variabili e in netto calo negli ultimi anni.

1.2.3. Riproduzione artificiale e allevamento larvale

L'allevamento commerciale della spigola è stato reso possibile dallo sviluppo delle conoscenze in merito alla riproduzione della specie e dalla possibilità di realizzare la riproduzione artificiale e l'allevamento larvale in avannotteria, aumentando a dismisura la disponibilità di giovanili da avviare all'ingrasso.

Il ciclo di allevamento della spigola con il metodo intensivo si divide in tre fasi: produzione di avannotti, svezzamento ed ingrasso (Saroglia e Ingle, 1992; Mazzola e Marino, 2001).

Sia in natura che in cattività, la riproduzione avviene normalmente nel periodo gennaio-marzo con l'emissione di uova pelagiche del diametro di 1,15-1,16 mm, prodotte in numero di circa 140.000 per kg di peso della femmina. Le uova vengono raccolte, lavate e riposte negli schiuditoi. La schiusa delle uova si completa in 6-7 giorni dall'emissione. La larva appena schiusa misura 3,5-4 mm ed è planctonica non essendo dotata di organi propulsori attivi.

Dopo la schiusa, l'organogenesi continua traendo l'energia necessaria dal riassorbimento del sacco vitellino. Successivamente a tale fase, che può prolungarsi per 4-5 giorni in funzione della temperatura, la larva è in grado di percepire la presenza di piccoli organismi planctonici e di catturarli, purché questi si presentino a distanza di pochi millimetri, a portata cioè di un colpo di coda, unico organo propulsore della larva a questo stadio.

La larva prosegue il proprio sviluppo organogenetico, traendo energia dall'alimento planctonico. Le tecniche di allevamento larvale assecondano tali comportamenti alimentari naturali durante il cosiddetto periodo di svezzamento (fino a 30-40 giorni dalla chiusura), fornendo inizialmente il primo "appastamento", consistente in zooplancton (*Brachionus plicatilis* fino al 25° giorno, in seguito *Artemia salina*) progressivamente sostituito da mangime commerciale specificamente formulato e di più semplice approvvigionamento e somministrazione.

1. Introduzione

L'allevamento larvale può essere condotto secondo due tecniche: la tecnica delle acque verdi e la tecnica delle acque chiare. La prima prevede che l'alimento vivo venga coltivato naturalmente e promiscuamente nella vasca in cui sono allevate le larve di spigola. Le dimensioni delle vasche sono elevate, con volumi compresi tra i 25 ed gli 80 m³. La seconda tecnica comporta l'allevamento delle larve in vasche di volumi ridotti, 1-5 m³ e la produzione di colture massive di fito- e zoo-plancton in strutture operanti in parallelo e la somministrazione giornaliera dello stesso in quantità definite (Mazzola A., Marino G., 2001).

Alla fine del 2° mese, la larva giunge allo stadio di avannotto (0,5-1 g) avendo completato lo sviluppo organogenetico e avendo assunto le caratteristiche peculiari di pesce. Gli avannotti sono sottoposti a una fase di adattamento in condizioni controllate e risultano adatti alla semina nelle vasche per l'ingrasso quando raggiungono la taglia minima di circa 3 g. In taluni casi si preferisce prolungare la fase di adattamento fino alla taglia di circa 10 g (es. gabbie immerse in mare, lunghi trasporti degli avannotti fino ai centri di ingrasso, bacini di ingrasso di elevate dimensioni).

Come anticipato, gli avannotti utilizzati negli impianti di ingrasso sono prevalentemente prodotti in avannotteria pur persistendo l'impiego di avannotti selvatici provenienti dalla pesca costiera (Saroglia e Ingle, 1992; Mazzola e Marino, 2001).

1.2.4. Tipologie di allevamento per l'ingrasso

La fase di ingrasso, che permette all'avannotto di raggiungere la taglia commerciale, può seguire due principali tipologie di allevamento: intensivo ed estensivo. Questi sistemi si differenziano per il diverso grado di modificazione del ciclo biologico e del regime alimentare dell'animale.

L'allevamento intensivo, più diffuso nella realtà italiana, può essere classificato a seconda dell'ubicazione delle strutture produttive, distinguendo fra vasche a terra e gabbie a mare.

Le vasche a terra sono generalmente costruite in cemento con opportuni impianti di movimentazione e riciclaggio delle acque reflue. Questo tipo di impianto presenta costi di gestione elevati, ma permette un maggiore controllo del ciclo produttivo, con conseguente maggiore produttività, dovuta a riduzione della durata del ciclo e delle perdite qualitative. Negli allevamenti a terra (Figura 1.13) è possibile ottenere un'elevata produttività, grazie al controllo dei fattori ambientali quali temperatura dell'acqua, concentrazione di O₂ e

1. Introduzione

concentrazione dei cataboliti (in particolare ammoniaca). Il controllo di questi parametri permette l'aumento del carico di pesce per unità di superficie (si parla di unità di superficie e non di volume in quanto le vasche hanno profondità media di 1 m). Inoltre, l'impiego di distributori automatici temporizzati di mangime pellettato permette la riduzione dei costi di manodopera e la standardizzazione della produzione stessa.



Figura 1.13. Vasche da ingrasso per l'allevamento della spigola

Per una migliore gestione dei volumi e un controllo accurato delle fasi giovanili, gli avannotti sono dapprima trasferiti in vasche di pre-ingrasso, con densità di 200-300 individui/m³, dove rimarranno fino all'età di un anno. La successiva fase d'ingrasso viene realizzata in vasche di maggiori dimensioni con densità massime di 15-20 kg/m³ e dura fino all'età di due anni, ossia fino al peso di 300-700 g (Saroglia e Ingle, 1992). Generalmente il ciclo di ingrasso viene completato in 15-18 mesi. Infatti, partendo da avannotti del peso di 4-5 g, sono sufficienti 12 mesi per raggiungere la taglia commerciale di 350-400 g e 16 mesi per avvicinarsi alla taglia di 700 g.

Gli impianti in mare sono costituiti da gabbie in rete metallica, galleggianti o sommerse (Figura 1.14). I costi di realizzazione e gestione delle gabbie in mare sono mediamente più bassi rispetto agli impianti a terra. Tuttavia, la tipologia di struttura non permette il controllo dei parametri ambientali, comporta l'impiego di personale specializzato (Saroglia e Ingle, 1992; Bronzi e coll., 2001) e presenta una minor possibilità di controllo del ciclo. Gli impianti off-shore, da anni approntati in Grecia, Tunisia, Turchia e Croazia, sono meno diffusi in Italia rispetto agli impianti a terra a causa della sfavorevole conformazione costiera, che non permette un'adeguata protezione dalle mareggiate, e dalla scarsa profondità dei fondali in prossimità delle coste.

1. Introduzione



Figura 1.14. Gabbie da ingrasso in allevamento intensivo in mare

L'allevamento estensivo, rappresenta una realtà limitata nel panorama italiano, in quanto fornisce una ridotta produzione per unità di superficie ed ha, quindi, un ruolo di mantenimento del territorio e di protezione delle aree di interesse naturalistico, quali le lagune venete.

La produzione estensiva è rappresentata dalla tradizionale vallicoltura, nella quale tradizionalmente viene sfruttata la rimonta naturale degli avannotti, processo per cui il pesce viene richiamato dal mare alla valle per mezzo del gradiente di temperatura dell'acqua. Tuttavia, la sempre maggiore scarsità di fauna ittica naturale ha notevolmente ridotto la rimonta naturale, per cui è necessaria la semina di novellame selvatico (Figura 1.15) o, più spesso, di giovanili provenienti da avannotteria. Gli avannotti vengono immessi nei bacini di pascolo nei mesi di aprile-maggio (Ravagnan, 1992).



Figura 1.15. Raccolta del novellame selvatico

La fascia di temperatura ottimale per l'allevamento della spigola è compresa tra 12 e 26°C. Se ne deduce che l'allevamento nelle valli venete durante il periodo estivo (come pure durante il periodo invernale) si svolge a temperature non ottimali. Sono necessari 20 mesi per il raggiungimento della taglia di 300 g, detta anche "taglia porzione" (perché una volta cucinata

1. Introduzione

costituisce la porzione ideale per un singolo individuo adulto), e 30 mesi per quella dei 600 g di peso. Il fattore limitante per la produzione, nel caso della vallicoltura, risulta essere la disponibilità di cibo: si calcola che per ogni kg di spigola prodotto, siano necessari 5-6 kg di altro pesce (Ravagnan, 1992).

L'allevamento della spigola in valle (Figura 1.16) viene spesso associato ad altre specie ittiche in policoltura, quali cefali ed orate. Questa associazione è possibile solamente fino alla taglia dei 150 g, in quanto fino a questa fase la spigola si comporta da carnivoro positivo, ossia si nutre esclusivamente di organismi di ridotte dimensioni, privi di interesse economico. Superata la soglia dei 150 g, la spigola si nutre di specie di dimensioni crescenti, quali cefali ed orate, causando danni di rilevante importanza economica all'allevamento in policoltura.



Figura 1.16. Valle da pesca per l'allevamento estensivo

Esistono, infine, forme di allevamento semi-intensive che, pur utilizzando bacini di grandi dimensioni caratteristici dell'allevamento estensivo, integrano l'alimento fornito dall'ambiente con la somministrazione di mangime (Figura 1.17).



Figura 1.17. Bacini in terra per l'allevamento semi-intensivo e distributore di mangime

1. Introduzione

1.3. *Caratterizzazione della qualità delle spigole*

La crescente attenzione verso la qualità e la sicurezza alimentare dei prodotti ittici dell'acquacoltura impone di affrontare lo studio scientifico di questi temi in modo sempre più ampio e specifico al fine di valorizzarne i pregi e individuare eventuali limiti.

Tra i numerosi fattori che contribuiscono a definire la qualità del prodotto ittico, ed in particolar modo quello derivante dall'acquacoltura, vi sono le caratteristiche di tipo nutrizionale-salutistico, ossia l'elevata digeribilità, l'apporto di proteine di alto valore biologico, di vitamine, di elementi minerali e soprattutto l'elevato contenuto di acidi grassi polinsaturi della serie ω -3 (Ackman, 1989). Questi acidi grassi esercitano, come è ormai noto, effetti protettivi contro le malattie cardiovascolari, contro alcuni tipi di cancro indotti da cattive abitudini alimentari (es. cancro al colon), oltre che un effetto positivo sulla funzionalità respiratoria e sulla salute mentale.

Numerosi studi di laboratorio su diverse specie ittiche selvatiche e allevate hanno dimostrato come la composizione in nutrienti, l'adiposità, il profilo in acidi grassi e la formazione di lipidi perossidati nella parte edule dei pesci allevati in modo intensivo siano in gran parte influenzati dal livello di ingestione e dalla qualità della dieta naturale o del mangime somministrato, con riflessi sulle proprietà nutrizionali, shelf-life e sulla qualità in senso più ampio del prodotto (Alasalvar e coll., 2002; Messina e coll., 2009).

Altre ricerche hanno anche evidenziato come le principali proprietà nutrizionali di specie ittiche importanti per l'acquacoltura nazionale siano correlate alla tipologia di allevamento (Orban e coll., 1999). Sotto questo profilo non si dispone tuttavia di quadro generale descrittivo della qualità nutrizionale di spigole allevate nel nostro Paese in relazione al variegato panorama di sistemi e aree di allevamento di queste specie.

1.3.1. Composizione chimica e valore nutrizionale del pesce e della spigola

Tra le caratteristiche che definiscono la qualità di un prodotto ittico, quelle nutrizionali ricoprono certamente un ruolo centrale. Esse dipendono dalla composizione chimica delle carni e dalla presenza, proporzione e biodisponibilità di componenti chimiche a significato funzionale, integrativo, protettivo o anche di rischio per la salute del consumatore (Ackman, 1995; Sargent e coll., 2002).

1. Introduzione

In generale, il pesce è un ottimo alimento caratterizzato da un contenuto proteico con elevato valore biologico, e un buon apporto di minerali (in particolare fosforo, ferro, selenio, iodio), vitamine liposolubili A, D, E e K, e un apporto lipidico di elevata qualità in termini di composizione acidica. La carne di pesce, inoltre, risulta essere più tenera e digeribile della carne dei vertebrati terrestri per il ridotto contenuto in tessuto connettivo.

La composizione chimica del pesce differisce da specie a specie (Tabella 1.5), ma anche tra individui di una stessa specie in base alle caratteristiche anatomiche e fisiologiche, al sesso, al regime alimentare, alla stagione, alla taglia ed alla porzione esaminata, in particolar modo per quanto riguarda il contenuto in grassi.

Tabella 1.5. Composizione chimica e valore nutrizionale per 100 g di frazione edibile della carne di diverse specie ittiche e di vertebrati terrestri (INRAN, 2007)

	Spigola	Orata	Trota	Salmone	Tonno	Vitellone (spalla)	Maiale (bistecca)
Parte edibile, %	100	100	100	65	90	100	74
Acqua, g	69,9	69,1	74,3	68,0	61,5	75,2	69,6
Proteine, g	21,3	19,7	20,3	18,4	21,5	21,5	21,3
Lipidi, g	6,8	8,4	4,1	12,0	8,1	2,4	8,0
Colesterolo, mg	75	68	50	35	70	60	62
Energia, kcal	149	159	118	185	159	108	157
Energia, kJ	625	665	494	776	666	450	658

La carne di pesce si caratterizza per un contenuto proteico intorno al 20%, costituito da proteine con valore biologico superiore all'80% (Mengoli, 1994) e di facile digeribilità. Gli aminoacidi essenziali (come lisina, leucina ed isoleucina) sono presenti in buona quantità ed in proporzioni equilibrate per le esigenze nutrizionali dell'uomo, anche grazie alla presenza di un rapporto lisina/arginina inferiore rispetto alle carni di animali terrestri. Una particolarità dei prodotti ittici è l'elevata presenza di composti azotati non proteici, che contribuiscono al veloce deperimento del pesce.

In funzione del contenuto lipidico, i pesci possono essere classificati in:

- pesci magri, con contenuto lipidico inferiore al 3% quali acciuga, merluzzo, rombo, spigola e storione. Il sito di accumulo del grasso è il fegato. Il filetto di merluzzo contiene meno dello 0,5% di grasso, mentre è possibile estrarre l'olio dal fegato;
- pesci semi-grassi, con contenuto lipidico compreso tra il 3 e l'8%, quali dentice, triglia e salmone;
- pesci grassi, con contenuto lipidico superiore all'8%, come anguilla, sgombro, tonno ed aringa. Il sito di accumulo del grasso è, in questo caso, il tessuto muscolare.

1. Introduzione

I lipidi introdotti con la dieta (oli e grassi), oltre a fornire energia, fungono da trasportatori delle vitamine liposolubili e provvedono a reintegrare il fabbisogno di acidi grassi essenziali (AGE o EFA: *essential fatty acids*). In effetti, i grassi del pesce sono ottimi per l'alimentazione umana, in quanto hanno un elevato contenuto in acidi grassi essenziali ed un ridotto contenuto di colesterolo e un relativamente elevato contenuto di fosfolipidi.

Chimicamente, gli acidi grassi essenziali sono costituiti da acidi grassi polinsaturi (*poly unsaturated fatty acids*, PUFA) con catene di 18 o più atomi di carbonio, aventi il primo doppio legame in posizione 3 o 6 partendo dal gruppo metilico della catena carboniosa. Gli EFA sono essenziali per l'uomo che, non possedendo enzimi desaturanti, non è in grado di sintetizzare acidi grassi che abbiano doppi legami in posizione 3 o 6 e pertanto è necessaria l'assunzione degli acidi grassi polinsaturi a lunga catena con l'alimento.

I principali acidi grassi essenziali sono: l'acido linoleico (C18:2 ω -6), l' α -linolenico (C18:3 ω -3) e l'arachidonico (C20:4 ω -6). La mancata capacità di elongazione e desaturazione dell'acido linoleico ed α -linolenico limita la capacità dell'organismo di sintetizzare altri importanti derivati, fra i quali l'acido eicosapentaenoico (EPA, C20:5 ω -3) e l'acido docoesaenoico (DHA, C20:6 ω -3).

L'importanza biologica degli acidi grassi ad alto livello di insaturazione è correlata alla modulazione dello stato di fluidità delle membrane cellulari di cui i fosfolipidi sono i principali componenti, oltre che al ruolo di precursori di una famiglia di composti ad alta attività biologica in tessuti ed organi, quali prostaglandine, eicosanoidi, trombossani e leucotrieni.

L'acido polinsaturo di gran lunga prevalente nei tessuti animali è l'acido arachidonico. Sia l'acido arachidonico che gli acidi grassi ω -3 (tra i quali EPA e DHA) hanno un ruolo biologico molto importante, essendo i precursori di composti biologicamente molto attivi nel flusso sanguigno, i trombossani e la prostaciclina. La modificazione del rapporto acido arachidonico/EPA avrebbe notevoli conseguenze sulla produzione di composti pro-aggreganti piastrinici (derivanti dall'attività dell'enzima ciclossigenasi), quali i trombossani.

In generale si può affermare che la presenza di EPA nei tessuti comporta una sostituzione dell'acido arachidonico con conseguente riduzione degli eicosanoidi da esso derivati, i quali risultano essere più attivi nella formazione di trombi rispetto agli eicosanoidi derivati dall'acido eicosapentaenoico (EPA). Ne consegue che un elevato contenuto in EPA comporterebbe una maggiore fluidità del sangue ed una riduzione del contenuto lipidico totale, riducendo anche il livello di colesterolo a bassa densità (LDL), altro composto direttamente

1. Introduzione

implicato nella costituzione dei trombi (INRAN, 2007).

Gli acidi grassi polinsaturi della serie ω -3 e della serie ω -6 risultano spesso antagonisti tra loro, in quanto agiscono sugli stessi siti metabolici. L'assunzione degli acidi grassi essenziali con la dieta prevede un rapporto ω -6: ω -3 pari a 4-5:1 (Tabella 1.6). Nelle diete alimentari a base di prodotti vegetali il contenuto in acidi grassi ω -3 è ridotto, mentre risulta più elevato il contenuto di acidi grassi ω -6. In Italia, la dieta media, ricca di carni, latticini e grassi animali, ha portato a uno sbilanciamento di questo rapporto (ω -6: ω -3 circa 13:1). Per questo motivo, è importante aumentare le fonti di acidi grassi ω 3 nell'alimentazione. Fatte queste premesse, il maggiore interesse per il consumo del pesce risiede non tanto nella quantità di grasso contenuta nelle carni di questi animali, quanto nel profilo acidico (e quindi nel contenuto dei diversi acidi grassi) degli stessi lipidi.

Tabella 1.6. Apporti raccomandati di acidi grassi essenziali in quantità (g/d) e in rapporto all'ingestione giornaliera di energia (L.A.R.N., 1996)

Categoria	Età (anni)	ω -6		ω -3	
		% energia	g/d	% energia	g/d
Lattanti	0,5-1	4,5	4	0,2-0,5	0,5
Bambini	1-3	3	4	0,5	0,7
	7-10	2	4	0,5	1
Maschi	11-18	2	5	0,5	1
	>18	2	6	0,5	1,5
Femmine	11-18	2	4	0,5	1
	>18	2	4,5	0,5	1
Gestanti		2	5	0,5	1
Nutrici		2	5,5	0,5	1

L'interesse per gli effetti del consumo di pesce o di grassi di origine marina sullo stato nutrizionale, e più specificamente sullo stato di salute dell'uomo, è nato dall'osservazione delle popolazioni Eschimesi della Groenlandia, per le quali il consumo individuale di pesce è assai elevato (oltre 400 g/d) e la mortalità per coronaropatie assai bassa. Tale fenomeno è stato interpretato come una possibile conseguenza dell'elevata fluidità del sangue, dovuta ad una ridotta presenza di piastrine e all'accumulo di acido eicosapentaenoico (EPA).

Sono state svolte molte ricerche, sia su animali da laboratorio che sull'uomo, finalizzate a valutare l'effetto della somministrazione di acido eicosapentaenoico sulla funzionalità piastrinica. In sintesi, gli studi condotti sull'uomo, sia somministrando preparazioni di trigliceridi arricchite in EPA sia formulando diete a base di carne di pesce, che prevedano un apporto giornaliero medio di circa 2-3 g di tale acido, hanno confermato che dopo tali trattamenti la funzionalità piastrinica viene fortemente depressa e che il sistema degli

1. Introduzione

eicosanoidi non solo piastrinici, ma anche vascolari e leucocitari, viene positivamente modificato (INRAN, 2007).

Data la sua composizione particolarmente favorevole, il consumo di pesce viene spesso consigliato come concentrato di acidi grassi polinsaturi. Nel pesce, gli acidi grassi polinsaturi ω -3 e ω -6 sono presenti in rapporto bilanciato, prevalentemente nella frazione fosfolipidica localizzata nelle membrane cellulari in associazione degli antiossidanti naturali (Clarke e coll., 1990).

La carne di spigola possiede un contenuto lipidico variabile dall'1 al 7%, anche se questo valore può subire forti oscillazioni in funzione di numerosi fattori. Come per le altre specie ittiche, le condizioni di allevamento possono avere una forte influenza sulle caratteristiche chimiche e nutrizionali delle spigole. Bisogna comunque smentire la convinzione popolare che "il pesce pescato sia migliore di quello allevato" per lo meno dal punto di vista nutrizionale. Il regime alimentare degli animali in allevamento fa sì che il contenuto lipidico delle carni sia solitamente più elevato, ma questo non vuol dire che la qualità dei grassi (intesa in termini di composizione degli acidi grassi) sia sfavorevole nelle spigole di allevamento (Tabella 1.7). Alcuni studi sul miglioramento della composizione in acidi grassi polinsaturi delle diete alimentari per spigole hanno evidenziato risultati soddisfacenti sia in termini di performance di crescita che di riproduzione (Harel e coll., 2002).

Tabella 1.7. Composizione chimica di spigole allevate e selvatiche (Alasalvar e coll., 2002)

Composizione chimica, %	Spigole allevate	Spigole selvatiche
Acqua	72,2	75,5
Proteine	20,7	19,2
Grassi	5,2	1,4
Ceneri	1,5	1,5
Frazione lipidica		
Acidi grassi saturi, % ¹	29,2	33,4
Acidi grassi monoinsaturi, %	34,6	19,4
PUFA (ω -3+ ω -6), %	36,1	47,4
PUFA ω -3, %	26,8	35,6
PUFA ω -6, %	9,3	11,8

¹Percentuale della frazione lipidica

Per quanto riguarda le altre caratteristiche chimiche della carne di pesce, in generale, il contenuto in glucidi è molto ridotto, generalmente inferiore ad 1 g per 100 g di prodotto edibile. Le uniche specie che presentano un livello di glucidi appena superiore a detta soglia sono i molluschi lamellibranchi, ed in particolare le ostriche, che presentano un maggior

1. Introduzione

contenuto di sostanze di riserva, sottoforma di glicogeno (4,5 g/100 g prodotto edibile) (INRAN, 2007).

Il contenuto in sali minerali rispecchia l'habitat della specie; si nota quindi che per i pesci marini l'elemento maggiormente presente è il sodio, mentre per i pesci fluviali è il potassio. Altri elementi minerali importanti nella carne di pesce sono magnesio, fosforo, selenio, calcio e ferro, quest'ultimo con valori superiori per i teleostei (pesci ossei) rispetto ai molluschi.

Come anticipato all'inizio del paragrafo, la carne di pesce è ricca in vitamine liposolubili, in particolar modo le vitamine A ed E, particolarmente concentrate nell'olio di fegato (Mengoli, 1994).

1.3.2. Biometrie e caratteristiche della carcassa

Per quanto riguarda le caratteristiche corporee dei pesci, alcune di queste assumono significato merceologico importante in quanto, influenzando parametri come la taglia, la resa in parti eduli e la percentuale di scarto, determinano il rapporto qualità-prezzo del prodotto (Poli, 1999a; Poli e coll., 2001). Alla definizione di tali caratteristiche contribuiscono la specie, l'età, il sesso, la taglia e alcuni parametri ambientali, tra cui la disponibilità di alimento (Sargent e coll., 2002).

La resa di macellazione (rapporto percentuale tra il peso del pesce eviscerato e il peso vivo) dà informazioni merceologiche sulla quantità di porzione edibile che si può ricavare da una specie e rappresenta quindi un indicatore del rapporto qualità-prezzo (Poli, 1999a; Poli e coll., 2001). Essa è influenzata dall'entità con cui ciascuna componente corporea contribuisce in peso alla definizione di essa. Pertanto, parlando di resa, bisogna considerare in maniera ben precisa la specie in questione e la stagione in cui questa viene pescata, e valutare inoltre quali, tra le componenti corporee, vanno incluse nella resa o nello scarto. Infatti, a seconda della specie ittica, le componenti considerate di scarto variano in funzione delle abitudini alimentari dei consumatori, poiché alcuni pesci vengono consumati interi, altri con pelle. Inoltre, a seconda del periodo in cui le specie vengono pescate, alcune componenti considerate di scarto, come ad esempio le gonadi femminili, possono addirittura apportare valore aggiunto alla specie stessa, essendo destinate al consumo fresco o all'industria di trasformazione per la preparazione di conserve tipiche, di grande valore commerciale, come la bottarga.

1. Introduzione

Solitamente un aumento della resa si verifica all'aumento del contenuto lipidico tissutale. Questo è particolarmente vero per i pesci allevati, in cui, spesso, un aumento del tenore lipidico della dieta è positivamente correlato con le rese percentuali ottenute (Torrissen e coll., 2001).

La forma e le caratteristiche della livrea del pesce, che ne definiscono l'aspetto esteriore, rappresentano i primi attributi in grado di orientare la scelta del consumatore basata su aspettative e modelli personali o influenzati da azioni di comunicazione sociale o di marketing.

Per quanto concerne le biometrie individuali distinguiamo:

- misure lineari: lunghezza totale; lunghezza standard; lunghezza della testa; altezza massima; spessore massimo; distanza tra piano caudale e piano altezza massima;
- rilievi ponderali: peso carcassa eviscerata; peso della testa; peso dei filetti; peso del pacchetto viscerale + cuore e vescica gassosa; peso del grasso periviscerale; peso del fegato; peso delle gonadi.

Da queste misurazioni si possono poi calcolare gli indici morfometrici:

- fattore di condizione (FC) = $\text{peso} / \text{lunghezza totale}^3 \times 100$;
- profilo relativo (PR) = $\text{altezza massima} / \text{lunghezza massima}$;
- indice craniale (IC) = $\text{lunghezza testa} / \text{lunghezza totale}$;
- indice di agilità (IA) = $\text{distanza tra piano caudale e piano altezza massima} / \text{altezza massima}$;
- indice epato-somatico (IES) = $\text{peso fegato} / \text{peso totale} \times 100$;
- indice visceroso-somatico (IVS) = $\text{peso pacchetto viscerale} / \text{peso totale} \times 100$;
- indice grasso mesenterico (IM) = $\text{peso grasso mesenterico} / \text{peso totale} \times 100$;
- indice gonadico (IG) = $\text{peso gonadi} / \text{peso totale} \times 100$.

Pur non trascurando possibili cause genetiche del diverso pattern conformazionale, è ben noto che nei pesci la forma è grandemente influenzata da fattori ambientali. Inoltre lo status nutrizionale gioca un ruolo importante. È quindi verosimile che le differenze nella forma dei pesci possano ascrivere a vari fattori ad azione anche sinergica tra i quali: il maggior consumo energetico/attività natatoria imposti dall'azione di predazione (sistema di allevamento estensivo vs. intensivo) o dal maggior idrodinamismo dei siti (gabbie vs. vasche a terra) ed il diverso status nutrizionale (entità dei depositi adiposi periviscerali), permettendo di differenziare, ad esempio, le spigole allevate in estensivo da spigole alimentate artificialmente in intensivo (Tulli e coll., 2009).

1. Introduzione

1.4. *Freschezza del pesce*

La qualità di un prodotto alimentare è un concetto molto ampio, che parte da definizioni di tipo igienico-sanitario, trattando aspetti nutrizionali e salutistici, per passare a parametri tecnologici. Per il pesce la valutazione completa della qualità non può non considerarne la “freschezza” (Poli, 1999a e 1999b).

La freschezza non è solo il termine usato per lo stato ottimale della carne, che esiste solo per un breve periodo dopo la cattura, ma è un termine usato per gli stadi più avanzati di conservazione quando le proprietà che determinano la freschezza stessa cominciano a sparire gradatamente, con il manifestarsi di un notevole/apprezzabile deterioramento. L’astratto e complesso termine di freschezza deve essere chiaramente differenziato da quello di “pesce fresco”.

Mentre la freschezza è un attributo del pesce fresco, nei suoi primi stadi dopo la cattura o la raccolta, il termine pesce fresco indica, a livello commerciale, il prodotto che non ha avuto altri trattamenti se non l’eviscerazione, la sfilettatura e/o la refrigerazione in ghiaccio fondente, non contiene alcun additivo e non è stato trasformato in alcun modo (Poli, 1999a e 1999b).

1.4.1. *Evoluzione della freschezza*

Il concetto di freschezza è un concetto fortemente dinamico, in quanto definisce lo stadio macroscopico di tutti quei processi metabolici che interessano il filetto o il pesce intero dalla sua morte fino al suo consumo come alimento. Le modificazioni *post-mortem* si dividono in due fasi distinte di degradazione cellulare: l’autolisi e la degradazione batterica. Tali fasi non sono contemporanee poiché l’autolisi inizia immediatamente dopo la morte dell’animale, mentre la degradazione batterica ha luogo dopo una fase iniziale di latenza.

Dopo la morte, a livello cellulare cessa l’apporto di ossigeno e quindi anche la glicolisi aerobia, tuttavia la cellula sopravvive fino all’esaurimento dell’energia prontamente disponibile residua, l’adenosina trifosfato (ATP). In questo periodo, detto di *pre-rigor*, il corpo muscolare del pesce è caratterizzato a livello macroscopico da una certa flessibilità delle fibre muscolari. Al di sotto di un certo livello di ATP si ha il *rigor mortis*, originato dall’irreversibilità del legame actina-miosina nelle fibre muscolari, che conferisce rigidità cadaverica al tessuto muscolare. In seguito alla degradazione della molecola trasportatrice di energia, ATP, si ha la produzione di composti con livelli energetici inferiori, quali ADP

1. Introduzione

(adenosina di-fosfato) e AMP (adenosina mono-fosfato), inosina mono-fosfato e successivamente inosina e ipoxantina.

La formazione di IMP ha effetti positivi sul gusto della carne di pesce, mentre la sua successiva degradazione ad inosina e, soprattutto, ipoxantina provoca un sapore amaro. Il fenomeno risulta essere più marcato nella carne di animali terrestri, perché il contenuto di ATP è maggiore. Nelle carni dei vertebrati terrestri, inoltre, si riscontra un maggiore accumulo di acido lattico, che comporta maggior acidificazione. Questa acidificazione limita l'attacco batterico nella carne dei vertebrati terrestri, ma comporta una maggior perdita d'acqua per il raggiungimento del punto isoelettrico delle proteine muscolari, con conseguenti perdite di peso in fase di cottura.

Nel pesce la fase di *rigor mortis* è di breve durata, generalmente non superiore alle 24 ore, ed evolve in una fase di rilassamento delle fibre muscolari dovuta ad una graduale azione degli enzimi autolitici presenti nel muscolo stesso. La fase di risoluzione del *rigor mortis* è dovuta alla lisi delle strutture proteiche del muscolo e non alla scissione dei legami actino-miosinici, formati in seguito alla mancanza di energia (ATP).

Sebbene l'attività autolitica sia la causa primaria della modificazione *post-mortem* del pesce, la degradazione del tessuto muscolare è un fenomeno principalmente di natura microbiologica. La microflora primaria responsabile di queste degradazioni è del tipo gram negativa ed aerobia (*Alteromonas*, *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Moraxella* e *Acinetobacter*), alla quale si aggiunge una microflora secondaria di batteri gram positivi (*Micrococcus*, *Bacillus* e *Lactobacillus*) (Gram e Huss, 1996). La microflora primaria è costituita da microrganismi tipici dell'ambiente di crescita del prodotto pescato, mentre la microflora secondaria deriva da contaminazioni accidentali, in seguito a manualità non corrette o contatto diretto con materiale già contaminato. Gli enterococchi fanno parte della microflora secondaria, in particolare *Escherichia coli* e *Salmonella spp.* sono microrganismi per i quali è necessaria un'accurata profilassi, in quanto altamente dannosi per l'organismo umano.

Secondo lo studio effettuato da Poli (1999b), gli effetti macroscopici della proliferazione delle specie batteriche cominciano ad essere apprezzabili visivamente quando le stesse raggiungono valori di popolazione di 10^5 - 10^7 UFC/g (Unità Formanti Colonia) e, indicativamente, entro il settimo giorno dalla morte del pesce. La proliferazione batterica dà luogo alla produzione di metaboliti secondari con odori e colori caratteristici, come ammoniaca, trimetilammina ed ammine biogene. Le attività degli enzimi endogeni (propri del

1. Introduzione

pesce), proteasi, catepsine e peptidasi giocano un ruolo fondamentale della degradazione di proteine e peptidi, creando un ambiente ideale per la successiva proliferazione microbica. Inoltre, nel caso non si provveda prontamente all'eviscerazione del pesce si ha il trasferimento di proteasi dal tratto digerente al tessuto muscolare.

Nel pesce, l'attività batterica in un primo momento porta ad una decomposizione che conferisce al pesce stesso odori gradevoli (di frutta); in seguito ad ulteriore degradazione di composti azotati, aminoacidi, grassi e zuccheri, si sviluppano odori sgradevoli, dovuti alla formazione di nuove molecole, quali ammoniaca, trimetilammina e idrogeno solforato. I composti responsabili di odori e sapori sgradevoli si originano principalmente dalla degradazione di composti azotati proteici e non proteici oltre che dei lipidi. La degradazione dei glucidi influisce invece in misura limitata.

La degradazione dei composti azotati proteici inizia con la degradazione di proteine e peptidi da parte di enzimi endogeni, le catepsine di tipo D. Nel caso di animali non eviscerati, oltre alla catepsine D, si ha la liberazione di enzimi presenti nel tratto terminale dell'apparato digerente, quali l'endopeptidasi tripsino-simili ed altri enzimi pepsino-simili di provenienza gastrica.

I composti azotati non proteici maggiormente presenti nella carne di pesce sono ossido di trimetilammina (TMAO), nucleotidi, ammoniaca e derivati degli aminoacidi. L'ossido di trimetilammina è un composto tipico dei pesci marini con concentrazioni variabili dall'1 al 7% del peso secco nel tessuto muscolare, mentre è presente solo in tracce nella carne di pesce d'acqua dolce. La sua forma ridotta, trimetilammina (TMA), è responsabile del tipico "odore di pesce". L'ossido di trimetilammina ha origine alimentare da fonti zooplanctoniche o endogena derivante dal catabolismo proteico. La degradazione del TMAO a TMA è favorita dall'anaerobiosi, per cui nelle preparazioni a base di pesce conservate sottovuoto o in atmosfera modificata, il rischio risulta più elevato (Gram e Huss, 1996). La riduzione del TMAO è di origine batterica, mentre solo nel caso in cui la microflora venga inibita con il congelamento risulta evidenziabile l'attività delle metilasi endogene. A partire da TMAO si produce, come visto, TMA e, per successive degradazioni, si giunge alla di-metilammina (DMA) e in seguito alla formaldeide responsabile del tipico odore di pesce avariato. La formaldeide, inoltre, intacca le miofibrille del tessuto muscolare con deterioramento della tessitura e perdita di liquidi.

1. Introduzione

Per quanto riguarda i nucleotidi, come già accennato, la degradazione dell'ATP provoca la formazione di inosina mono-fosfato (IMP), responsabile del tipico odore di carne. L'ulteriore degradazione dell'IMP porta alla formazione di ipoxantina, responsabile del sapore amaro del pesce ormai non più fresco.

La formazione di ammoniaca è generalmente ridotta nella carne di pesce, tranne che per gli Elasmobranchi (squali, razze, torpedini), i quali hanno una concentrazione particolarmente elevata di urea a livello cutaneo. L'ammoniaca prodotta ha origine dalla deaminazione di aminoacidi liberi e provoca un odore sgradevole nel pesce (Serrini e Luzzana, 1994). I principali aminoacidi responsabili di odori e sapori anomali nella carne di pesce sono arginina, leucina, lisina, prolina, metionina e cisteina. Questi aminoacidi possono venire degradati per azione batterica, con deaminazioni e decarbossilazioni successive, dando luogo a composti solforati, quali l'idrogeno solforato, dall'odore di uova marce, e ammine biogene, composti tossici dall'odore e sapore sgradevole (Gram e Dalgaard, 2002).

Le modificazioni a carico della componente lipidica del pesce sono principalmente dovute a processi idrolitici e processi autossidativi. L'autossidazione nella carne di pesce è importante per l'elevato contenuto di acidi grassi polinsaturi che vengono facilmente ossidati a idroperossidi, per l'elevata reattività dei doppi legami della catena carboniosa. Gli idroperossidi, in seguito ad ulteriori processi ossidativi, vengono scissi in composti organici a corta catena.

Dall'autossidazione degli acidi grassi si ottengono composti dall'odore e sapore molto sgradevoli, quali aldeidi e chetoni, derivati furanici ed idrocarburi volatili. Le sostanze volatili che si originano, come le aldeidi 3-cis-esenale e 2-trans, 6-cis-nonadienale, conferiscono alla carne di pesce un odore sgradevole anche a dosi molto ridotte (alcuni mg per 100 g di parte edibile). Questi composti partecipano inoltre all'alterazione della colorazione della carne, dal giallo al verde più o meno carico.

I processi idrolitici sono processi catabolici a carico dei trigliceridi, che avvengono durante la lavorazione e conservazione del pesce. Il fenomeno di idrolisi dei trigliceridi è svolto principalmente da lipasi batterica dei generi *Achromobacter* e *Pseudomonas* e, in piccola parte, da lipasi endogene. Il processo idrolitico consiste nella rottura del legame estere tra il glicerolo e l'acido grasso, con conseguente aumento degli acidi grassi liberi, più suscettibili all'ossidazione.

1. Introduzione

1.4.2. Metodi di valutazione della freschezza

Oltre agli aspetti nutrizionali, le proprietà sensoriali ed edonistiche del pesce allevato assumono una rilevanza non trascurabile ai fini della percezione e discriminazione qualitativa dei prodotti dell'acquacoltura. L'analisi sensoriale consente di valutare le caratteristiche organolettiche apprezzate direttamente all'atto del consumo, in modo simile al consumatore.

Molti studi condotti su pesci allevati si sono principalmente incentrati sull'applicazione di griglie valutative applicate allo scadimento o involuzione della freschezza, misurata sia con metodi sensoriali che strumentali, soprattutto in relazione ai metodi e tempi di cattura e conservazione *post-mortem* (Poli e col., 2001). Vi sono al contrario pochi studi dove proprietà sensoriali verificate strumentalmente (misure reologiche, colore, tessitura, tenerezza) o attraverso *panel tests* siano state messe in correlazione con il tipo di dieta o le tecniche e sistemi di allevamento praticati (Pottinger, 2001).

Le preferenze dei consumatori non sono solo legate alle classificazioni di qualità intrinseca dei prodotti; altrettanto importanti sono le aspettative e le percezioni del consumatore, in accordo con la definizione di qualità contenuta nelle norme ISO. Per questo, utilizzando i metodi dell'analisi sensoriale edonistica, attraverso prove di consumo, si possono valutare le percezioni di qualità del consumatore *ex-ante* ed *ex-post* rispetto al consumo (Meilgaard e coll., 1991).

Le analisi sensoriali per valutare la freschezza del pesce sono regolamentate a livello comunitario dal Regolamento EC 76/103 e dalla Direttiva 91/493 (attuati in Italia con il Decreto Legislativo 531/92), successivamente armonizzati nel Regolamento EC 2406/96. Secondo tale regolamento il pesce viene valutato e classificato nella sua globalità in quattro categorie di freschezza ("Extra", "A", "B" e "Non ammesso al consumo") in funzione di determinate caratteristiche organolettiche relative a pelle, muco, occhio, branchie, addome, odore, ecc. (vedi Tabella 3.2).

Lo schema di valutazione UE presenta, però, alcune limitazioni principalmente dovute al fatto che non tiene conto delle differenze esistenti tra le diverse specie. Il QIM (*Quality Index Method*), adattato specificatamente per le 22 specie ittiche di maggior consumo mondiale, è in grado di superare queste difficoltà (Poli, 1999b; Barbosa e Vaz Pirez, 2004).

Tale metodo si basa sull'osservazione di caratteristiche sensoriali del campione in base ad alcune variabili, il cui numero dipende dalla specie in esame, raggruppate in categorie; si ottiene una classificazione di demerito da 0 fino ad un valore massimo che dipende dalla specie

1. Introduzione

e dal numero di caratteristiche considerate, con punteggio crescente all'avanzare della degradazione del pesce. Per la spigola sono stati sviluppati diversi schemi QIM che prevedono punteggi massimi differenti, da 39 (Alasalvar e coll., 2001) a 22 (Knowles e coll., 2007) (vedi Tabelle 3.3 e 3.4). Il metodo QIM può venire applicato anche per cefalopodi, come il polpo (Barbosa e Vaz Pirez, 2004).

Le prime analisi strumentali ad essere sviluppate riferite alla freschezza del pesce sono state quelle di tipo microbiologico. La conta microbica totale è un parametro molto considerato per la sua diretta correlazione con l'insorgenza di alterazioni nel sapore e nella consistenza della carne di pesce, anche se non sempre queste rispecchiano l'effettivo livello di deterioramento del pesce. L'approccio microbiologico è quello attualmente di maggiore impiego, concepito come metodo di analisi a se stante o, meglio, integrato con l'analisi dei cataboliti dell'ATP.

Un metodo alternativo è la determinazione della fluorescenza della carne di pesce. Gli anelli degli aminoacidi aromatici liberi (fenilalanina, tirosina e triptofano), se colpiti da una radiazione con lunghezza d'onda di 250-260 nm, emettono una radiazione a 320-330 nm, direttamente proporzionale alla loro concentrazione nel campione. Inoltre la fluorescenza emessa dagli acidi nucleici ha un'intensità di 100 volte inferiore a quella del triptofano. La tecnica della fluorescenza risulta molto conveniente per la sua stretta correlazione con i giorni di conservazione del pesce, per l'applicabilità in linea produttiva e per la velocità di risposta (Dufour e coll., 2003).

La determinazione delle sostanze volatili prodotte, come l'azoto basico volatile totale (TVBN) o l'ossido di trimetilammina (TMAO) e suoi cataboliti, pur essendo più affidabili presentano alcuni svantaggi come l'elevato tempo necessario per l'analisi e la differenza esistente tra le varie specie ittiche (Sadok e coll., 1996). Il principio si basa sulla determinazione dei cataboliti prodotti dalle reazioni a catena che si avviano immediatamente dopo la morte dell'animale.

Un altro metodo molto utilizzato è la determinazione dei cataboliti dell'ATP e la valutazione dell'indice k . Il metodo si basa sulla degradazione dell'ATP in vari cataboliti: ADP, AMP, IMP, inosina ed ipoxantina. L'indice k può essere utilizzato come indice di freschezza (Alasalvar e coll., 2002), adattabile alle varie specie ittiche in quanto non esistono grosse differenze di degradazione dell'ATP tra le stesse (Nanyjo e coll., 2002).

1. Introduzione

1.5. Contaminanti ambientali

Per inquinamento si intende ogni modificazione che si verifica in presenza di sostanze in quantità e caratteristiche tali da alterare le normali condizioni ambientali e costituire pericolo per l'uomo, le risorse biologiche e l'ecosistema. Le tre principali fonti di contaminazione ambientale sono rappresentate dalle attività domestiche, agricole ed industriali.

L'inquinamento delle acque di pesca deriva dall'introduzione diretta o indiretta, per opera dell'uomo, di sostanze o energia capaci di provocare effetti deleteri quali danni alle risorse biologiche ed alla salute dell'uomo, ostacoli alle attività economiche di sfruttamento, compresa la pesca e deterioramento della qualità delle acque dal punto di vista della loro utilizzazione.

Possiamo avere un inquinamento naturale di fondo dovuto all'erosione geologica naturale e un inquinamento non naturale o xenobiotico da acque luride, rifiuti industriali, biocidi, idrocarburi, oli minerali, termico e radioattivo.

Si possono individuare alcune principali classi di contaminanti rilevanti dal punto di vista tossicologico ed ambientale. La classe probabilmente più vasta è quella dei cosiddetti "microinquinanti organici". In questa classe vengono generalmente compresi i pesticidi, i fitofarmaci, i policlorobifenili (PCB) ed altri composti clorurati, le diossine, gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA), gli idrocarburi di origine petrolifera, i fenoli, ecc.

Bisogna poi tener presente molte specie ioniche quali nitriti, nitrati, fosfati, ioni ammonio (generalmente classificate insieme al carbonio organico come "nutrienti"), cloruri, fluoruri, solfati, ecc.

Infine, è necessario considerare gli elementi minerali, generalmente raggruppati in tre classi: maggiori o macro-elementi (calcio, magnesio, sodio e potassio), minori o oligo-elementi (manganese, ferro, ecc.) e "in traccia" o micro-elementi, alcuni di questi ultimi effettivamente rilevanti da un punto di vista tossicologico ed ambientale. Nell'ambito degli elementi in traccia, quelli di maggior rilievo dal punto di vista tossicologico/ambientale vengono, in modo non molto corretto, chiamati "metalli pesanti" (dall'inglese *heavy metals*).

Nel 1992 i governi di tutto il mondo si sono riuniti a Rio de Janeiro per discutere dei problemi ambientali riguardanti la salute dell'intero pianeta. Tra questi c'era il problema dell'inquinamento globale da prodotti chimici industriali chiamati POPs (*persistent organic pollutants*) o inquinanti organici persistenti. I POPs, prodotti chimici a base di carbonio

1. Introduzione

(organici), sono dei composti o delle miscele ad elevata tossicità, persistenti nell'ambiente per lungo tempo, bioaccumulabili nei tessuti grassi degli organismi viventi, in grado di coprire lunghe distanze attraverso l'aria o l'acqua e che tendono a migrare dalle zone calde verso le parti più fredde del globo.

I POPs, prodotti e sottoprodotti delle attività umane, sono di origine relativamente recente. Prima della metà del XX secolo, contaminanti con queste caratteristiche di nocività erano praticamente inesistenti nell'ambiente e nei prodotti alimentari. La produzione di questi contaminanti cominciò negli anni immediatamente seguenti al secondo conflitto mondiale con un aumento della produzione di agenti chimici e dei loro sottoprodotti. Da allora sono diventati contaminanti ubiquitari, rintracciabili quindi in tutto il mondo.

Tra i contaminanti organici ritenuti più pericolosi, 12 molecole o gruppi di molecole organiche contenenti cloro sono stati individuati come bersaglio di una iniziale azione globale: tra questi 9 pesticidi (aldrina e dieldrina, endrina, clordano, DDT, eptacloro, mirex, toxafene, esaclorobenzene) e 3 gruppi di prodotti chimici industriali, ossia i policlorobifenili (PCB), le policlorodibenzodiossine (PCDD) e i policlorodibenzofurani (PCDF). Tutti questi composti sono stati banditi o hanno subito delle ferree restrizioni in molti paesi, anche se, a causa della loro persistenza nell'ambiente unita all'elevata tossicità anche a basse concentrazioni e alla loro diffusione mondiale, rappresentano ancora una grave minaccia per la salute di tutti gli esseri viventi.

1.5.1. Policlorobifenili (PCB) e altri organoclorurati

A partire dai primi anni '40, i composti organoclorurati (composti organici a struttura notevolmente diversificata che presentano uno o più atomi di cloro nella molecola) hanno avuto un significativo ruolo nello sviluppo di sostanze di larghissimo impiego industriale. I composti organoclorurati di maggiore diffusione sono stati i PCB e il DDT (e similari). Nella seconda metà degli anni '60, dopo decenni di utilizzo indiscriminato e scarsamente regolamentato, sono stati sollevati dubbi e allarmi legati alla persistenza e all'accumulo di tali composti nell'ambiente e ai rischi per l'uomo e l'ecosistema.

Le tre principali categorie di composti organoclorurati presenti come contaminanti nell'ambiente sono:

- insetticidi e formulati per l'agricoltura quali DDT e analoghi, ciclodieni e derivati, idrocarburi clorurati vari (es. lindano);

1. Introduzione

- policlorobifenili (PCB), prodotti industrialmente come miscele tecniche;
- policlorodibenzodiossine (PCDD), come la 2,3,7,8 tetraclorodibenzodiossina (comunemente detta diossina), e policlorodibenzofurani (PCDF), sottoprodotti della sintesi di composti organoclorurati o della combustione dei rifiuti (Smith e Gangolli, 2002).

I PCB sono stati la prima categoria di composti organoclorurati ampiamente prodotti e utilizzati dall'industria. Sintetizzati per la prima volta in Germania nel 1881 e rimasti pressoché inutilizzati per mezzo secolo, a partire dal 1930 hanno goduto di costante aumento di produzione industriale non solo in Germania ma anche negli Stati Uniti, Giappone e Italia (Beretta, 1994).

Le ragioni che hanno decretato la diffusione e il successo delle miscele di PCB in un amplissimo campo di applicazioni industriali sono da ricercarsi nella facilità di reperimento di gas contenenti cloro, nel basso costo dei processi di sintesi e nelle proprietà peculiari di questi composti. Presentano, infatti, elevata stabilità termica, resistenza agli alcali e agli acidi, solubilità in oli e sostanze apolari, insolubilità in acqua, costanti dielettriche e termiche elevate, non sono corrosivi, sono poco volatili e si spandono facilmente sulle superfici ricoprendole con pellicole difficilmente evaporabili; posseggono, inoltre, notevoli proprietà ignifughe.

I PCB hanno trovato principale applicazione in sistemi chiusi come fluidi dielettrici per trasformatori e condensatori e come conduttori di calore per apparecchi per riscaldamento e raffreddamento. In sistemi aperti sono stati utilizzati come sostanze ignifughe e come additivi per impartire resistenza, stabilità, elasticità ed isolamento elettrico ad oli lubrificanti, colle, vernici, inchiostri, asfalto, fibre sintetiche, plastiche e gomme. Sono anche stati inseriti nella formulazione di anticrittogamici e fertilizzanti (Beretta, 1994; Rocca e Bracali, 1997; Smith e Gangolli, 2002).

I PCB sono stati prodotti come miscele complesse di molecole bifeniliche caratterizzate da diverso numero e posizioni di sostituzioni con atomi di cloro (ciascuna combinazione che si può originare viene detta congenere), attraverso la clorurazione degli anelli benzenici fino al raggiungimento di una determinata percentuale in peso di cloro. Le miscele commerciali con più elevate percentuali di cloro contengono in maggiore proporzione i congeneri con il maggior numero di sostituzioni con atomi di cloro. In dette miscele, tuttavia, sono presenti in genere tutti i possibili 209 congeneri.

Le miscele più comunemente usate appartengono alla serie prodotta sotto la denominazione commerciale "Aroclor", di proprietà della Monsanto Corporation. Ciascun

1. Introduzione

formulato Aroclor viene identificato da un numero a quattro cifre delle quali le prime due indicano la natura del materiale (12-- per PCB, 25-- per miscele di PCB e policloroterfenili in proporzione 75:25, 44-- miscele di PCB e policloroterfenili in proporzione 60:40, 54-- per policloroterfenili) e le ultime due indicano il contenuto in cloro (es. Aroclor 1254 è una miscela di policlorobifenili contenente il 54% di cloro in peso) (Deshpande e coll., 2000; U.S. EPA, 2009a).

In sede di indagine di contaminazione, le proporzioni tra congeneri riscontrate nelle matrici organiche non corrispondono alle formulazioni commerciali che ne costituiscono la sorgente di inquinamento ambientale. Il fenomeno è spiegabile con le parziali degradazioni ad opera degli agenti fisico-chimici e con gli accumuli, le metabolizzazioni, le escrezioni che gli organismi vegetali e animali hanno operato lungo la catena alimentare (U.S. EPA, 1996).

1.5.2. Caratteristiche chimiche e fisiche delle molecole di PCB

La molecola di policlorobifenile (formula bruta $C_{12}H_{10-n}Cl_n$) è costituita da due anelli benzenici legati covalentemente da un ponte ossigeno. Ciascuno dei 10 atomi di idrogeno legati agli atomi di carbonio degli anelli benzenici può essere sostituito da un atomo di cloro, dando luogo a 209 possibili combinazioni dette congeneri. Congeneri aventi lo stesso numero di atomi di cloro, ossia lo stesso grado di clorurazione, sono detti isomeri o omologhi.

Le dieci posizioni degli atomi di idrogeno sono numerate da 2 a 6 su un anello e da 2' a 6' sull'altro, a partire dal legame ossigeno (Figura 1.18). Le posizioni 2, 6, 2', 6' sono denominate posizioni orto; le posizioni 3, 5, 3', 5' sono denominate posizioni meta; le posizioni 4, 4', le più esterne sono dette para (U.S. EPA, 2009b).

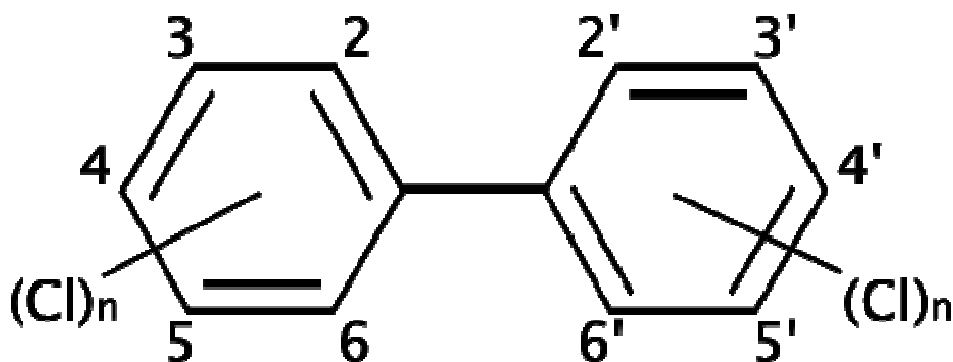


Figura 1.18. Molecola di policlorobifenile

1. Introduzione

Il numero di atomi di cloro e la posizione da essi assunta determina le proprietà chimiche, fisiche e biologiche di ciascun congenere: ad esempio il punto di ebollizione (variabile fra 278 e 415°C), la viscosità, la solubilità nei grassi e nei solventi organici aumentano con il grado di clorurazione. In linea generale, tutti i PCB sono dotati di elevata stabilità termica e resistenza agli alcali e agli acidi, si decompongono in acido cloridrico e anidride carbonica a temperature superiori agli 800°C, sono solubili in oli e sostanze apolari e insolubili in acqua (Beretta, 1994).

1.5.3. Nomenclatura dei PCB

Per ciascun congenere di PCB, tranne che per il decaclorobifenile nel quale tutte le posizioni sono sostituite con cloro, è possibile numerare gli atomi di cloro sostituenti in diversi modi: ad esempio il 2, 3', 4' triclorobifenile è il medesimo congenere del 2', 3, 4 triclorobifenile e del 2, 4', 5' triclorobifenile. Ciò è dovuto alla possibilità dei due anelli benzenici di ruotare assialmente rispetto al ponte ossigeno. La convenzione adottata dalla IUPAC prevede che per ciascun congenere venga preferita la numerazione degli atomi di cloro che inizia con il numero più basso, considerando, inoltre, che un numero seguito dal simbolo ' viene considerato maggiore rispetto allo stesso numero non seguito dall'apostrofo stesso. Relativamente all'esempio riportato sopra, si preferisce la nomenclatura 2, 3', 4' triclorobifenile piuttosto che 2', 3, 4 triclorobifenile o 2, 4', 5' triclorobifenile.

Ballschmiter e Zell (1980) hanno introdotto una regola diversa: i numeri seguiti dal simbolo ' non possono essere più alti di quelli non seguiti dal simbolo ', dunque la nomenclatura 2', 3, 4 triclorobifenile è preferita alle altre due. Per tali ragioni la nomenclatura IUPAC e quella proposta da Ballschmiter e Zell differiscono su alcuni congeneri. Gli stessi Ballschmiter e Zell (1980) hanno introdotto un sistema di numerazione progressiva per i 209 congeneri in accordo con le regole sopra descritte e procedendo per gradi di clorurazione crescenti. Nel 1993 tale numerazione è stata rivista e unificata con quella IUPAC nella cosiddetta numerazione BZ & IUPAC in modo da ovviare alle reciproche incongruenze generate dalle diverse regole di nomenclatura che causavano un cambio nell'ordine progressivo dei congeneri (U.S. EPA, 2009c). La numerazione BZ & IUPAC è attualmente universalmente adottata e riconosciuta dalla comunità scientifica.

1. Introduzione

1.5.4. Aspetti molecolari dei PCB diossina-simili

Un aspetto strutturale di notevole importanza, principalmente tossicologica e di biostabilità, è la complanarità dei due anelli benzenici (entrambi gli anelli aromatici giacciono sullo stesso piano), che conferisce alla molecola proprietà simili alla 2,3,7,8 tetraclorodibenzodiossina (proprietà diossina-simili). Come sopra anticipato, la configurazione complanare è permessa dalla rotazione assiale dei benzeni rispetto al ponte ossigeno, movimento la cui libertà è progressivamente decrescente con l'aumentare degli atomi di cloro nelle posizioni orto (libertà decrescente dai non-orto ai mono-, di-, tri-, tetra-orto PCB) (Brower e coll., 1998). Esistono 12 congeneri (Tabella 1.8) propriamente detti diossina-simili, individuabili nell'intersezione dei raggruppamenti elencati sotto (WHO, 2000):

- 68 congeneri complanari, di cui 20 non-orto (nessuna sostituzione nelle posizioni 2, 6, 2', 6') e 48 mono-orto (solo un atomo di cloro in una delle posizioni 2, 6, 2', 6');
- 169 congeneri presentano 4 o più sostituzioni con atomi di cloro
- 54 congeneri presentano entrambe le posizioni para (4, 4') occupate da atomo di cloro;
- 140 congeneri presentano 2 o più sostituenti cloro nelle posizioni meta (3, 3', 5, 5').

Tabella 1.8. Congeneri di PCB diossina-simili (WHO, 2000)

Nome IUPAC	n.	nome IUPAC	n.
3,3',4,4'-tetraclorobifenile	77	3,3',4,4',5- pentaclorobifenile	126
3,4,4',5- tetraclorobifenile	81	2,3,3',4,4',5- esaclorobifenile	156
2,3,3',4,4'- pentaclorobifenile	105	2,3,3',4,4',5'- esaclorobifenile	157
2,3,4,4',5- pentaclorobifenile	114	2,3',4,4',5,5'- esaclorobifenile	167
2,3',4,4',5- pentaclorobifenile	118	3,3',4,4',5,5'- esaclorobifenile	169
2,3',4,4',5'- pentaclorobifenile	123	2,3,3',4,4',5,5'- eptaclorobifenile	189

1.5.5. Bioaccumulo dei PCB e normative di riferimento

In un contesto ecologico, alcuni dei principali vantaggi tecnologici delle miscele di PCB si trasformano in consistenti fattori di rischio ambientale: stabilità ad agenti fisici e chimici (solo alcuni isomeri sono degradati dalle radiazioni UV), resistenza alla biodegradazione (la degradazione microbica risulta pressoché inesistente a causa dell'elevato contenuto in cloro) e solubilità nei solventi apolari comportano la persistenza nell'ambiente dei PCB e l'accumulo lungo la catena trofica fino a costituire un rischio alimentare per l'uomo (Beretta, 1994).

Le principali sorgenti di contaminazione degli ecosistemi acquatici sono costituite dai rilasci di oli tecnici (direttamente nelle acque interne e costiere) e dai fumi e dai residui di

1. Introduzione

combustione industriale e di incenerimento (attraverso le precipitazioni atmosferiche) (Smith e Gangolli, 2002). Sebbene i PCB siano insolubili in acqua, particolarmente in quella marina, possono essere adsorbiti dal particolato organico e dai sedimenti acquatici che costituiscono la fonte alimentare di crostacei, molluschi bivalvi, gasteropodi e altri organismi bentonici (Bjork e Gilek, 1997). In tal modo, i PCB si inseriscono nella catena trofica. Le proprietà lipofile di questi composti ne determinano l'accumulo e la concentrazione nei tessuti grassi degli organismi, in maniera crescente procedendo verso i livelli più alti della catena stessa, fino ai pesci predatori e ai mammiferi marini, quali cetacei e foche (Salata e coll., 1995; Nakata e coll., 1997; Troisi e coll., 2001). Nella Figura 1.19 è schematizzata la produzione dei composti organoclorurati e la loro diffusione nell'ecosistema acquatico così come sopra descritte.

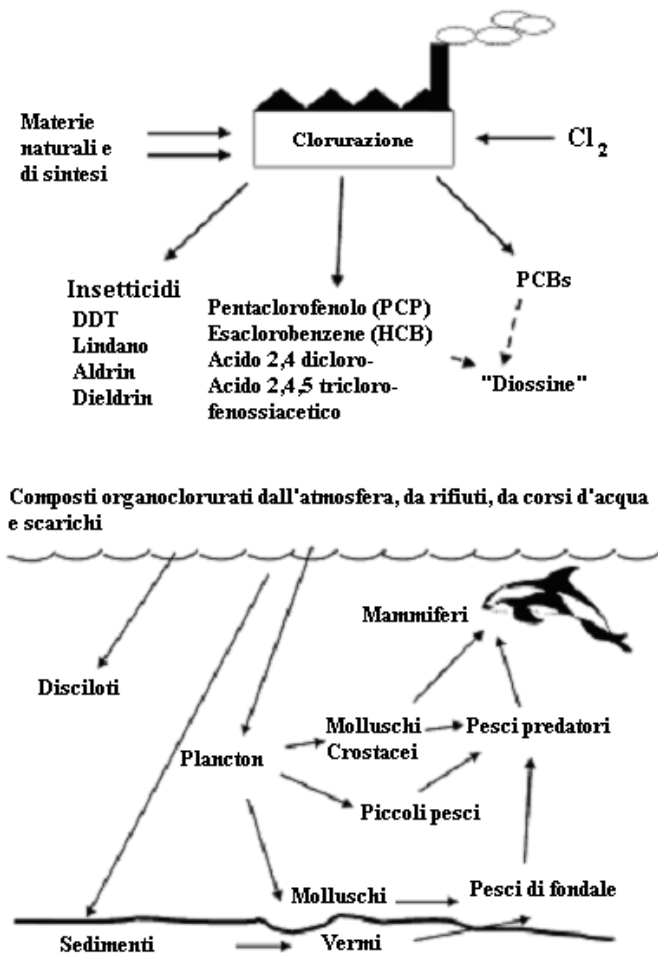


Figura 1.19. Produzione e distribuzione di composti organoclorurati nell'ambiente e loro accumulo nella catena trofica marina (Smith e Gangolli, 2002)

I PCB sono stati identificati per la prima volta in Svezia nel 1966 come xenobiotici presenti in campioni biologici (grasso di uccelli rapaci). Jensen e coll. (1969) hanno dimostrato la presenza di residui di PCB e DDT in quantità misurabili in pesci presso le acque costiere

1. Introduzione

della Svezia. Ulteriori indagini hanno evidenziato la presenza pressoché ubiquitaria di tali inquinanti negli ecosistemi, compresi quelli acquatici (Beretta, 1994; Smith e Gangolli, 2002). In seguito a questi e altri studi, accompagnati dalle prove che attestavano effetti cancerogeni sugli animali, è stata evidenziata la necessità di una regolamentazione restrittiva sull'impiego dei PCB.

A partire dal 1969, in seguito alla comparsa di episodi di intossicazioni di massa in allevamenti di polli, suini e visoni (in questi ultimi risultarono tossici gli scarti della lavorazione del salmone impiegati per l'alimentazione degli animali in allevamento) (Beretta, 1994), i PCB sono stati sottoposti a limitazione di vendita e utilizzazione negli USA. Nel 1977, ne sono state proibite la produzione e la commercializzazione (Steuer, 1999). La prima normativa europea concernente limitazioni nella produzione e nell'utilizzo dei PCB risale alla Direttiva 76/769/CE del 27 Luglio 1976, successivamente modificata dalla Direttiva 85/467/CE del 10 Ottobre 1985. Tali direttive vennero attuate in Italia mediante il DPR 216 del 24 maggio 1988 in recepimento della Direttiva 85/467/CE che prevedeva il divieto di immissione sul mercato e di uso nel territorio nazionale dei PCB, ad eccezione dei mono- e diclorurati, e dei preparati con contenuto di PCB superiore allo 0,01% in peso (percentuale ridotta dalle successive modifiche al Decreto). Il DPR consentiva l'uso dei PCB e dei loro preparati nei sistemi chiusi (es. condensatori) fino al termine della loro durata operativa. Entro la fine del 2010 tutte le apparecchiature contenenti PCB dovranno essere messe fuori servizio (Direttiva del Consiglio 96/59/CE).

La prima normativa che definì precisi limiti di tolleranza per le concentrazioni di PCB negli alimenti è stata emanata negli Stati Uniti nel 1972 ed è stata resa più restrittiva nel 1979 (Beretta, 1994). In Italia, facendo seguito alla contaminazione da organoclorurati in prodotti alimentari per uso umano e zootecnico avvenuta in Belgio nel maggio del 1999, l'Istituto Superiore di Sanità ha elaborato specifiche linee guida nelle quali viene fissata la soglia che discrimina il prodotto alimentare "verosimilmente esente" da quello "potenzialmente contaminato" da policlorodibenzodiossine (PCDD) e policlorodibenzofurani (PCDF) utilizzando come indicatore la concentrazione di PCB. Tale soglia è pari a 100 ng/g su base lipidica, se espressa come somma delle concentrazioni dei 7 congeneri di riferimento/indicatori (IUPAC n. 28, 52, 101, 118, 138, 153, 180), o 300 ng/g se espressa come somma delle concentrazioni di tutti i congeneri (I.S.S., 1999). Il provvedimento del Ministero della Sanità (prot. 600.3/SP.31/4920 16 agosto 1999), che riprende le indicazioni della Decisione della Commissione 1999/551/CE, sancisce i tenori massimi consentiti di PCB (espressi come somma

1. Introduzione

dei 7 congeneri indicatori) nelle carni bovine, suine, avicole e derivati pari a 200 ng/g su base lipidica e nel latte e derivati pari a 100 ng/g. Non sono stati indicati limiti per i prodotti ittici.

Le più recenti normative abbandonano la quantificazione dei PCB tramite la somma dei 7 indicatori e determinano i limiti massimi come sommatoria degli equivalenti tossici (TEQ, *toxic equivalency quantity*) delle concentrazioni di PCDD, PCDF e PCB diossina-simili. Ciascun congenere delle diossine o dei PCB diossina-simili presenta un diverso livello di tossicità in relazione a quella della 2, 3, 7, 8 tetraclorodibenzodiossina (TCDD), considerata unitaria (U.S. EPA, 1996).

Per poter sommare la tossicità dei diversi congeneri, è stato introdotto il concetto di fattori di tossicità equivalente (TEF, *toxic equivalency factor*), in modo da agevolare la valutazione del rischio e il controllo legislativo. I TEF sono coefficienti compresi tra 0 e 1, specifici per ciascuna sostanza e ne esprimono il potenziale tossicologico rispetto alla tossicità della 2, 3, 7, 8 tetraclorodibenzodiossina (TCDD), considerata unitaria (U.S. EPA, 1996). Ciò significa che i risultati analitici relativi a tutte le diossine e a tutti i PCB diossina-simili che suscitano preoccupazioni tossicologiche vengono espressi mediante un'unità quantificabile, ovvero in TEQ (tossicità equivalente di TCDD). Il valore del TEQ_C relativo ad un dato contaminante C si ottiene moltiplicando la sua concentrazione [C] per il fattore di tossicità equivalente (TEF_C) caratteristico del contaminante (TEQ_C = [C] × TEF_C). La contaminazione totale di un campione si esprime, come già anticipato, con la sommatoria dei TEQ dei PCDD, PCDF e PCB diossina-simili rilevati nel campione.

Il Regolamento EC 199/2006 della Commissione del 3 febbraio 2006 sancisce nel muscolo di pesce, prodotti della pesca e loro derivati, ad eccezione dell'anguilla, un limite massimo di ΣTEQ pari a 8,0 pg/g sul peso fresco.

1.5.6. Assunzione di PCB da parte dell'uomo dai prodotti ittici e tossicologia

L'assunzione dei PCB per l'uomo avviene per più del 90% attraverso l'ingestione di alimenti contaminati. I prodotti ittici costituiscono la principale fonte di PCB assunti nella dieta e in particolare i pesci grassi come ad esempio sgombri (Tsutsumi e coll., 2001).

La quantità di PCB ingerita può dipendere dalla modalità di preparazione del prodotto ittico: la rimozione delle parti più grasse (es. pelle del pesce), la bollitura e la grigliatura (che consentono la perdita di molto grasso) comportano una riduzione della concentrazione di contaminanti nell'alimento. Nei processi di produzione degli oli di pesce, i composti

1. Introduzione

organoclorurati vengono estratti e concentrati assieme alla frazione lipidica, entrando così nella formulazione di prodotti alimentari e farmaceutici (Smith e Gangolli, 2002).

I livelli di PCB riscontrati nel plasma e nel latte umano, ottimi indicatori di esposizione, sono fortemente correlati con il consumo di pesce. Un consumo superiore a 100 g di pesce per settimana da parte di madri in allattamento si risolve in un contenuto di PCB nel latte superiore rispetto a madri sottoposte a diete con minori apporti di pesce (Alcock e coll., 1998; Brouwer e coll., 1998; Schade e Heinzow, 1998). Nella popolazione i gruppi maggiormente esposti sono i consumatori abituali di prodotti ittici e i neonati (sia per l'ingestione di latte materno, che per l'assunzione di preparati nella cui formulazione rientrano oli di pesce) (Smith e Gangolli, 2002).

Gli effetti tossici dei PCB sono molteplici e dipendono dal grado di clorurazione della molecola bifenilica, dalle posizioni sostituite, dalla durata e dall'intensità dell'esposizione. I PCB vengono definiti, in generale, "modulatori endocrini", agendo negativamente sull'attività della tiroide e sulle funzioni riproduttive. Alcuni studi hanno dimostrato che i bambini esposti a contaminazioni di PCB nella fase pre-parto attraverso la membrana placentare e nella fase post-parto attraverso l'allattamento presentano ridotto quoziente intellettivo, difficoltà e ritardi cognitivi e neuromotori (Brouwer e coll., 1998; Smith e Gangolli, 2002).

I 12 PCB diossina-simili possiedono un meccanismo d'azione del tutto simile alla diossina, data la loro simile struttura complanare, agendo come induttori delle idrossilasi degli idrocarburi acrilici (AHH) la cui attività è correlata a cloracne, danni epatici, teratogenicità, immunotossicità e cancerogenicità (Smith e Gangolli, 2002).

La tossicità dei PCB è, in genere, notevolmente inferiore rispetto ad altri composti organoclorurati quale la 2,3,7,8 tetraclorodibenzodiossina, ma la maggiore concentrazione dei PCB negli alimenti contaminati può portare ad un'equivalenza del rischio di intossicazione. Non trascurabile è la constatazione che nelle miscele industriali di PCB sono presenti anche sottoprodotti formati nei processi di sintesi, come policlorodibenzodiossine (PCDD, tra le quali si annovera la diossina) e dibenzofurani (PCDF) che agiscono come fattori sinergici di nocività (Beretta, 1994; U.S. EPA, 1996; Alcock e coll., 1998).

1. Introduzione

1.5.7. Accumulo di PCB nelle spigole

In generale, la letteratura riporta un aumento delle concentrazioni di PCB nelle carni di pesce di diverse specie di cattura all'aumentare della vicinanza a zone ad alto impatto industriale.

La spigola, pesce carnivoro che si ciba di altri pesci, piccoli crostacei e invertebrati, si trova all'apice della catena trofica ed è dunque esposta all'accumulo di contaminanti liposolubili. In Figura 1.20 è schematizzata la struttura della catena trofica della spigola (Loizeau e coll., 2001). Il processo di bioaccumulo si realizza tramite l'interazione delle funzioni biologiche del pesce: l'assorbimento dei PCB avviene prevalentemente con l'ingestione di alimento, mentre l'assunzione per via branchiale contribuisce per meno del 10%. Le funzioni che intervengono nella diminuzione del bioaccumulo sono l'escrezione fecale e la riproduzione, che comporta una perdita di contaminanti mediante trasferimento alle uova (Loizeau e coll., 2001).

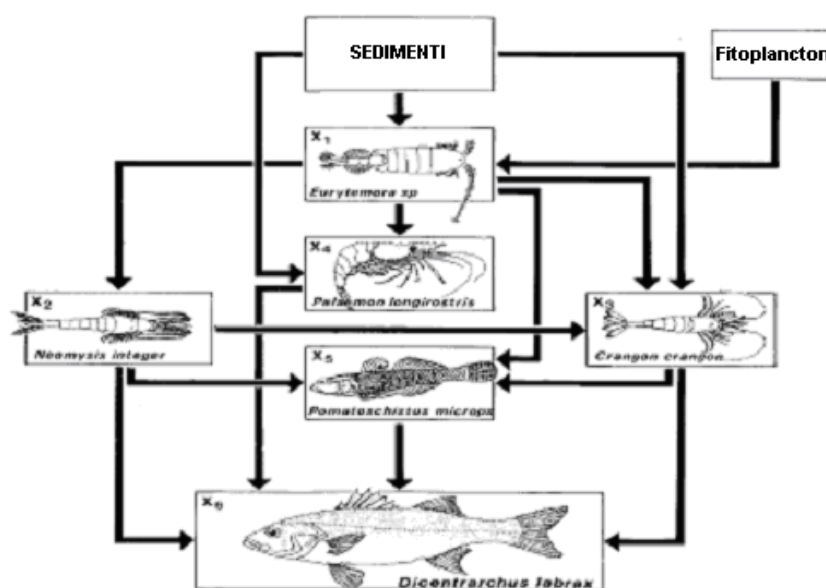


Figura 1.20. Struttura schematica della catena trofica della spigola (Loizeau e coll., 2001)

L'allevamento della spigola prevede la creazione di una catena trofica artificiale composta dal mangime, dai pesci allevati e dall'uomo come consumatore finale. Ciò comporta l'emergere di ulteriori aspetti relativi al bioaccumulo. L'alimento, che rappresenta la principale via di assunzione dei contaminanti, consiste in mangimi preparati da farine di pesce miscelate con olio di pesce, caratterizzati da tenori in grasso molto elevati (fino e oltre il 20%) e con concentrazioni e profili di PCB tipici della zona di prelievo. I PCB vengono quindi

1. Introduzione

“importati”, svincolando l’eventuale contaminazione del pesce dall’inquinamento dell’area in cui vive. Per il maggiore contenuto lipidico della dieta e la maggiore quantità di alimento assunto giornalmente, il pesce allevato presenta inoltre un contenuto di grasso più elevato rispetto agli animali di cattura e, conseguentemente, un potenziale di accumulo di contaminanti superiore (Serrano e coll., 2003; Antunes e Gil, 2004).

Recenti studi hanno dimostrato come la sostituzione dell’olio di pesce con olio vegetale nella formulazione dei mangimi possa portare ad una netta riduzione delle concentrazioni di contaminanti organoclorurati nella carne di pesce. Tuttavia, è stata osservata una contemporanea diminuzione del contenuto di PUFA ω -3 a discapito del valore nutrizionale del pesce (Behrntssen e coll., 2005; Bell e coll., 2005).

Secondo alcuni modelli, la crescita dell’animale viene considerata come un fattore negativo di bioaccumulo agendo come processo di diluizione; secondo altri modelli (sviluppati per altri pesci), la crescita comporta invece una crescente assunzione di alimento contaminato e conseguentemente maggiori acquisizione e concentrazione di contaminanti (Loizeau e coll., 2001). Le diminuzioni del contenuto di PCB, che si verificano attraverso la deposizione delle uova, costituiscono variazioni stagionali, poiché vengono pressoché compensate nel periodo successivo con l’aumento dell’alimentazione per ricostituire le riserve energetiche (Loizeau e coll., 2001).

1.5.8. *Metalli pesanti*

Come accennato, nell'ambito dei micro-elementi, quelli di maggior rilievo dal punto di vista tossicologico/ambientale vengono arbitrariamente chiamati “metalli pesanti” in quanto presentano densità superiori a 5 g/cm³. La maggior parte dei metalli pesanti è molto tossica anche grazie ad alcune caratteristiche quali idrosolubilità, rapido assorbimento nelle piante e nei tessuti animali, bioconcentrazione e legame alle biomolecole (proteine e acidi nucleici). I metalli pesanti generalmente considerati in studi ambientali sono mercurio, cadmio, arsenico, piombo, rame, nichel, cromo e, in misura minore, vanadio, cobalto e bario.

All'interno del gruppo dei metalli pesanti bisogna fare una distinzione in base agli effetti sugli organismi e sulla salute dell'uomo (Geldmacher-Von Mollinkrodt, 1991) per cui possiamo riconoscere elementi tossici ed elementi essenziali.

1. Introduzione

Gli elementi tossici sono quelli che hanno effetto tossico e la gravità delle patologie causate è proporzionale alla concentrazione del metallo ed alla durata di esposizione all'inquinante. A questa classe appartengono elementi come mercurio e cadmio.

Gli elementi essenziali sono quelli che, in apporti insufficienti, possono compromettere una o più funzioni vitali dell'organismo, mentre il ritorno dello stesso elemento a livelli fisiologici determina la scomparsa della patologia rilevata. Tuttavia, un apporto eccessivo può determinare effetti negativi, facendo assumere al metallo caratteristiche di tossicità (selenio e cobalto).

Gli elementi essenziali possono a loro volta essere suddivisi in tre sottogruppi:

- elementi con dimostrate funzioni essenziali e di cui un apporto giornaliero insufficiente causa effetti negativi alla salute dell'uomo (fluoro, cromo, ferro, rame, zinco, selenio, iodio, cobalto);
- elementi per i quali sono stati studiati i danni derivanti da un apporto insufficiente solo negli animali e nelle piante (silicio, manganese, cobalto, nichel, molibdeno);
- elementi con funzioni essenziali "supposte", dei quali non si conoscono ancora i meccanismi d'azione (arsenico, vanadio, stagno, antimonio).

I metalli possono essere presenti in acqua/sedimenti come ioni liberi solubili in acqua, come complessi solubili organici e inorganici, come specie ioniche facilmente scambiabili, come precipitati di ossidi e idrossidi, co-precipitati con idrossidi colloidali di ferro e manganese, come complessi organici insolubili, come solfuri insolubili e come forme residuali della roccia madre. In confronto ai contaminanti organici non polari, le dinamiche di scambio dei metalli e metalloidi tra i sedimenti e le acque interstiziali e superficiali sono particolarmente complesse (Frascari e coll., 1984; Guerzoni, 1990; Power e Chapman, 1992; Silvestroni, 1992; Gupta e Aten, 1993; Chen e coll., 1996). Il destino dei metalli pesanti nell'ambiente è un fenomeno estremamente complesso poiché essi sono sottoposti ad equilibri in continua evoluzione migrando da un comparto ambientale all'altro (Engler e coll., 1977; Fjeld e coll., 1994).

I principali fattori che influenzano la forma chimica del metallo in acqua sono il pH, il livello di sostanze organiche, il potenziale di ossidoriduzione e la salinità. La mobilità e la biodisponibilità dei metalli presenti nei sedimenti possono quindi essere influenzate (ed aumentate) principalmente da quattro fattori: 1) abbassamento di pH, 2) cambiamento delle condizioni redox, 3) formazione di complessi organici e 4) aumento della salinità.

1. Introduzione

I metalli, infatti, non sono permanentemente legati al sedimento, ma possono essere rimobilizzati da agenti chimici e/o biologici. Ne consegue che la "rilevanza ecologica" dei metalli nei sistemi sedimento/acqua è determinata dalla loro mobilità, piuttosto che dalla loro concentrazione nel substrato (Jones e Turky, 1997).

1.5.8.1. Mercurio

Il mercurio (Hg) è un elemento relativamente abbondante in tutta la crosta terrestre, naturalmente presente in alcuni minerali tra cui il più diffuso è il cinabro (HgS). Le particolari proprietà chimico-fisiche del mercurio (stato liquido a temperatura ambiente, elevata densità e tensione superficiale, conducibilità ed espansione uniforme al calore) rendono questo metallo utile in numerose lavorazioni industriali ed è insostituibile in diverse apparecchiature.

È stabile a temperatura ordinaria e non reagisce con aria, ossigeno, anidride carbonica o biossido di azoto, mentre si combina con alogeni e viene attaccato dall'acido solforico concentrato a caldo, ma non dall'acido cloridrico. Inoltre il mercurio reagisce violentemente con bromo, biossido di cloro ed ammoniaca.

Secondo alcune stime, circa l'80% del mercurio immesso nell'ambiente deriva da fonti naturali (erosione delle rocce da parte degli agenti atmosferici e dei fiumi, vaporizzazione dalla crosta terrestre), mentre il rimanente 20%, di origine antropica, deriva dalla combustione di petrolio e carbone nelle centrali elettriche, da inceneritori e da perdite relative all'utilizzo del mercurio nell'industria delle vernici e della carta (come antimuffa), dall'industria della plastica (catalizzatore nella sintesi di poliuretani e del cloruro di vinile), dagli impianti cloro-soda (ove è utilizzato come catodo nell'elettrolisi del cloruro di sodio), dalla fabbricazione di dispositivi elettrici (lampade a vapori di mercurio, batterie, interruttori a mercurio), dalla fabbricazione di termometri e barometri. Fino a non troppo tempo fa il mercurio trovava largo impiego in agricoltura come antimuffa e antifungino e nella produzione di amalgame dentali. Attualmente il mercurio è usato principalmente in termostati, sensori, relais e interruttori (ad esempio in circuiti stampati e apparecchiature di misura e nelle lampade a scarica). Il mercurio è anche usato in apparecchiature mediche, per la trasmissione dati, le telecomunicazioni e i telefoni mobili. Nell'UE, 300 t di mercurio sono usate nei soli sensori di posizione.

Il rilascio globale di mercurio nell'atmosfera dovuto alle attività umane è di circa 2000-3000 t all'anno. Riversato in acqua, il mercurio inorganico viene metilato da organismi bentonici in mercurio organico (metilmercurio e dimetilmercurio). I composti organici del

1. Introduzione

mercurio sono liposolubili, entrano nella catena trofica acquatica con fenomeno di bioaccumulo (fitoplancton, zooplancton, pesci, uomo) concentrandosi lungo la catena. L'ingestione di pesci e dei prodotti ittici in generale rappresenta la principale fonte di assunzione di metilmercurio nell'uomo.

Il tenore di mercurio metilato nei pesci varia con la posizione delle specie nella catena alimentare e la contaminazione da mercurio dell'habitat di ciascun pesce. La concentrazione di mercurio nelle acque potabili è compresa in genere tra 50 e 500 ng/l, negli alimenti non ittici è normalmente inferiore a 20 µg/kg, mentre il pesce rimane sicuramente la fonte più importante di introduzione del mercurio nell'organismo umano. Nel pesce, l'80% del mercurio presente è in forma di metilmercurio.

Il mercurio organico può essere assorbito in quantità che possono raggiungere il 90% di quello introdotto; esso presenta tossicità decrescente all'aumentare della lunghezza della catena alchilica a cui è legato; viene rapidamente distribuito al fegato (circa il 50%), al rene e al sistema nervoso centrale, dove esercita la maggior azione tossica. Il mercurio agisce come veleno protoplasmatico, sostanza tiolo-privata (si aggancia ai gruppi SH delle proteine di membrana cellulare), mutageno (agisce alterando il corredo cromosomico), teratogeno. Il metilmercurio essendo liposolubile supera la barriera emato-encefalica e quella placentare. Si accumula nel sistema nervoso centrale, soprattutto nel cervelletto, e nel cervello si rinviene soprattutto a livello della frazione proteica. Lentamente (tempo di emivita 70 d) viene eliminato dopo trasformazione a mercurio inorganico. Il dimetilmercurio è volatile e subisce un'eliminazione polmonare.

Il mercurio inorganico ha azione nefrotossica e irritante a carico delle mucose. Il mercurio elementare è destinato ad essere ionizzato a bivalente da una catalisi, perciò non passa la barriera emato-encefalica. Può essere inalato, è scarsamente assorbito dal lume intestinale e viene eliminato per via renale, dalle ghiandole salivari, dal colon, dalla cute e attraverso le feci. Gli annessi cutanei (capelli) sono una spia d'esposizione. I sali inorganici di mercurio si legano ai complessi proteici delle cellule mucosali del tubo gastroenterico.

1.5.8.2. Cadmio

Il cadmio (Cd) è presente nella crosta terrestre a basse concentrazioni. Il 90% del cadmio presente nell'ambiente deriva da attività umane mentre solo il 10% è di origine naturale. Trova impiego nell'industria galvanica, nella produzione di pigmenti, di leghe, di batterie e di alcuni

1. Introduzione

pesticidi. La presenza del cadmio nell'ambiente è influenzata anche dalla elevata capacità delle piante di accumularlo. I pesci ed alcuni invertebrati sono sensibili a questo metallo anche a basse concentrazioni. Alcuni pesci hanno la capacità di concentrarlo nel tessuto muscolare a livelli anche 1000 volte superiori a quelli dell'acqua (Rand, 1995; De Witt e coll., 1996).

Un eccesso di tale metallo provoca nelle piante clorosi e necrosi, negli animali tossicità e morte, negli uomini un'intossicazione acuta porta debolezza, febbre e vomito, mentre un'intossicazione cronica causa enfisema polmonare, disfunzioni renali e danni all'apparato scheletrico.

Tra i metalli pesanti, il cadmio, insieme al mercurio, è quello considerato più rilevante in relazione alla tossicità ed ai rischi per la salute dell'uomo. L'assunzione di tale elemento, avviene principalmente per via inalatoria ed in minor parte per ingestione. Il cadmio inalato è completamente assorbito nei polmoni, induce ipertensione arteriosa e colpisce anche i reni (Petit e Rucandio, 1999).

1.5.8.3. Rame

Il rame (Cu) è presente nell'ambiente sotto forma di solfuri e, più raramente, come ossidi, carbonati, silicati o anche come rame nativo. Se ne possono trovare tracce in quasi tutti i suoli in concentrazione variabile. Si trova spesso nel suolo e nei sedimenti legato alla materia organica. Trova largo impiego nell'industria ed è impiegato nella produzione di leghe, componenti elettriche, pitture, pesticidi e fungicidi (Pacifico, 2005).

Fin dagli anni '30 il rame è riconosciuto come micronutriente essenziale per il metabolismo di molti organismi viventi uomo incluso. Tale elemento è essenziale nella produzione dell'eme A. componente fondamentale della citocromo ossidasi, è componente essenziale anche di molti altri enzimi (dopaminabetaidrossilasi, tirosinasi, superossidodismutasi, ecc.) e di composti proteici che svolgono un ruolo fondamentale di catalizzatori nella riduzione dell'ossigeno molecolare in acqua (Ingrao e coll., 1995). Il rame è anche uno dei più importanti antiossidanti del sangue, previene l'irrancidimento degli acidi grassi polinsaturi e aiuta la membrana cellulare a rimanere sana; contribuisce alla conversione dell'aminoacido tirosina in melanina; partecipa al metabolismo delle proteine, ai processi di cicatrizzazione; è necessario per la sintesi dei fosfolipidi delle membrane protettive della mielina che circondano le fibre nervose ed ha un ruolo nel processo di ossidazione della vitamina C; è necessario anche per la produzione dell'RNA (Sotgiu, 2008).

1. Introduzione

Il rame è presente in tutti i tessuti dell'organismo umano ed il contenuto totale nel corpo umano va dagli 80 ai 120 mg, di cui circa 1/3 si trova nel fegato e nel cervello e un altro terzo si trova nello scheletro. Il rame presente nella dieta viene assorbito nel duodeno in misura del 30% circa. La maggior parte del rame alimentare viene eliminata con le feci e con la bile. Il fabbisogno giornaliero dell'uomo è di 1,5-3 mg, sebbene un adulto possa assumerne sino a 35 mg al giorno senza danni (Ingrao e coll., 1995). I sintomi da carenza includono debolezza generale, difficoltà nella respirazione e piaghe sulla pelle. Quantità insufficienti possono provocare una cattiva utilizzazione del ferro e delle proteine, diarrea e crescita stentata. Nei suini carenti di rame sono stati registrati casi di enfisema. La carenza può alterare lo sviluppo della struttura ossea, dei nervi e del tessuto polmonare, e può provocare un cattivo sviluppo del collagene, la disintegrazione di neurotrasmettitori e una minore pigmentazione della pelle (Pacifico, 2005).

Elevate assunzioni di questo metallo, specie se croniche, provocano invece intossicazione i cui sintomi sono nausea, vomito, dolore epigastrico, cefalea, vertigini, debolezza, diarrea e un gusto metallico in bocca. I casi di intossicazione più grave possono dare tachicardia, ipertensione, ittero, uremia, coma e morte. La tossicità del rame diminuisce all'aumentare dell'alcalinità dell'acqua; analogamente, la presenza di composti organici può ridurre gli effetti tossici indotti da tale elemento (Pagano e coll., 1996). L'effetto tossico sugli organismi animali è notevole. Per i vegetali, invece, il rame è un elemento essenziale, infatti quando è presente in concentrazioni minori di 4 ppm si possono presentare alcune patologie, mentre quantità superiori a 20 ppm indicano la soglia di tossicità che si manifesta con clorosi e blocco e/o rallentamento della crescita.

1.5.8.4. Piombo

Il piombo (Pb) è presente nella crosta terrestre in misura ridotta: il suolo infatti contiene naturalmente piccole quantità di composti di piombo. In generale, il piombo deriva da attività industriali, artigianali e da pratiche agricole e l'inquinamento causato da tale elemento interessa vari comparti ambientali: acqua, aria e suolo. La sua concentrazione nell'aria cresce molto più rapidamente che nell'acqua e nel suolo, essendo causata principalmente dalla combustione di additivi antidetonanti presenti nelle benzine.

Molti studi hanno evidenziato come concentrazioni di 1 mg/l nell'acqua risultino, in generale, letali o dannose per i pesci, sia per la loro crescita sia per la maturazione sessuale. Concentrazioni inferiori, pari a 0,1-0,2 mg/l hanno invece effetti tossici su protozoi e

1. Introduzione

molluschi. Su questi ultimi è stata documentata la possibilità di bioaccumulo. Anche la decomposizione batterica della sostanza organica è inibita da concentrazioni di piombo pari a 0,1 ppm (Scoog e West, 1986; Rand, 1995).

Il piombo può essere assunto tramite cibi, bevande, acqua, aria e polveri. Esso non ha funzioni essenziali nel metabolismo di uomini ed animali, ma interferisce con l'attività di alcuni enzimi inibendoli: provoca anemia, altera la funzionalità del sistema nervoso periferico, dei reni, del sistema cardiovascolare e di altri organi e tessuti. I composti organometallici del piombo agiscono principalmente sul cervello e possono provocare cancro all'intestino ed ai polmoni (Hans, 1990).

1.5.8.5. Zinco

La maggior parte dello zinco (Zn) è presente in natura sotto forma di solfuro, la cui scarsa solubilità ne limita la presenza in soluzione e nei sistemi biologici. Tuttavia il sale è ossidato dai batteri in ambiente acido, trasformandosi in solfato di zinco, molto solubile e quindi biodisponibile.

Lo zinco è impiegato principalmente nei processi di zincatura dei metalli per ritardarne la corrosione, nella preparazione di leghe, nella produzione di ossido di zinco, nell'industria della gomma; è anche aggiunto anche nei mangimi per animali. Negli anni '60 è stato dimostrato che tale elemento è essenziale per l'accrescimento di piante, animali e uomo (Pories e Strain, 1966). Infatti esso è un componente essenziale di molti enzimi (anidrasi carbonica, DNA polimerasi, RNA polimerasi, ecc.) presenti nel fegato, pancreas rene ed altri organi, partecipando a numerosi processi metabolici quali sintesi e degradazione dei carboidrati, dei lipidi, delle proteine e degli acidi nucleici (Ingrao e coll., 1995). Lo zinco risulta quindi indispensabile per la crescita, lo sviluppo ed il normale funzionamento di tutti gli organismi viventi.

La tossicità dei composti dello zinco nei confronti degli organismi acquatici varia in funzione di diversi fattori ambientali ed in particolare della durezza dell'acqua. Inoltre, la presenza concomitante di altri metalli accresce la tossicità dello zinco (sinergismo), mentre la presenza di alcuni sali di metalli alcalino-terrosi la riduce (antagonismo) (Pagano e coll., 1996; Gardner, 1999). Nell'uomo alla carenza di zinco possono essere correlate stati patologici come ritardi e anomalie dell'accrescimento. Si è inoltre dimostrata l'importanza terapeutica dello

1. Introduzione

zinco nel trattamento della dermatite enteropatica e l'effetto protettivo di questo metallo nei confronti dell'azione tossica di alcuni metalli pesanti (Abdulla e coll., 1979).

1.5.8.6. Cromo

Il cromo (Cr) è presente nella crosta terrestre in concentrazioni variabili ed è ricavato principalmente dalla cromite. Il cromo e i suoi composti sono largamente utilizzati nell'industria e viene immesso nell'ambiente attraverso gli scarichi dell'industria galvanica e delle concerie.

Il cromo, anche se in minima parte, è un elemento essenziale nella dieta di numerosi animali essendo uno dei cofattori che influenzano l'azione dell'insulina (Mertz, 1969). La sua mancanza infatti può causare diabete, arteriosclerosi, problemi di crescita e cataratta. Non vi è alcuna dose dietetica consigliata riguardo al cromo, quindi l'assunzione normale viene considerata come dose sufficiente. Le dosi quotidiane di cromo per i bambini sino ai 5 mesi, dovrebbero andare da 0,01 a 0,04 mg; da 5 mesi a 1 anno, da 0,02 a 0,06 mg, da 1 a 3 anni, da 0,02 a 0,08 mg; dai 4 ai 6 anni, da 0,03 a 0,12 mg. I bambini oltre i 7 anni, i ragazzi e gli adulti dovrebbero assumerne da 0,05 a 0,20 mg (da 50 a 200 µg). La forma trivalente è quella presente negli alimenti; non provoca questi disturbi e ha una tossicità molto bassa, ma se le dosi eccedono le quantità normali gli effetti del cromo rovesciano e inibiscono l'attività dell'insulina piuttosto che favorirla. Il cromo esavalente è la forma più tossica di tale elemento e l'esposizione a lungo termine può provocare problemi dermatologici, perforazione del setto nasale e tumore ai polmoni.

Anche negli ambienti acquatici gli effetti tossici più evidenti derivano dall'esposizione al cromo esavalente. La tossicità di tale elemento varia notevolmente in funzione di fattori ambientali come la durezza dell'acqua. Esiste la possibilità di danni alla fauna ittica anche per concentrazioni inferiori a 0,1 mg/l e bioaccumulo in varie componenti dell'ecosistema (Scoog e West, 1986; Rand, 1995).

1.5.8.7. Arsenico

L'arsenico (As) è largamente distribuito sulla superficie terrestre nelle rocce e nell'acqua. Accanto alla contaminazione naturale, le industrie utilizzano circa 50.000 t di arsenico all'anno per la produzione di prodotti chimici per l'agricoltura, come pesticidi, erbicidi, essiccanti, additivi per il cibo di animali e anche prodotti farmaceutici, che provocano tutti un impatto diretto sull'ambiente.

1. Introduzione

Sebbene i composti dell'arsenico siano conosciuti principalmente per la loro tossicità, alcuni di essi presentano un'importante azione farmaceutica. Gli effetti biologici dell'arsenico dipendono marcatamente dalla forma in cui tale elemento si trova: i composti inorganici sono molto più tossici di quelli organici. Il principale motivo di interesse per tale elemento è la sua potenziale tossicità per gli umani. L'intossicazione acuta caratterizzata da nausea, vomito, dissenteria e forti dolori addominali è relativamente rara. La tossicità cronica si presenta come risultato dell'esposizione a fonti naturali o a causa dell'assunzione prolungata di acqua o cibo contaminati. Le concentrazioni di arsenico negli oceani e nei fiumi e laghi non contaminati varia da livelli di concentrazione non rilevabili a pochi $\mu\text{g/l}$. Il WHO (1981) raccomanda un livello massimo di arsenico nell'acqua potabile di $10 \mu\text{g/l}$. I livelli più alti di concentrazione di arsenico, anche nell'ordine di mg/l , sono presenti in acque da sorgenti termali o venute in contatto con depositi naturali di arsenico oppure esposte a contaminazione industriale (World Health Organization, 1996).

1. Introduzione

1.6. *Applicazione della spettrometria nel vicino infrarosso (NIRS) per la valutazione della qualità dei prodotti ittici*

1.6.1. Principi di funzionamento della tecnica NIRS

La Spettrometria per Riflettanza nel Vicino Infrarosso (Near Infrared Reflectance Spectroscopy, NIRS) è una tecnica analitica che utilizza la capacità delle molecole organiche di assorbire parte della radiazione infrarossa incidente.

Secondo la teoria quantistica, ciascun atomo o molecola passa da uno stato energetico all'altro attraverso passaggi discreti relativi ai *quanta* di energia assorbiti. Normalmente la molecola si trova in uno stato energetico denominato “fondamentale”. Se sottoposta a sollecitazione, essa cambia il suo stato energetico (transizione), passando a livelli energetici superiori.

Quando la transizione energetica è da un livello inferiore a quello immediatamente successivo (da 0 ad 1, o anche da 2 a 3), si parla di transizione fondamentale. Quando l'energia assorbita dalla molecola è così elevata da consentire la transizione a livelli superiori di energia e non adiacenti (da 0 a 2 o da 1 a 3), si parla di *overtones* o sovrabande (Allinger e coll., 1986; Ciurczak, 1992).

Una radiazione elettromagnetica interagisce con un campione modificando lo stato energetico delle sue molecole e determinando la vibrazione dei legami molecolari. La regione della luce che interessa l'analisi NIRS è quella del “vicino infrarosso”. La regione dell'infrarosso, compresa fra la regione del visibile e quella delle microonde, si estende da 780 a 10^6 nm e si divide appunto nella regione del vicino infrarosso (Near-IR o NIR), da 780 a 2500 nm, oltre che del medio infrarosso (Mid-IR), da 2500 a $2,5 \times 10^4$ nm, e del lontano infrarosso (Far-IR), da $2,5 \times 10^4$ nm a 10^6 nm.

La radiazione infrarossa è in grado di produrre movimenti vibrazionali che possono essere principalmente di due tipi: l'elongazione (*stretching*) e la flessione (*bending*) soprattutto dei legami che coinvolgono atomi di idrogeno (Murray e Williams, 1987). L'elongazione è il movimento degli atomi lungo l'asse del legame molecolare, in modo che la distanza fra gli atomi vari ritmicamente, e può essere di tipo simmetrico o asimmetrico a seconda della direzione reciproca dei due atomi. La flessione comporta invece cambiamenti nell'ampiezza dell'angolo di legame fra gli atomi, o movimenti di gruppi di atomi, che sono fermi al loro interno, rispetto al resto della molecola. La maggior parte delle bande di assorbimento che si

1. Introduzione

osservano nella regione NIR deriva da *overtone* per le transizioni vibrazionali dell'idrogeno, che coinvolgono gruppi funzionali X-H.

Quando l'energia della radiazione viene utilizzata per la transizione verso livelli energetici superiori, questa viene parzialmente assorbita dal campione. Se si posiziona un rilevatore al fine di misurare la radiazione di ritorno (riflessa), si osserverà una riduzione nell'energia di ritorno della luce ad una particolare frequenza o lunghezza d'onda, corrispondente alla quantità di radiazione assorbita. La quantità di luce riflessa dal campione può essere misurata come riflettanza (R), oppure come quantità di luce assorbita, ossia come assorbanza, pari al $\log(1/R)$. L'assorbimento della luce da parte di un campione eterogeneo è legata alla concentrazione di una data sostanza secondo la legge di Beer-Lambert (Osborne e coll., 1993). Questo permette di misurare la concentrazione di una sostanza sulla base dei dati spettrali.

La correlazione tra i dati spettrali e la concentrazione di una particolare sostanza segue un processo diviso in due fasi:

- calibrazione: è il processo con il quale vengono calcolate equazioni di regressione in grado di mettere in relazione i dati spettrali con il contenuto di una determinata sostanza o il valore di una determinata caratteristica;
- validazione: durante questa fase, l'affidabilità e la robustezza dell'equazione di regressione calcolata in calibrazione viene verificata e testata sullo stesso set di campioni usati per la calibrazione o su un nuovo set di campioni.

Durante la calibrazione, un set di campioni, chiamato set di calibrazione, è sottoposto sia ad analisi chimiche che ad analisi NIRS per acquisire sia le informazioni chimiche che vogliamo predire che i dati spettrali. Nella fase di calibrazione, i dati chimici e dati spettrali sono analizzati statisticamente con un algoritmo di regressione. Durante la validazione, viene testata la robustezza della equazione di calibrazione generalmente su un nuovo set di campioni, di cui si conosce la composizione chimica (Williams, 1987).

1.6.2. Vantaggi e svantaggi della tecnica NIRS

La tecnologia NIR presenta molti aspetti positivi quali velocità di risposta, fruibilità in linea di produzione, relativa semplicità d'uso, facilità di preparazione dei campioni. A questi, tuttavia, si contrappongono alcuni aspetti negativi, come difficoltà di taratura, continua necessità di adattamenti, costi delle apparecchiature.

1. Introduzione

La velocità di rilevazione delle informazioni è il principale punto forza di questo tipo di analisi, soprattutto quanto si considerano i tempi delle tradizionali tecniche di laboratorio, almeno 2-3 giorni con tempi di prelievo, conferimento al laboratorio, condizionamento del campione e lettura dei risultati.

La fruibilità in linea di produzione sta diventando un fatto concreto, con il soddisfacimento di molti produttori che vedono realizzarsi il loro sogno di un controllo continuo della linea produttiva, e con la possibilità di conoscere le caratteristiche qualitative del lotto in lavorazione.

La semplicità d'uso è essenziale in quanto, dopo la taratura iniziale, il metodo non necessita di personale specializzato per il suo utilizzo. Generalmente, il sistema implementato in linea di produzione necessita solo di controlli e calibrazioni periodiche. Per le analisi a scopo di ricerca è molto interessante la caratteristica di non distruzione del campione, il quale può essere sottoposto ad ulteriori letture o analisi di tipo tradizionale.

Se si considera che la tecnologia NIRS potrebbe permettere di ridurre (anche se non eliminare) le analisi di laboratorio, a fronte di un investimento relativamente contenuto si riscopre una convenienza non solo economica, ma anche di tempo ed organizzazione.

Gli aspetti negativi dell'analisi NIRS non sono da considerarsi strettamente intrinseci al metodo, ma piuttosto al fatto che la tecnica è di nuova concezione, quindi ancora non del tutto conosciuta e capita dai ricercatori e dai produttori.

Con riferimento ad una corretta taratura del sistema, è doveroso evidenziare il problema legato alla variabilità intrinseca della composizione del prodotto alimentare. Posto che il metodo non necessita di preparazione del campione, ma lo rileva tal quale, si deve definire il punto spaziale sul quale fare la lettura, nel caso si operi con campioni con struttura non omogenea, come nel caso della carne. Nello specifico del pesce, la parte ventrale è più ricca in grasso della rispettiva parte dorsale e sarà quindi necessario tenere conto di queste differenze. Rispetto alle analisi tradizionali, il sistema NIRS può rilevare la composizione di un punto preciso del prodotto, per cui non beneficia delle tecniche di omogeneizzazione tipiche dei sistemi di laboratorio. Per contro il risultato dell'analisi NIRS non si basa solo su l'analisi di un solo componente, ma sulla scansione di tutte le sostanze organiche presenti nel campione.

L'analisi NIRS dei prodotti freschi presenta inoltre una serie di problemi legati principalmente all'alto tenore di umidità di questi campioni. L'influenza negativa dell'acqua sulla predizione delle altre componenti è nota da tempo (Murray e Williams, 1987; Shenk e

1. Introduzione

coll., 1992; Osborne e coll., 1993). Le bande di assorbimento dell'acqua si sovrappongono e sono molto più ampie a quelle di altre sostanze chimiche di interesse, come proteine e grassi. Inoltre, l'acqua interagisce fortemente con gli altri componenti del campione, modificando il loro assorbimento. La presenza di acqua inoltre, modifica la forma complessiva dello spettro, aumentando la densità ottica globale. L'evidente influenza dell'acqua implica la necessità di trattamento del campione prima della scansione NIRS, con conseguente allungamento dei tempi analitici oltre alla distruzione del campione per la liofilizzazione.

Nonostante le difficoltà discusse, l'analisi NIRS delle carni fresche rimane uno dei principali argomenti di studio per poter valutare la composizione chimica della carne e c'è sempre maggior interesse sulla sua possibile applicazione nella valutazione della qualità della carne. La certificazione di qualità e l'autenticazione dei prodotti freschi sono in realtà di grande interesse sia per il produttore che per il consumatore.

La tecnica di analisi mediante la spettroscopia nel vicino infrarosso può essere divisa in tre tipologie: *off-line*, come l'analisi di campioni secchi o umidi raccolti e preparati attraverso protocolli di laboratorio; *at-line*, come la misurazione di campioni direttamente sulla linea di produzione; ed infine, la tipologia *on/in-line*, che consiste nell'analisi del campione in azienda senza il suo effettivo allontanamento dalla linea produttiva.

1.6.3. Analisi NIRS di pesci e derivati

La letteratura scientifica riguardante le analisi NIRS sui prodotti ittici si è sviluppata negli ultimi vent'anni, ma nel complesso sono disponibili relativamente pochi studi in materia, principalmente provenienti da paesi del Nord Europa, dove l'acquacoltura rappresenta una fonte di reddito tale da giustificare i costi di ricerca.

Nello studio condotto da Downey (1996), il salmone allevato è stato sottoposto ad analisi NIRS direttamente sulla superficie della carcassa, definendo sei punti di analisi nella parte dorsale e sei nella parte ventrale, al fine di ottenere uno spettro della distribuzione di grasso ed umidità del filetto. Lo studio ha permesso di evidenziare una notevole diversità della distribuzione del grasso nel corpo del salmone, maggiore nella parte ventrale rispetto alla parte dorsale. Come afferma l'autore, non è possibile ottenere un livello di affidabilità del metodo NIRS superiore al metodo tradizionale. L'analisi NIRS può essere applicata sul prodotto finito, come il salmone affumicato, analizzando indirettamente il contenuto in sale mediante la predizione del contenuto in acqua (Lin e coll., 2003). Xiccato e coll. (2004) hanno evidenziato

1. Introduzione

una buona accuratezza nella determinazione della composizione chimica (estratto etereo, umidità ed energia) delle spigole, anche differenziando gli animali in funzione della provenienza (allevamento intensivo, semi-intensivo, estensivo e allevamento in mare).

La tecnica NIRS oggi permette di predire svariate caratteristiche qualitative, fino a determinare il grado di freschezza del pesce. Lo studio condotto da Bøknæs e coll. (2002) ha individuato una stretta correlazione tra lo spettro NIRS e il trattamento di congelamento in filetti di merluzzo scongelati e poi ricongelati, mentre ha evidenziato una modesta capacità di discriminare la temperatura e il tempo di conservazione di filetti di pesce congelato.

La possibilità di valutare rapidamente e con metodi non distruttivi la composizione chimica dei prodotti dell'acquacoltura potrebbe rappresentare un grande vantaggio per il consumatore così come per l'industria di trasformazione. Le caratteristiche nutrizionali della carne di pesce sono alla base della preferenza che il consumatore accorda ai prodotti della pesca e dell'acquacoltura. La possibilità di misurare rapidamente la composizione chimica del pesce garantirebbe il consumatore sulle caratteristiche nutrizionali che stanno alla base della sua qualità. D'altra parte, essa permetterebbe all'industria di destinare il pesce al consumo fresco o alla trasformazione soprattutto in funzione del suo contenuto di lipidi ed energia.

Per le sue caratteristiche, l'analisi NIRS risulta adatta alla qualificazione e caratterizzazione dei prodotti ittici, come pure della carne e di altri alimenti. Questa tecnica analitica, rapida e a risposta multipla, potrebbe essere utilizzata lungo tutta la filiera di lavorazione del pesce per monitorare *on line* e fornire risposte immediate sulle caratteristiche chimiche e nutrizionali dal momento della cattura fino all'acquisto da parte del consumatore finale. All'estremo, l'uso *on line* del NIRS potrebbe permettere l'analisi sull'animale ancora vivo, permettendo la cattura del pesce negli allevamenti intensivi solo nel momento in cui questo presenti le caratteristiche richieste dal consumatore o dal trasformatore.

Come per gli altri prodotti carnei, le principali difficoltà dell'analisi NIRS sul pesce fresco sono legate all'elevato contenuto d'acqua dei campioni, che modifica l'assorbimento dei principali costituenti chimici influenzando le performance di calibrazione e di validazione nelle predizioni NIRS. La forte influenza dell'acqua comporta la necessità di ridurre il contenuto nel campione attraverso una preparazione dello stesso; questo si traduce in un aumento dei tempi di lavorazione e di analisi, nonché nella parziale distruzione o comunque compromissione dell'integrità del campione originale in seguito ai trattamenti di disidratazione.

1. Introduzione

Le prime applicazioni dell'analisi NIRS nella valutazione dei prodotti dell'acquacoltura sono cominciate proprio con analisi di campioni di pesce preliminarmente liofilizzati. Mathias e coll. (1987) hanno ottenuto un'accurata predizione del contenuto di estratto etereo e di proteina grezza di campioni liofilizzati di due specie di salmonidi, trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) e salmerino (*Salvelinus alpinus*). Valdes e coll. (1989) hanno realizzato una predizione molto accurata del contenuto di proteina grezza, estratto etereo ed energia lorda di filetti di trota liofilizzati, analogamente a quanto realizzato da Gjerde e coll. (1987) sullo stesso tipo di campioni. Il confronto fra l'accuratezza della predizione del contenuto di estratto etereo ottenuta con tecniche analitiche tradizionali o alternative quali la tomografia computerizzata (TAC) e la risonanza magnetica (NMR) è risultato a favore dell'analisi NIRS per campioni liofilizzati di filetti di salmone atlantico (*Salmo salar*) (Nortvedt e coll., 1998a).

L'interesse per le applicazioni della spettrometria NIRS sui prodotti dell'acquacoltura si è successivamente spostato verso il pesce fresco, allo scopo di ridurre i tempi di preparazione e le modificazioni chimiche del campione evitandone la liofilizzazione. Sollid e Solberg (1992) hanno analizzato con successo il filetto fresco macinato di salmone per la previsione del contenuto di estratto etereo e di proteina grezza. Ancora su campioni freschi macinati, Solberg (1995) è riuscito a predire efficacemente il contenuto di umidità, grasso e proteina di *Gadus morhua*, *Mallotus villosus* e *Salmo salar*. Lo stesso tipo di studio è stato condotto da Nortvedt e coll. (1998b) su campioni macinati freschi di merluzzo atlantico.

Considerati i successi ottenuti sui campioni freschi e macinati e allo scopo di preservare l'integrità del campione originale, nuova attenzione è stata rivolta all'applicazione dell'analisi NIRS su porzioni intere del filetto, sul filetto intero e perfino sul pesce intero non privato della pelle. Rasco e coll. (1991) hanno effettuato l'analisi NIRS su porzioni di muscoli del filetto di trota, mentre Isaksson e coll. (1995) e Nilsen e coll. (1999) hanno analizzato l'intero filetto di salmone. Lee e coll. (1992) hanno calcolato calibrazioni NIRS per il contenuto di estratto etereo su trote analizzate intere, mentre Downey (1996) ha effettuato le stesse misurazioni su salmoni interi.

A parte i lavori sopra citati, le indicazioni bibliografiche sull'applicazione del NIRS per la valutazione della composizione chimica e di caratteristiche qualitative per pesci di varie specie non sono molto numerose, se paragonate agli studi effettuati sulla carne degli animali terrestri.

1. Introduzione

Solo in pochi casi l'analisi NIRS è stata utilizzata anche per ottenere informazioni diverse dalla composizione chimica. Attraverso l'analisi multivariata dei dati spettrali, Solberg (1995) è riuscito a classificare i campioni di filetto in funzione della specie (*Gadus morhua*, *Mallotus villosus* e *Salmo salar*). In precedenza, Mathias e coll. (1987) non avevano però riscontrato differenze su base spettrale fra i campioni appartenenti a due specie di salmonidi, *Oncorhynchus mikyys* e *Salvelinus alpinus*. La somiglianza spettrale fra i campioni analizzati fu probabilmente determinata dalla taglia molto simile dei pesci analizzati e quindi da una composizione chimica scarsamente differenziata.

2. Obiettivi

2. Obiettivi

2.1. Inquadramento generale del problema

La spigola, insieme con l'orata, rappresenta la principale specie ittica dell'acquacoltura nazionale dopo la trota. La forte competizione esistente tra i Paesi produttori dell'area mediterranea (in particolare Turchia, Grecia, Spagna, Croazia) e la conseguente pressione sui prezzi di mercato richiedono una caratterizzazione ed una differenziazione della qualità e della sicurezza alimentari del prodotto nazionale all'origine, come è successo per altre produzioni animali. In effetti, l'eterogeneità dei sistemi di produzione e delle situazioni eco-geografiche degli allevamenti di spigola sul territorio nazionale crea i presupposti per una differenziazione qualitativa dei prodotti allevati, necessaria ai fini della loro valorizzazione.

Si pone dunque la necessità di acquisire e mantenere aggiornate le conoscenze scientifiche sulle caratteristiche nutrizionali, organolettiche e tossicologiche del pesce allevato in Italia con diversi sistemi produttivi. La caratterizzazione qualitativa e lo sviluppo di indici, criteri e tecniche analitiche utili allo sviluppo di sistemi di tracciabilità, certificazione e identificazione di origine rappresentano strumenti indispensabili in grado di orientare le scelte di consumo e incontrare le preferenze del consumatore, al fine di accrescere la competitività del settore sui mercati nazionali e internazionali.

La qualità igienico-sanitaria dei prodotti destinati al consumo umano da sempre costituisce un pre-requisito di qualità perché essi possano essere destinati all'alimentazione. Mai come ora qualità e sicurezza alimentare si sono poste all'attenzione dell'opinione pubblica e del legislatore con toni spesso scandalistici e non sempre supportati da una corretta informazione scientifica in grado di orientarne le scelte e le decisioni. Sebbene con una percezione diversificata da paese a paese è aumentata nel consumatore medio europeo l'attenzione verso la qualità unitamente alla preoccupazione per la possibile presenza di sostanze tossiche inorganiche e organiche persistenti nei prodotti ittici dell'acquacoltura.

Se da un lato ai prodotti della pesca e dell'acquacoltura è riconosciuta unanimemente una valenza dietetica superiore a quella dei prodotti di animali terrestri, d'altro canto i primi sono più suscettibili a contaminazioni *ante* e *post-mortem*. In vita, gli animali acquatici possono subire una contaminazione dovuta al possibile inquinamento dell'acqua nella quale le specie sono allevate o pescate, o per l'accumulo di sostanze indesiderate lungo la catena trofica

2. Obiettivi

naturale o la loro presenza nei mangimi commerciali a base di farine e oli di pesce di caratteristiche qualitative diverse ma comunque di provenienza estranea al sito di produzione. Il controllo della concentrazione di organocloruri e metalli pesanti riveste un'importanza basilare, trattandosi di inquinanti che si accumulano nei tessuti degli organismi carnivori all'apice della catena trofica e il cui effetto, sebbene controverso, viene associato a varie malattie metaboliche, endocrine e riproduttive e all'insorgenza di tumori.

Nella fase *post-mortem*, la qualità dei prodotti ittici non può prescindere dal grado di freschezza e dallo stato di conservazione. Queste caratteristiche possono essere valutate con diversi metodi basati sulla determinazione in laboratorio della concentrazione dei prodotti di degradazione di lipidi, proteine e composti azotati non proteici, così come su valutazioni sensoriali eseguite con metodi standard (Reg. EC 2406/96) o secondo il più recente *Quality Index Method* (QIM), adattato alla singola specie e tipologia di prodotto.

In questo contesto, gli operatori del settore manifestano l'esigenza di avere a disposizione strumenti rapidi e poco onerosi con cui poter analizzare, valorizzare e distinguere oggettivamente il loro prodotto. Tra questi, la spettroscopia nel vicino infrarosso (*Near Infrared Reflectance Spectroscopy*, NIRS) potrebbe essere utilizzata vantaggiosamente per il controllo di qualità dei prodotti ittici. Largamente utilizzata per la valutazione delle caratteristiche nutrizionali di alimenti destinati agli animali in produzione zootecnica, per la caratterizzazione, autenticazione dell'origine e per l'individuazione di eventuali adulterazioni in un'ampia gamma di prodotti agro-alimentari, l'analisi NIRS è stata impiegata con successo anche nel settore dell'acquacoltura per predire la composizione chimica di carni di varie specie, oltre che identificare i pesci in funzione del sistema di allevamento e della freschezza.

2.2. Obiettivi generali e specifici

La presente tesi si è posta l'obiettivo generale di contribuire a rinforzare i programmi per la qualità totale, la sicurezza alimentare e la valorizzazione della spigola attraverso uno studio ad ampio raggio delle caratteristiche biometriche, chimico-nutrizionali, sensoriali (valutazione della freschezza) e tossicologiche (presenza di contaminanti, quali PCB e metalli pesanti) di pesci di diversa taglia commerciale, provenienti dalle più diffuse tipologie di allevamento a terra e in mare e da diverse aree geografiche del territorio nazionale, garantendo la più ampia gamma di situazioni rappresentate.

2. Obiettivi

A consolidate tecniche laboratoristiche chimiche e sensoriali per una completa caratterizzazione qualitativa dei prodotti, sono stati abbinati metodi innovativi, come la spettroscopia nel vicino infrarosso (NIRS), per fornire modelli e strumenti predittivi rapidi attraverso i quali caratterizzare la qualità, la freschezza e identificare l'origine di spigole di allevamento.

Gli obiettivi specifici del presente lavoro sono stati:

Obiettivo 1 - QUALITÀ. Caratterizzare dal punto di vista morfologico, chimico e dietetico spigole provenienti da allevamenti italiani con differenti sistemi produttivi.

Obiettivo 2 - CONTAMINANTI. Determinare la presenza e il livello di contaminanti ambientali (PCB e metalli pesanti) in spigole provenienti da differenti sistemi di allevamento italiani.

Obiettivo 3 - FRESCHEZZA. Valutare l'evoluzione della freschezza in spigole di allevamento in funzione del tempo di conservazione e del sistema produttivo.

Obiettivo 4 - NIRS. Utilizzare l'analisi NIRS per la caratterizzazione chimica e dietetica, la valutazione della freschezza e l'identificazione di origine di spigole provenienti da diversi sistemi di allevamento.

3. Materiali e metodi

3. Materiale e metodi

3.1. *Campionamenti*

Sono stati utilizzati quattro set di campioni ottenuti nell'ambito di attività sperimentali relative prevalentemente al progetto di ricerca multidisciplinare "Qualità e Sicurezza alimentare di spigole degli allevamenti nazionali: definizione di indicatori e applicazioni strumentali innovative", finanziato dal Ministero delle politiche Agricole e Forestali (MIPAF) (anni 2007-2009).

Campionamento n. 1

Sono state acquisite 133 spigole provenienti dai 4 impianti appartenenti a diversi sistemi di allevamento (estensivo in valle, semi-intensivo a terra, intensivo a terra, intensivo in gabbie a mare) e localizzati rispettivamente in provincia di Rovigo (Sacca di Scardovari, Foce del Po), in provincia di Udine (Laguna di Marano), in provincia di Grosseto (Orbetello) e in provincia di Gorizia (Golfo di Trieste). Il campionamento ha riguardato 25 spigole prelevate dall'allevamento estensivo della Sacca di Scardovari, 28 spigole dall'allevamento semi-intensivo della Laguna di Marano, 46 spigole dall'allevamento intensivo di Orbetello, 34 spigole dall'allevamento di gabbie in mare nel Golfo di Trieste.

Campionamento n. 2

Sono state definite tre tipologie e forme di acquacoltura-maricoltura (I, allevamenti intensivi a terra; E, impianti estensivi; G, impianti di gabbie a mare) e per ciascuna tipologia sono stati individuati 3-4 impianti distribuiti sul territorio nazionale in modo da garantire un'ampia gamma di situazioni rappresentate per un totale di 11 impianti distribuiti sul territorio nazionale come rappresentato in Figura 3.1.

3. Materiali e metodi



Figura 3.1. Distribuzione degli allevamenti sottoposti a campionamento

Le spigole prelevate appartenevano a due categorie commerciali di peso, tipiche della produzione da acquacoltura: 400-600 g (denominati S: small) e 700-1000 g (L: large). Ove possibile, è stato prelevato un numero di soggetti pari a 10 individui per classe di taglia e per allevamento per un totale di 170 animali (Tabella 3.1).

Tabella 3.1. Numerosità dei campioni raccolti durante il campionamento n. 2

Allevamento	Taglia	Spigole	Mangimi
I1	S	10	1
	L	10	
I2	S	10	1
	L	10	
I3	S	10	1
	L	10	
I4	L	10	
	L	10	
E1	L	10	
	L	10	
E2	S	7	
	L	4	
E3	S	10	1
	L	10	
E4	L	10	
	L	10	
G1	S	10	1
	S	10	
G3	S	10	1
	L	10	
G4	S	10	1
	L	9	
Totale		170	7

3. Materiali e metodi

In quegli impianti che utilizzavano un'alimentazione di tipo artificiale è stato campionato, ove disponibile, il mangime somministrato alle spigole nell'ultima fase di allevamento prima della cattura.

Le spigole sono state pescate nel periodo di vendita tipico e comune ai diversi allevamenti, da novembre a gennaio, con l'eccezione di uno dei campionamenti in gabbie galleggianti in un impianto per il quale le condizioni meteorologiche non hanno consentito la pesca prima del mese di febbraio.

Campionamento n. 3

Sono state campionate 90 spigole nell'allevamento semi-intensivo sito in provincia di Udine (Laguna di Marano), già interessato al campionamento n. 1. Le spigole sono state prelevate nel mese di marzo dalle vasche in cemento. Al momento del prelievo, le spigole presentavano un peso medio di circa 300 g, corrispondente alla cosiddetta "taglia porzione" commerciale.

Campionamento n. 4

Le spigole sono state pescate da 3 impianti appartenenti a tre diversi sistemi di allevamento (estensivo in valle, intensivo a terra, intensivo in gabbie a mare), già interessati dai campionamenti 1 e 2 e localizzati rispettivamente in provincia di Rovigo (Sacca di Scardovari, Foce del Po), in provincia di Grosseto (Orbetello) e in provincia di Gorizia (Golfo di Trieste). Da ciascun impianto sono state campionate 30 spigole per un totale di 90 esemplari.

3.2. Cattura e macellazione degli animali

Tutte le spigole pescate sono state sacrificate immediatamente dopo la cattura mediante immersione in acqua e ghiaccio per circa 20-30 minuti e quindi selezionate per classe di taglia (quando previsto). Le spigole sono state quindi trasportate al laboratorio del Dipartimento di Scienze Animali (DSA) in cassette da vendita coperte da ghiaccio. In laboratorio, i pesci sono stati ridistribuiti in cassette di polistirolo, ricoperti di ghiaccio e riposti in cella frigorifera a 2°C fino al mattino seguente per essere analizzati dopo circa 24 ore dalla morte.

3. Materiali e metodi

3.3. Preparazione dei campioni e analisi

A 24 ore dalla cattura, gli animali provenienti da ciascun allevamento sono stati pesati, ordinati per peso crescente e identificati con una sigla che indicava l'allevamento di provenienza e la classe di peso (ove previsto, S per Small; L per Large).

Di seguito, gli animali sono stati sottoposti alle operazioni e ai rilievi sotto specificati in ordine temporale, in funzione degli specifici obiettivi sperimentali:

- 1) valutazione sensoriale della freschezza;
- 2) biometrie e indici morfometrici;
- 3) determinazione del colore della pelle;
- 4) analisi della tessitura del pesce intero;
- 5) determinazione del pH oculare;
- 6) eviscerazione e pesatura degli organi interni;
- 7) sfilettatura della carcassa;
- 8) determinazione del colore del filetto;
- 9) determinazione del pH del filetto;
- 10) analisi della tessitura del filetto;
- 11) separazione della pelle e macinazione del filetto;
- 12) analisi NIRS del filetto fresco;
- 13) analisi del profilo acidico del grasso muscolare
- 14) analisi dell'azoto basico volatile totale;
- 15) liofilizzazione del filetto;
- 16) analisi NIRS del filetto liofilizzato;
- 17) determinazione delle caratteristiche chimiche del filetto liofilizzato;
- 18) determinazione della concentrazione di metalli pesanti del filetto e dei mangimi;
- 19) determinazione della concentrazione di PCB del filetto e dei mangimi.

3.3.1. Valutazione sensoriale della freschezza

L'analisi sensoriale della freschezza è stata realizzata sulle spigole provenienti dai campionamenti n. 3 e 4.

Per il campionamento n. 3, le 90 spigole provenienti dall'allevamento semi-intensivo sono state riposte in 6 cassette di polistirolo contenenti 15 animali per cassetta. Ciascuna cassetta è stata conservata in cella frigorifera alla temperatura di 2°C per uno dei seguenti 6

3. Materiali e metodi

tempi di conservazione: immediatamente dopo la cattura (giorno 0) e dopo 1, 2, 4, 6 e 8 giorni di conservazione.

Lo stato di freschezza dei pesci interi è stato analizzato da 5 valutatori esperti mediante l'utilizzo dello schema standard di valutazione UE (Reg. EC 2406/96) (Tabella 3.2) e lo schema QIM (Quality Index Method) (Tabella 3.3), quest'ultimo sviluppato per spigola e orata da Alasalvar e coll. (2001) prevedendo un punteggio massimo di 39 punti.

Per il campionamento n. 4, sono state utilizzate 90 spigole provenienti da 3 impianti appartenenti a diverse tipologie di allevamento (estensivo, intensivo a terra, intensivo in gabbia marina). Le 30 spigole di ciascun allevamento sono state riposte in 5 cassette di polistirolo in numero di 6 animali per cassetta e ricoperte di ghiaccio. Le 15 cassette (5 per sistema di allevamento) così ottenute sono state conservate alla temperatura di 2°C in cella frigorifera fino al momento dell'analisi che è stata condotta dopo 3, 6, 10, 13 e 17 giorni di conservazione, sulle spigole di tre cassette (una per sistema di allevamento) per ogni tempo di conservazione.

Per questo campionamento, lo stato di freschezza dei pesci interi è stato analizzato da sei valutatori esperti sia mediante l'utilizzo dello schema UE che un nuovo schema QIM sviluppato nel 2007 (Knowles e coll., 2007) appositamente per la spigola (Tabella 3.4). Quest'ultimo schema, che prevede un punteggio massimo di 22 punti, considera un numero minore di variabili classificabili con maggior precisione, risultando più accurato e di uso immediato.

3. Materiali e metodi

Tabella 3.2. Schema di valutazione sensoriale UE (Reg. EC 2406/96)

	Extra	A	B	Non ammesso
Pelle	Pigmento vivo e cangiante 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	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 (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	Di alghe marine	Senza odore di alghe marine; odore neutro	Odore di fermentazione; leggermente acre	Acre
Carne	Soda ed elastica; superficie liscia	Meno elastica	Leggermente molle (flaccida), meno elastica; superficie cerea (vellutata) e spenta	Molle; squame si staccano facilmente; superficie rugosa

3. Materiali e metodi

Tabella 3.3 Schema QIM utilizzato per il campionamento n. 3 (Alasalvar e coll., 2001)

Categoria	Carattere	Descrizione	Punti demerito
Aspetto generale	Brillantezza	molto brillante	0
		brillante	1
		leggermente opaco	2
		opaco	3
	Pelle	compatta o elastica	0
		morbida	1
	Muco	chiaro	0
		leggermente viscoso	1
		viscoso	2
		molto viscoso	3
	Durezza	pre-rigor	0
		rigor	1
post-rigor		2	
Occhio	Chiarezza	chiaro	0
		leggermente appannato	1
		appannato	2
	Forma	normale	0
		piatto	1
		piatto-concavo	2
		concavo e rigonfio	3
	Iride	visibile	0
		leggermente visibile	1
		non visibile	2
	Sangue	assente	0
		leggermente insanguinato	1
insanguinato		2	
molto insanguinato		3	
Branchie	Colore	rosso scuro	0
		rosso	1
		mattoni	2
		mattoni scuro o grigio	3
	Muco	assente	0
		leggero	1
		moderato	2
		eccessivo ed appiccicoso	3
	Odore	neutro	0
		di pesce	1
		di urina (ammoniaca)	2
		avariato	3
Addome	Colore	bianco iridescente	0
		giallastro	1
		giallo	2
		giallo intenso	3
	Compattezza	compatto	0
		morbido	1
		concavo	2
		disfatto	3
Cloaca	Condizione	normale	0
		leggermente rotta e scura	1
		aperta e molto scura	2
	Odore	fresco	0
		neutro	1
		di pesce	2
		avariato	3
Totale punti di demerito			max. 39

3. Materiali e metodi

Tabella 3.4 Schema QIM utilizzato per il campionamento n. 4 (Knowles e coll., 2007)

Categoria	Carattere	Descrizione	Punti demerito
Aspetto	Pelle	iridescente	0
		poco luminoso e iridescente	1
		sbiadito	2
		molto sbiadito	3
	Emorragie (corpo e pinne)	assenti	0
		poche/piccole	1
		molte/estese	2
	Consistenza	in rigor mortis	0
		soda, elastica	1
molle, elastica		2	
Occhio	Cornea	trasparente, chiaro, traslucido	0
		opaco	1
		molto opaco	2
	Pupilla	nera luminosa	0
		leggermente bianca	1
		bianca	2
	Forma	convesso	0
		piatto	1
		concavo	2
		infossato	3
Branchie	Colore	rosso vivo	0
		rosso	1
		rosso pallido	2
	Odore	marino	0
		di acqua stagnante	1
		metallico	2
Addome	Colore	bianco (tipico)	0
		con macchie gialle	1
		giallo	2
	Sfintere anale	chiuso	0
		leggermente aperto	1
		aperto	2
Totale punti di demerito			max. 22

3. Materiali e metodi

3.3.2. Biometrie e indici morfometrici

Su tutti gli esemplari raccolti sono state eseguite diverse misure biometriche (Figura 3.2):

- lunghezza totale, pari alla distanza tra l'estremità anteriore del capo (labbro superiore) e la parte distale della pinna caudale;
- lunghezza standard, pari alla distanza tra la punta del capo (labbro superiore) ed estremità caudale delle fibre dei muscoli (attacco della pinna caudale);
- altezza massima, rilevata tra la prima e la seconda pinna dorsale e la corrispondente area ventrale utilizzando un calibro millimetrato;
- lunghezza della testa, distanza tra la punta del capo (labbro superiore) e il margine caudale dell'opercolo.

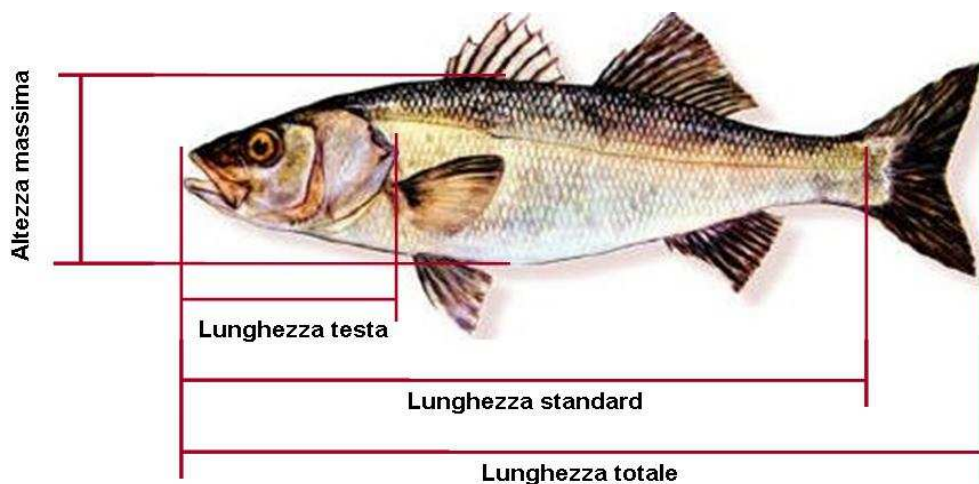


Figura 3.2. Riferimenti topografici per rilevamento biometrie

Da questi valori sono stati calcolati i seguenti indici morfometrici:

- fattore di condizione (FC) = $\text{peso} / \text{lunghezza totale}^3 \times 100$;
- profilo relativo (PR) = $\text{altezza massima} / \text{lunghezza totale}$;
- indice craniale (IC) = $\text{lunghezza testa} / \text{lunghezza totale}$.

3.3.3. Determinazione del colore della pelle

Sulla pelle delle spigole è stato misurato il colore esterno mediante colorimetro Minolta Spectrophotometer CM-508 C (Minolta, Milano). Il colore è stato espresso secondo il metodo CieLab (1976) in termini di luminosità (L^*), indice del rosso (a^*) e indice del giallo (b^*).

Le misure sono state eseguite su aree di diametro pari a 8 mm in cinque punti del corpo, tre in posizione dorsale (anteriore, mediana, posteriore) e due in posizione ventrale (anteriore,

3. Materiali e metodi

posteriore) (Figura 3.3). Le misurazioni effettuate sono state poi riportate come medie delle misure dorsali e di quelle ventrali.

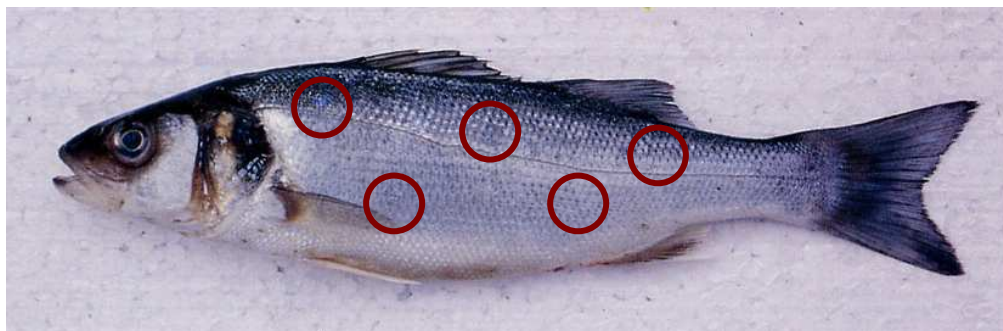


Figura 3.3. Punti di rilevamento del colore esterno

3.3.4. Determinazione della tessitura del pesce intero (TPA)

Per misurare le caratteristiche di tessitura e consistenza del pesce intero, è stata eseguita l'analisi del profilo della tessitura (Texture Profile Analysis, TPA) utilizzando il dinamometro TA.HDI (Stable Micro System Ltd, Regno Unito) (Figura 3.4). Il test consiste nell'esercitare sul pesce intero una compressione costante mediante una sonda di 2 cm di diametro che scende alla velocità di 2 mm/sec per 5 mm di altezza dal momento in cui entra in contatto con la superficie da analizzare. La pressione viene quindi interrotta e lo stantuffo risale fino all'altezza di contatto iniziale. Dopo 10 secondi di attesa, viene effettuata una seconda fase di compressione con le stesse modalità del primo ciclo.



Figura 3.4. Misura della tessitura del pesce intero mediante dinamometro

3. Materiali e metodi

L'analisi è stata eseguita sul pesce intero nella regione sita in corrispondenza dell'inserzione del terzo raggio della pinna dorsale sopra la linea laterale e su entrambi i lati del corpo.

Il software Texture Export è stato utilizzato per l'acquisizione dei dati e per il loro trattamento. Sono state calcolate durezza, coesività, e elasticità. Con la durezza (forza massima), si misura il picco di forza esercitato alla prima compressione del prodotto. La coesività misura come il prodotto reagisce alla seconda compressione ed è calcolata come rapporto fra l'area di lavoro durante la seconda compressione e l'area di lavoro durante la prima compressione. L'elasticità misura come un campione reagisce per ritornare alla posizione originale dopo la prima compressione ed è calcolata come rapporto fra l'area di lavoro durante la prima compressione e l'area di lavoro durante la prima decompressione.

3.3.5. Determinazione del pH oculare

Per la valutazione dell'evoluzione della freschezza, sulle spigole provenienti dal campionamento n. 3 è stato misurato il pH oculare, previa incisione del bulbo oculare, mediante pHmetro CRISON BASIC 20 (Crison Instruments S.A., Alella Spagna) con sonda termica Crison (A.T.C. probe immersion) combinato con elettrodo per campioni semisolidi cat. 52.32 (Poli e coll., 2001).

3.3.6. Eviscerazione e pesatura degli organi interni

Le spigole sono state eviscerate ed è stato rilevato il peso di pacchetto viscerale (comprensivo di cuore, vescica gassosa e gonadi), fegato, grasso periviscerale, gonadi, carcassa eviscerata. Sono stati separati e pesati i singoli filetti con pelle e lo scarto costituito da testa, ossa e pinne e sono stati quindi calcolati i seguenti indici somatici e rese:

- indice epatosomatico (IES) = peso fegato / peso totale \times 100;
- indice viscerosomatico (IVS) = peso pacchetto viscerale / peso totale \times 100;
- indice grasso mesenterico (IM) = peso grasso mesenterico / peso totale \times 100;
- indice gonadico (IG) = peso gonadi / peso totale \times 100;
- resa eviscerato = peso carcassa eviscerata / peso totale \times 100;
- resa in filetti = peso dei due filetti / peso totale \times 100.

3. Materiali e metodi

3.3.7. Sfilettatura della carcassa

Le carcasse eviscerate sono state sottoposte a sfilettatura, separando la testa, le pinne dorsali, la pinna ventrale, le ossa cinto-pettorali, gli pterigiofori e la porzione caudale, dividendo i pesci lungo il piano sagittale nelle due parti e separando la colonna vertebrale. La resa in filetti è stata calcolata come rapporto percentuale tra il peso dei due filetti comprensivo della pelle e il peso vivo.

3.3.8. Determinazione del colore del filetto

La determinazione del colore dei filetti è stata eseguita con le stesse metodiche utilizzate per il colore della pelle, misurando 5 punti del filetto, 3 in posizione dorsale (anteriore, mediana, posteriore) e 2 in posizione ventrale (anteriore, posteriore) (Figura 3.5). Anche in questo caso le misurazioni effettuate sono state poi riportate come media della parte dorsale e media della parte ventrale.

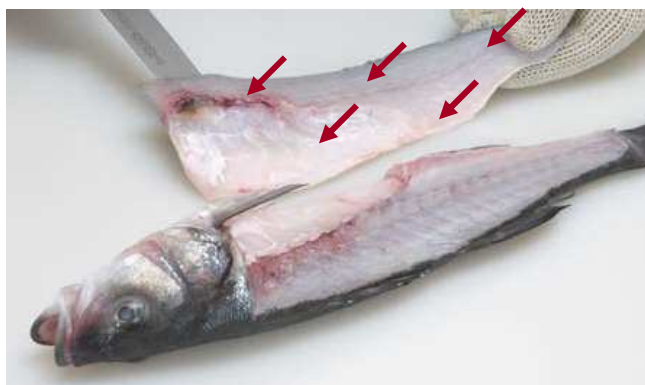


Figura 3.5. Sfilettatura e indicazione dei 5 punti di rilievo di colore e pH sul filetto

3.3.9. Determinazione del pH del filetto

Dopo la separazione del filetto, è stato misurato il pH mediante pHmetro con la stessa strumentazione utilizzata per determinare il pH oculare. La misurazione del pH è stata eseguita negli stessi 3 punti in posizione dorsale del filetto e 2 punti in posizione ventrale, come per il colore (Figura 3.5).

3.3.10. Analisi della tessitura del filetto

È stata valutata la tessitura della carne del filetto mediante analisi TPA utilizzando, come per il pesce intero, il dinamometro TA.HDI (Stable Micro System Ltd, UK). In questo caso, dato il minor spessore del filetto, il test prevedeva due cicli di compressione alla velocità di 2

3. Materiali e metodi

mm/sec per soli 2,5 mm anziché per 5 mm come nell'analisi della tessitura del pesce intero. L'analisi è stata ripetuta su entrambi i filetti in tre punti come indicato in figura 3.6: porzione apicale, porzione centrale e porzione caudale.

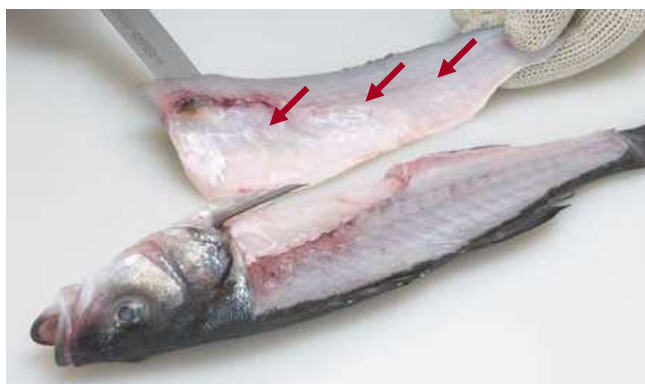


Figura 3.6. Indicazione dei 3 punti di compressione per l'analisi della tessitura sul filetto

3.3.11. Separazione della pelle e macinazione del filetto

Tutti i filetti sono stati privati della pelle e successivamente sottoposti a macinazione con Grindomix (Retsch, Haan, Germany). Dai filetti macinati sono state separate aliquote di prodotto fresco per l'analisi del profilo acidico e dell'azoto basico volatile totale.

3.3.12. Analisi NIRS del filetto fresco

L'analisi NIRS è stata effettuata utilizzando lo spettrometro monocromatore InfraAlyser500 (Bran+Luebbe, Norderstedt, Germania) e sue dotazioni (Figura 3.7). Per contenere e analizzare i campioni macinati freschi è stata utilizzata la tazza aperta. L'analisi NIRS è stata effettuata nell'intervallo di lunghezze d'onda fra 1100 e 2500 nm con un intervallo di lettura di 2 nm per un numero complessivo di 701 punti di lettura per ciascuna scansione.



Figura 3.7. InfraAlyser500 (Bran+Luebbe) e sue dotazioni (tazzina aperta e tazzina chiusa)

Prima dell'inizio delle analisi, lo strumento è stato sottoposto a revisione e calibrazione dei gruppi ottici, al fine di fornire prestazioni ottimali. All'inizio di ogni giornata di analisi, lo

3. Materiali e metodi

strumento era opportunamente portato a temperatura costante di esercizio e venivano effettuati i test previsti per verificare la stabilità di lettura dello strumento e per controllare il livello del rumore di fondo imputabile allo strumento stesso.

3.3.13. Analisi del profilo acidico del grasso muscolare

Dai filetti macinati delle spigole è stata prelevata un'aliquota di circa 10 g, congelata immediatamente a -18°C per la successiva determinazione del contenuto di grasso e del profilo acidico del grasso. L'analisi della frazione degli acidi grassi della componente lipidica è stata effettuata sul campione dopo scongelamento graduale a 4°C per circa 12 ore.

La determinazione degli acidi grassi è stata effettuata in tre fasi: estrazione dei lipidi, trans-esterificazione, analisi al gas-cromatografo. L'estrazione dei lipidi è stata effettuata con il metodo Folch e coll. (1957). La trans-esterificazione è stata effettuata a freddo con sodio metossido in metanolo. La soluzione è stata agitata e centrifugata a 8000 giri/min per 10 minuti. La fase superiore (1 ml) è stata utilizzata per l'analisi gas-cromatografica. L'analisi gas-cromatografica dell'estratto lipidico è stata realizzata mediante gas-cromatografo 8000 Serie Top (Thermo Quest, Italia), dotato di detector a fiamma FID, supporto per colonne capillari, sistema di iniezione Split-splitless e forno programmabile. L'analisi è stata effettuata utilizzando una temperatura dell'iniettore e del detector di 250°C. Come gas di trasporto è stato utilizzato idrogeno, con flusso di 1,6 ml/min e una velocità lineare di 40,2 cm/sec a 200°C. L'analisi è stata eseguita utilizzando una colonna capillare Omegawax 250, 30 m di lunghezza e 0,25 mm di diametro interno (SUPELCO, Usa).

3.3.14. Analisi dell'azoto basico volatile totale (TVBN)

Per la caratterizzazione dell'evoluzione della freschezza, un'aliquota di circa 10 g di filetto macinato è stata posta in cella frigorifera a 4°C e utilizzata per la determinazione dell'azoto basico volatile totale (TVBN, *total volatile basic nitrogen*) entro 4 ore dal prelievo. L'analisi è stata realizzata utilizzando il metodo ufficiale (Decisione della Commissione 95/149/CE). Il campione (10 g) è stato posto in un tubo da distillazione di 750 ml, addizionato con 50 ml di acqua, sottoposto ad agitazione manuale e quindi addizionato con 1 g di MgO e circa 3 ml di agente antischiama. Il tubo di distillazione è stato connesso con l'apparato del Foss Tecator e sono stati aggiunti 25 ml di soluzione ricevente. Il campione è stato distillato e sottoposto a titolazione.

3. Materiali e metodi

3.3.15. Liofilizzazione del filetto

I filetti freschi macinati sono stati posti in vaschette di alluminio in modo tale da formare uno strato omogeneo dello spessore di circa 1,5 cm. I campioni sono stati quindi congelati alla temperatura di -20°C per poi essere sottoposti ad essiccamento mediante liofilizzazione (Martillotti e coll., 1987).

3.3.16. Determinazione delle caratteristiche chimiche del filetto liofilizzato

I campioni liofilizzati sono stati nuovamente macinati con Grindomix e analizzati per determinare la composizione chimica tipo (contenuto di umidità residua, estratto etereo, proteina grezza e ceneri) secondo metodiche AOAC (1990) ed il contenuto di energia lorda mediante bomba calorimetrica (Martillotti e coll., 1987).

3.3.17. Analisi NIRS del filetto liofilizzato

Come per i filetti macinati freschi, l'analisi NIRS dei filetti liofilizzati è stata eseguita utilizzando lo spettrometro monocromatore InfraAlyser500 (Bran+Luebbe). In questo caso, tuttavia, per contenere e analizzare i campioni liofilizzati e macinati è stata utilizzata la tazzina chiusa. L'analisi, l'acquisizione ed il trattamento dei dati, sono stati effettuati con i metodi descritti per i filetti freschi.

3.3.18. Determinazione dei metalli pesanti nel filetto e nei mangimi

Su 18 pool ottenuti da 170 spigole e sette mangimi provenienti da 11 allevamenti appartenenti a tre tipologie produttive (campionamento n. 2), sono stati determinati i seguenti metalli pesanti: arsenico (As), cadmio (Cd), cromo (Cr), rame (Cu), mercurio (Hg), piombo (Pb), selenio (Se) e zinco (Zn).

La procedura di analisi ha previsto una prima mineralizzazione dei campioni ed una seconda fase di lettura con ICP-MS (*Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*). Per la mineralizzazione è stato utilizzato lo strumento ETHOS 900 Microwave Labstation (Milestone) utilizzando il metodo proposto dalla ditta costruttrice. Per la determinazione dei metalli pesanti, è stato utilizzato uno spettrometro con sorgente plasma ad accoppiamento indotto e rivelazione ottica simultanea dell'emissione nell'intervallo 125-770 nm (ICP-OES, *Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectroscopy*) SPECTRO Ciros Vision EOP, auto campionatore SPECTRO ADS500 e software di gestione SPECTRO Smart Analyzer Vision 1.50.534.

3. Materiali e metodi

3.3.19. *Determinazione dei PCB del filetto e dei mangimi*

L'analisi dei PCB è stata realizzata sui filetti liofilizzati e sui mangimi provenienti dai campionamenti n. 1 e 2. A causa del cambiamento delle metodiche ufficiali di riferimento per la valutazione della contaminazione e della nocività dei PCB, nei due set di campioni sono stati analizzati congeneri diversi.

Sulle 133 spigole raccolte durante il campionamento n. 1, provenienti da 4 aziende a diverso sistema di allevamento, è stata determinata la concentrazione di 12 congeneri di PCB (BZ/IUPAC 18, 28, 31, 44, 52, 101, 118, 138, 149, 153, 180, 194), tra cui i 7 congeneri (28, 52, 101, 118, 138, 153 e 180), scelti come indicatori di contaminazione dalle autorità nazionali europee e da enti internazionali (es. Department of Health of U.K., Committee for the Exploration of the Sea) (Smith e Gangolli, 2002) e utilizzati a questo scopo fino al 2006.

Su 18 pool ottenuti da 170 spigole e su 7 mangimi provenienti dal campionamento n. 2, i PCB sono stati invece misurati come concentrazione e sommatoria di tossicità equivalente (Σ TEQ) dei 12 congeneri di PCB diossina-simili (n. BZ/IUPAC: 77, 81, 105, 114, 118, 123, 126, 156, 157, 167, 169 e 189), come previsto dal Regolamento (EC) 1881/2006. Il Regolamento determina i limiti massimi ammissibili nell'ambiente e negli alimenti di PCB come somma degli equivalenti tossici (TEQ) delle concentrazioni di PCDD, PCDF e PCB diossina-simili. La tossicità dei composti diossina-simili è per convenzione espressa in TEQ (toxic equivalency quantity), in cui la tossicità del singolo congenere è riferita in rapporto alla tossicità della diossina (2,3,7,8 tetracloro dibenzo-p-diossina) (che assume valore di riferimento pari a 1). La tossicità complessiva dei 12 congeneri diossina-simili si esprime infine come sommatoria dei TEQ riferiti all'unità di peso fresco (Σ TEQ, pg/g).

3.3.19.1. *Determinazione dei 7 congeneri di riferimento dei PCB*

Dodici congeneri di PCB (BZ/IUPAC 18, 28, 31, 44, 52, 101, 118, 138, 149, 153, 180, 194) sono stati determinati sulle spigole provenienti dal campionamento n. 1 secondo il metodo EPA 1668 rev. A (U.S. EPA, 1999) che prevede il trattamento dei lipidi estratti dal campione liofilizzato con acido solforico, la purificazione SPE (solid phase extraction) e l'analisi con sistema gascromatografo/spettrometro di massa (GC/MS).

In sintesi, al fine di valutare la perdita di analiti, una soluzione contenente esclusivamente decaclorobifenile (DCB) è stata iniettata prima dell'estrazione lipidica. I lipidi sono stati estratti dal campione liofilizzato (3 g per campione) dopo 2 ore di immersione e 3

3. Materiali e metodi

ore di risciacqui in esano (Soxtec System HT 1043 Extraction Unit Tecator, Foss, Amersfoort, Olanda). Gli estratti sono stati sottoposti a trattamento con acido solforico e quindi purificati usando colonnine IST Isolute FL con fase stazionaria Florisil, 500 mg di riempimento, 3 ml volume, condizionate con 3 x 2 ml di esano. Il campione di esano veniva quindi evaporato e il residuo diluito con iso-ottano per essere trasferito in vial e iniettato nel sistema ion trap GC/MS-MS (Varian 2200 Saturn, Varian Inc., CA, USA) con autocampionatore, dotato di colonna capillare CPSil 8 CB Chrompack (30 m x 0,5 mm diametro interno, film di 0,25 mm). Come carrier veniva usato elio a 1 ml/min; l'iniettore era costituito da un sistema split/splitless 1:30, 250°C. Il sistema di ionizzazione era a impatto di elettroni e la sorgente di energia di 70 eV. La calibrazione GC/MS è stata realizzata usando standard esterni (Supelco, Sigma-Aldrich, MO, USA).

L'analisi qualitativa è stata compiuta per confronto con lo standard dei tempi di ritenzione e dei rispettivi rapporti m/z (massa/carica) per ogni singolo analita. La quantificazione della concentrazione di PCB nel campione è stata realizzata in riferimento alle curve di calibrazione con standard esterni e successiva correzione con lo standard interno. La concentrazione di PCB è stata espressa in ng/g di grasso e in ng/g di muscolo fresco.

3.3.19.2. *Determinazione dei 12 congeneri diossina-simili dei PCB*

I campioni provenienti dal campionamento n. 2 sono stati analizzati per la concentrazione di PCB diossina-simili utilizzando ancora il metodo EPA 1668 rev. A (US EPA, 1999), cui sono state apportate alcune modifiche come di seguito specificato.

Dopo aver estratto i lipidi, il grasso raccolto è stato diluito 1/5 con esano contenente gli isotopi C13 dei PCB in esame e prima dell'iniezione nel sistema GC-MS è stata eseguita una pre-separazione dei campioni in HPLC. Il grasso è stato separato con una colonnina di silice, i PCB sono stati eluiti in banda larga prima del grasso. Sono stati impiegati come solventi l'esano nella fase mobile e il metil-t-butil etere (MTBE) come eluente in controflusso. L'HPLC era costituito da due pompe isocratiche, iniettore manuale rheodyne con volume di campione di 20 µl, colonnina di silice (5 µm di diametro delle particelle, 150 x 2,1 mm, Spherisorb, Waters) connessa ad una porta a 6 valvole (Valco) per il controflusso del solvente.

Per l'analisi in GC-MS, la separazione GC è stata eseguita attraverso l'iniezione in una colonna ZB5MS (Zebron, 60 m, 0,25 mm diametro interno, 0,25 µm di spessore del film). L'analisi GC-MS (Shimadzu GCMS-QP2010) è avvenuta in ionizzazione chimica negativa

3. Materiali e metodi

(SIM) usando il gas metano come reagente. Per ottenere il miglior rapporto segnale/rumore sono stati considerati solo due frammenti sia per i composti naturali che per quelli marcati. La quantificazione dei composti è stata ottenuta considerando come standard interno i congeneri marcati ^{13}C e usando la maggiore intensità dei frammenti.

I risultati sono stati espressi come quantità dei singoli congeneri per g di grasso del campione (ng/g grasso). La tossicità dei composti diossina-simili è per convenzione espressa in TEQ (toxic equivalency quantity), in cui la tossicità del singolo congenere è riferita in rapporto alla tossicità della diossina (2,3,7,8 tetracloro dibenzo-p-diossina) (che assume valore di riferimento = 1). La tossicità complessiva dei 12 congeneri diossina-simili è stata espressa infine come ΣTEQ sia in ng/g grasso che in pg/g prodotto fresco, come richiesto dalla normativa.

3.4. *Trattamento dei dati e analisi statistica*

I dati raccolti durante i campionamenti, le operazioni di dissezione, i rilievi e le analisi sono stati implementati in fogli Microsoft Office Excel (2003) per un controllo e trattamento preliminare. I dati sono quindi stati trasformati, quando necessario, in formati adatti alla lettura da parte dei pacchetti di elaborazione statistica. L'analisi statistica si è differenziata in funzione dell'obiettivo specifico considerato.

Obiettivo specifico 1 - Qualità

I dati biometrici e gli indici morfometrici (campionamenti n. 2, 3 e 4) e i dati analitici (composizione chimica, caratteristiche dietetiche, profilo acidico) (campionamenti n. 1, 2, 3 e 4) misurati sui diversi set di campioni sono stati sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA) mediante procedura GLM del SAS (Ver. 9.1.3, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), e considerando come fattori di variazione il sistema di allevamento e la taglia degli animali.

Obiettivo specifico 2 - Contaminanti

I dati relativi al contenuto di metalli pesanti e di PCB sono stati sottoposti ad analisi della varianza, utilizzando la procedura GLM del SAS e considerando come fattore di variabilità l'allevamento di origine (campionamento n 1 e 2).

Per il campionamento n. 2, il peso vivo degli animali al momento della macellazione è stato incluso nel modello come covariata. Inoltre, è stata utilizzata l'analisi di regressione di

3. Materiali e metodi

Microsoft Office Excel (2003) per calcolare i coefficienti di correlazione e le regressioni fra peso vivo degli animali e contenuto di estratto etereo; peso vivo degli animali e contenuto di PCB (ng/g di grasso); contenuto di estratto etereo e livello di PCB (ng/g di grasso).

Obiettivo specifico 3 - Freschezza

L'evoluzione dei dati morfometrici e analitici misurati sui set di campioni n. 3 e 4 all'avanzare del tempo di conservazione sono stati sottoposti ad analisi della varianza mediante procedura GLM del SAS. Sono stati considerati come fattori di variazione la durata della conservazione (campionamenti n. 3 e 4) e l'allevamento di origine (campionamento n. 4). La varianza è stata scomposta nelle due componenti lineare e quadratica.

Le variabili relative alla valutazione sensoriale mediante schemi UE e QIM sono state analizzate per verificarne le caratteristiche della distribuzione (Proc UNIVARIATE del SAS). Le variabili con distribuzione normale sono state sottoposte ad analisi della varianza con procedura GLM del SAS. Le variabili che hanno mostrato una distribuzione non-normale sono state analizzate mediante analisi della varianza non parametrica (test di Kruskal-Wallis e Mann-Whitney) con la procedura NPAR1WAY del SAS.

Obiettivo specifico 4 - NIRS

L'acquisizione dei dati è stata realizzata con software SESAME (versione 3, Bran+Luebbe). Il trattamento matematico e le calibrazioni sono stati compiuti con il software Unscrambler (versione 7.01, Camo ASA, Oslo, Norvegia), previo trasferimento dei dati spettrali utilizzando il formato JDX. Gli spettri sono stati acquisiti come dati in riflettanza e quindi trasformati in assorbanza. I dati spettrali sono stati trattati matematicamente prima di essere utilizzati in calibrazione e validazione. In particolare, i dati spettrali sono stati trasformati in derivata seconda calcolata su un segmento di allisciamento pari a 20 punti (2, 20, 20).

Le calibrazioni per la predizione della composizione chimica del filetto (umidità, proteina grezza, estratto etereo, energia lorda) e di alcune caratteristiche della carcassa (peso della carcassa, resa della carcassa e del filetto e fattore di condizione) sono state calcolate sui dati spettrali trasformati in derivata seconda utilizzando come algoritmo la *Partial Least Square Regression* (PLSR). Le equazioni di calibrazione sono state validate utilizzando la *full cross-validation*. Le equazioni di calibrazione sono state calcolate utilizzando un numero massimo di fattori pari al 10% della numerosità del set di calibrazione, per evitare fenomeni di

3. Materiali e metodi

supercaratterizzazione o *overfitting*. La scelta del numero ottimale di fattori da utilizzare nel modello è stata fatta sulla base della varianza minima in validazione. L'accuratezza e la robustezza delle equazioni di calibrazione calcolate sono state confrontate utilizzando come parametri statistici il coefficiente di correlazione (R) e di determinazione (R^2), l'errore standard di calibrazione (SEC) e di cross-validazione (SECV) (CAMO, 1998).

L'identificazione e l'eliminazione dei campioni *outlier* in fase di calibrazione e validazione sono state fatte avvalendosi degli strumenti statistici e grafici forniti da Unscrambler. I campioni sono stati definiti *outlier* quando il valore di *leverage* è stato superiore a 3, laddove per *leverage* si intende la distanza del campione dal centro del modello. I campioni con un forte errore di stima sono stati nuovamente sottoposti ad analisi chimica per la proprietà considerata prima di essere definitivamente esclusi dal processo di calibrazione o validazione.

I metodi *Principal Component Analysis* (PCA) e *Soft Independent Modelling Class Analogy* (SIMCA) sono stati utilizzati per la discriminazione e classificazione dei campioni in funzione dell'origine (sistema produttivo e/o allevamento) (campionamenti n. 2 e 4) e del tempo di conservazione (campionamenti n. 3 e 4).

4. Risultati e discussione

4. Risultati e discussione

La presentazione dei risultati della presente tesi è stata di seguito organizzata in funzione dei quattro obiettivi specifici definiti nel capitolo 2.

4.1. Obiettivo 1. QUALITÀ - Caratterizzare dal punto di vista morfologico, chimico e dietetico spigole provenienti da allevamenti italiani con diversi sistemi produttivi

4.1.1. Caratteristiche morfologiche e reologiche della carcassa

Le caratteristiche morfologiche, gli indici biometrici da esse calcolati e i risultati di dissezione, con le rese in carcassa e filetti, rilevati sulle spigole provenienti dalle 11 aziende interessate dal campionamento n. 2, non hanno evidenziato interazioni significative tra classe di taglia e tipologia di allevamento per le variabili indicate ($P > 0,05$). Di conseguenza, la Tabella 4.1 riporta le medie degli effetti principali dei due fattori sperimentali considerati (sistema di allevamento e taglia).

Tabella 4.1. Biometrie e risultati alla dissezione: effetto del sistema di allevamento e della taglia (campionamento n. 2)

	Sistema di allevamento				Taglia			DSR ¹
	Estensivo	Intensivo	Gabbie	Prob.	Small	Large	Prob.	
Spigole, n.	51	70	49		87	83		
Peso morto	636 ^b	607 ^a	586 ^a	0,01	478	741	<0,001	116
Peso carcassa eviscerata	551 ^b	521 ^a	498 ^a	0,03	410	636	<0,001	97
Profilo relativo	0,235 ^b	0,227 ^a	0,228 ^a	0,01	0,226	0,234	0,001	0,02
Indice craniale	0,260 ^b	0,241 ^a	0,239 ^a	<0,001	0,249	0,244	<0,01	0,01
Fattore di condizione	1,23	1,20	1,18	0,34	1,16	1,24	<0,001	0,22
Indice epatosomatico, %	1,88 ^a	2,32 ^a	3,26 ^b	<0,001	2,26	2,71	<0,001	0,76
Indice viscerosomatico, %	10,8 ^a	11,4 ^{ab}	12,6 ^b	<0,01	11,3	11,9	0,11	2,52
Indice grasso mesenterico, %	3,40 ^b	4,24 ^b	2,21 ^a	<0,001	3,23	3,34	0,75	2,25
Resa in carcassa, %	87,7 ^b	87,0 ^{ab}	85,9 ^a	<0,01	87,0	86,8	0,63	2,58
Resa in filetti, %	46,1 ^a	48,5 ^b	48,5 ^b	<0,001	47,2	48,2	0,05	3,07

^{a,b,c}Valori sulla stessa riga contrassegnati da lettere diverse differiscono significativamente, $P < 0,05$.

¹Deviazione standard residua.

Le spigole provenienti da sistemi di allevamento estensivo hanno mostrato una maggior incidenza ($P < 0,001$) della regione cefalica rispetto a quelle di allevamenti intensivi a terra o in gabbie a mare, oltre che uno scarto all'eviscerazione (peso del fegato, del pacchetto viscerale e del grasso periviscerale) inferiore. Questo risultato si è tradotto in una resa in carcassa eviscerata significativamente maggiore nelle spigole provenienti da allevamenti estensivi rispetto a quelle di allevamenti con sistema intensivi in gabbia (87,7 vs. 85,9%; $P < 0,05$). La resa in filetti è risultata inferiore nei pesci di allevamento estensivo rispetto a quelli degli altri

4. Risultati e discussione

sistemi (46,1 vs. 48,5%; $P < 0,001$). Infine, l'indice del grasso mesenterico è risultato minore nei soggetti allevati in gabbie piuttosto che in sistema estensivo o intensivo a terra (2,21 vs. 3,40 e 4,24%, rispettivamente; $P < 0,05$).

Gli indici biometrici misurati si sono differenziati per effetto della classe di taglia commerciale ($P \leq 0,01$), seppure con variazioni molto limitate in valore assoluto per profilo relativo e indice craniale. Le spigole più pesanti hanno evidenziato un fattore di condizione superiore e una maggiore incidenza degli scarti all'eviscerazione (indice epatosomatico) ($P < 0,001$), con una differenza che, seppure significativa, non ha prodotto differenze apprezzabili nelle rese in carcassa ($P > 0,05$). La resa in filetti è apparsa superiore nei pesci di taglia maggiore (48,2 vs. 47,2%; $P = 0,05$).

La tipologia di allevamento ha influenzato significativamente il colore della livrea, sia a livello dorsale che ventrale (Tabella 4.2). L'intensità e la saturazione delle tonalità di rosso e giallo sono risultate più marcate nelle spigole di allevamenti estensivi, rispetto a quelle di allevamenti intensivi a terra e, in maniera ancora più evidente, di allevamenti in mare ($P < 0,05$). La classe di taglia non ha influenzato gli indici di colore della livrea fatta eccezione per i valori di L^* in posizione dorsale (42,6 vs. 39,7; $P < 0,05$), che hanno evidenziato una maggiore luminosità delle spigole di piccola taglia.

Tabella 4.2. Colore della pelle delle spigole: effetto del sistema di allevamento e della taglia (campionamento n. 2)

	Sistema di allevamento				Taglia			DSR ¹
	Estensivo	Intensivo	Gabbie	Prob.	Small	Large	Prob.	
Spigole, n.	51	70	49		87	83		
L^* dorsale	38,8 ^b	42,9 ^a	38,7 ^b	<0,05	42,6 ^a	39,7 ^b	<0,05	9,5
a*dorsale	0,02 ^a	-0,21 ^b	-0,71 ^b	<0,05	-0,36	-0,28	n.s. ²	0,57
b*dorsale	7,50 ^a	7,37 ^a	3,32 ^b	<0,05	6,47	6,03	n.s.	3,20
L^* ventrale	68,7 ^a	68,9 ^a	65,6 ^b	<0,05	68,5	67,4	n.s.	7,2
a*ventrale	0,21 ^a	-0,31 ^b	-0,76 ^b	<0,05	-0,41	-0,31	n.s.	0,57
b*ventrale	9,49 ^a	10,0 ^a	5,11 ^b	<0,05	8,35	8,76	n.s.	3,28

^{a,b,c}Valori sulla stessa riga contrassegnati da lettere diverse differiscono significativamente, $P < 0,05$.

¹Deviazione standard residua. ²Non significativo.

Se consideriamo i dati del campionamento n. 4, riferiti a una sola azienda e tipologia di allevamento, le caratteristiche fisiche/qualitative delle spigole campionate sono variate in maniera significativa e in forma più evidente (Tabella 4.3) rispetto a quanto riscontrato sul set di campioni precedente. Basandosi sui risultati ottenuti sulle spigole del campionamento precedente, sopra discussi, le significative differenze di taglia fra gli animali non sono in grado

4. Risultati e discussione

di spiegare da sole le differenze di resa di macellazione riscontrate sulle spigole di questo campionamento in funzione del sistema di allevamento.

Tabella 4.3. Effetto del sistema di allevamento sulle caratteristiche qualitative di spigole (campionamento n. 4)

	Sistema di allevamento			Prob.	DSR ¹
	Estensivo	Intensivo	Gabbie		
Spigole, n.	30	30	30		
Peso morto, g	616 ^c	561 ^b	484 ^a	<0,001	70
Peso carcassa eviscerata, g	547 ^c	498 ^b	439 ^a	<0,001	62
Resa in carcassa, %	88,9 ^a	88,9 ^a	90,8 ^b	<0,001	1,7
Resa in filetti, %	44,2 ^a	47,2 ^b	45,0 ^a	<0,001	2,0
Colore pelle porzione dorsale:					
L*	36,1 ^b	33,3 ^a	35,9 ^a	0,02	4,2
a*	-0,57 ^b	-0,94 ^a	-0,80 ^a	<0,001	0,29
b*	3,94 ^b	1,18 ^a	0,79 ^a	<0,001	1,06
Colore pelle porzione ventrale:					
L*	64,3 ^c	62,0 ^b	58,3 ^a	<0,001	3,6
a*	-0,85 ^b	-1,33 ^a	-0,71 ^b	<0,001	0,31
b*	7,35 ^b	4,82 ^a	4,23 ^a	<0,001	1,84
Tessitura pesce intero					
Forza massima, N	29,2 ^b	21,8 ^a	26,7 ^b	<0,001	4,3
Coersività	0,76 ^a	0,77 ^b	0,75 ^a	<0,001	0,02
Elasticità	0,52 ^a	0,53 ^a	0,55 ^b	<0,001	0,02
pH del filetto	6,29 ^{ab}	6,28 ^b	6,42 ^a	0,02	0,20

^{a,b,c}Valori sulla stessa riga contrassegnati da lettere diverse differiscono significativamente, P<0,05.

¹Deviazione standard residua.

Per quanto concerne gli indici del colore, la luminosità della pelle è variata in funzione del sistema di allevamento con un indice L* maggiore nelle spigole di allevamento estensivo. Queste sono anche risultate più gialle (maggiore valore di b*), così come riportato per il campionamento n. 2.

Nella valutazione della consistenza del pesce, la forza massima esercitata per la prima compressione del campione è risultata maggiore per le spigole di allevamento estensivo e delle gabbie e minore per quelle di allevamento intensivo (29,2 e 26,7 vs. 21,8 N; P<0,001) ad indicare una maggiore consistenza delle spigole dei primi due gruppi. Coersività e elasticità sono variate, sebbene poco in valore assoluto, in maniera significativa. Le diverse caratteristiche di tessitura dei pesci possono essere ascritte al diverso grado di attività fisica degli stessi nel bacino di allevamento, senza dubbio superiore nei pesci di valle e, in misura minore, in quelli di gabbia, dove l'elevato volume di acqua a disposizione e le minori densità per m³ permettono movimenti più attivi rispetto ai pesci nelle vasche intensive. Il pH del filetto è risultato significativamente superiore nelle spigole di gabbia piuttosto che di allevamento estensivo o intensivo (6,42 vs. 6,28 e 6,29; P=0,02, rispettivamente).

4. Risultati e discussione

4.1.2. *Composizione chimica e profilo acidico del filetto*

La composizione chimica tipo dei filetti di spigole provenienti dal campionamento 2 è stata influenzata significativamente dalla tipologia di allevamento (Tabella 4.4). I filetti di spigole di allevamento estensivo sono risultati meno grassi ($P < 0,001$) rispetto a quelli dei pesci allevati intensivamente in vasche a terra e simili ai filetti delle spigole di gabbie a mare. Il contenuto energetico dei filetti è risultato inferiore nelle spigole di allevamento estensivo rispetto a quelle di allevamento intensivo (a terra e in gabbie a mare). La composizione chimica non è stata invece influenzata significativamente dalla taglia considerata.

Tabella 4.4. Composizione chimica e energia lorda del filetto: effetto del sistema di allevamento e della taglia (campionamento n. 2)

	Sistema di allevamento				Taglia			DSR ¹
	Estensivo	Intensivo	Gabbie	Prob.	Small	Large	Prob.	
Spigole, n.	51	70	49		87	83		
Acqua, %	73,3 ^b	69,8 ^a	71,6 ^b	<0,001	71,8	71,4	0,45	3,35
Proteina grezza, %	19,0 ^a	20,0 ^b	19,3 ^a	<0,001	19,4	19,6	0,20	0,87
Estratto etero, %	5,84 ^a	8,38 ^b	7,16 ^{ab}	<0,001	7,01	7,24	0,68	3,42
Ceneri, %	1,23 ^a	1,32 ^b	1,34 ^b	<0,001	1,30	1,29	0,34	0,08
Energia lorda, MJ/kg	6,76 ^a	8,04 ^b	7,76 ^b	<0,001	7,38	7,62	0,29	1,46

^{a,b,c}Valori sulla stessa riga contrassegnati da lettere diverse differiscono significativamente, $P < 0,05$.

¹Deviazione standard residua.

Le differenze di composizione chimica osservate per i pesci provenienti dal campionamento n. 2 sono state confermate dalle osservazioni realizzate con il campionamento n. 1, costituito da 133 spigole provenienti da 4 allevamenti diversi per localizzazione e tecnica di allevamento come precedentemente descritto (Tabella 4.5).

Tabella 4.5. Composizione chimica e energia lorda del filetto: effetto del sistema di allevamento (Campionamento n. 1)

	Allevamento				Prob.	DSR ¹
	Estensivo	Semi-intensivo	Intensivo	Gabbie		
Spigole, n	25	28	46	34		
Acqua, %	75,9 ^c	70,9 ^b	68,0 ^a	70,4 ^b	<0,001	2,0
Proteina grezza ² , %	19,9 ^{ab}	19,6 ^a	20,3 ^b	20,0 ^{ab}	<0,001	0,08
Estratto etero ³ , %	2,9 ^a	7,5 ^b	9,4 ^c	7,1 ^b	<0,001	2,2
Ceneri	1,35 ^c	1,23 ^a	1,32 ^{bc}	1,30 ^b	<0,001	0,05
Energia lorda ³ , MJ/kg	5,77 ^a	7,82 ^b	8,82 ^c	7,92 ^b	<0,001	0,76

^{a,b,c}Valori sulla stessa riga contrassegnati da lettere diverse differiscono significativamente, $P < 0,05$.

¹Deviazione standard residua. ²Probabilità della covariata per il peso vivo delle spigole $P < 0,05$. ³Probabilità della covariata per il peso vivo delle spigole $P < 0,001$.

La probabilità della covariata per il peso degli animali alla macellazione è risultata sempre significativa. Le principali variazioni sono state a carico del contenuto di acqua e,

4. Risultati e discussione

quindi, di estratto etereo ed energia lorda, mentre le differenze per il contenuto proteico, seppure significative, anche in questo caso, sono risultate più limitate in valore assoluto. In particolare, il contenuto di acqua è risultato maggiore e quello di estratto etereo inferiore nelle spigole provenienti dall'allevamento estensivo delle valli venete (estratto etereo: 2,9%). Dall'altro lato, il minore contenuto di acqua e la maggiore concentrazione lipidica sono stati misurati nelle spigole allevate intensivamente in vasche a terra (estratto etereo 9,4%). Valori intermedi sono stati misurati nei filetti degli animali provenienti dall'allevamento semi-intensivo e dalle gabbie in mare.

Con il campionamento n. 3, che ha interessato 90 spigole provenienti da un unico allevamento semi-intensivo sito nella laguna di Marano (UD), sono state ampliate le informazioni sulla variabilità della composizione chimica delle spigole commerciali.

In spigole del peso medio di 308 g, il contenuto di acqua è variato da un minimo del 67,5% a un massimo del 74,6%, con un valore medio del 71,6% (Tabella 4.6). Il contenuto lipidico, inversamente correlato con il contenuto di acqua nei tessuti animali, è variato dal 4,6% al 12,4%, con un valore medio di 7,6%. Le variazioni del contenuto energetico hanno rispecchiato soprattutto le variazioni del contenuto lipidico passando da un minimo di 6,3 a un massimo di 9,1 MJ/kg. Il valore energetico dei tessuti è determinato dalla concentrazione di proteine e soprattutto lipidi, mentre acqua e sostanze minerali non contribuiscono alla sua definizione.

Tabella 4.6. Composizione chimica dei filetti di spigola (campionamento n. 3; n=90)

	Minimo	Massimo	Media	D.S. ¹
Peso morto, g	239	397	308	375
Acqua, %	67,5	74,6	71,6	1,61
Proteina grezza, %	16,0	21,3	19,5	0,75
Estratto etereo, %	4,6	12,4	7,6	1,79
Ceneri, %	1,53	1,06	1,31	0,07
Energia lorda, MJ/kg	6,35	9,06	7,31	0,62

¹Deviazione standard.

Nella tabella 4.7 è riportato l'intervallo di variazione, il valore medio e la variabilità della composizione percentuale dei diversi acidi grassi (AG) misurata nei filetti di spigole.

4. Risultati e discussione

Tabella 4.7. Composizione acidica (% acidi grassi totali) del grasso dei filetti (campionamento n. 3; n=90)

	Minimo	Massimo	Media	DS ¹
Acido miristico (C14:0)	3,80	5,35	4,40	0,21
Acido pentadecanoico (C15:0)	0,30	0,42	0,35	0,02
Acido palmitico (C16:0)	16,10	18,40	17,41	0,42
Acido stearico (C18:0)	2,71	3,99	3,16	0,20
Acido arachico (C20:0)	0,10	0,16	0,12	0,01
Altri acidi saturi	0,78	2,22	0,98	0,15
Totale saturi	25,25	30,50	26,42	0,60
Acido miristoleico (14:1)	0,04	0,20	0,06	0,02
Acido palmitoleico (C16:1)	4,77	5,97	5,46	0,22
Acido oleico (C18:1 ω-9)	16,34	21,46	18,52	1,04
Acido vaccenico (C18:1 ω-7)	2,96	3,42	3,21	0,10
Acido gondoico (20:1 ω-9)	3,09	4,12	3,71	0,18
Altri acidi monoinsaturi	2,54	5,46	3,34	0,50
Totale monoinsaturi	31,49	37,37	34,49	1,26
Acido alfa-linoleico (C18:2 ω-6)	12,19	16,55	14,42	0,87
Acido arachidonico (C20:4 ω-6)	0,34	0,55	0,41	0,05
Altri acidi ω-6	0,84	1,25	0,99	0,06
Totale serie ω-6	13,44	18,00	15,82	0,90
Acido linolenico (C18:3 ω-3)	0,34	0,55	0,41	0,05
Acido stearidonico (C18:4 ω-3)	0,99	1,33	1,18	0,07
Acido eicosapentaenoico (C20:5 ω-3)	4,40	5,80	5,23	0,22
Acido docoesaenoico (C22:6 ω-3)	6,10	10,13	7,48	0,48
Altri acidi ω-3	1,09	1,58	1,31	0,09
Totale serie ω-3	15,12	20,25	17,34	0,93
Altri acidi polinsaturi	2,93	3,64	3,32	0,14
Totale polinsaturi	31,13	37,54	34,39	1,18
Altri acidi	2,66	5,70	4,10	0,61
Rapporto acidi grassi saturi/insaturi	0,36	0,47	0,38	0,01
Rapporto monoinsaturi/polinsaturi	0,85	1,18	1,01	0,07
Rapporto acidi grassi ω-3/ω-6	0,95	1,34	1,10	0,09

¹Deviazione standard.

Il contenuto in acidi grassi saturi rappresenta il 26,5% del totale ed il maggiore rappresentante è l'acido palmitico (C16:0), che costituisce il 66% degli acidi grassi saturi. Gli acidi grassi monoinsaturi rappresentano il 34,5% del totale, con l'acido oleico presente per più del 18%. Il contenuto in acidi grassi polinsaturi è risultato leggermente inferiore a quello dei monoinsaturi, con un valore medio del 34,4% ed è equamente ripartito fra le serie ω-3 (17,3%) e ω-6 (15,8%). Per la serie ω-6 è risultato predominante l'acido alfa-linoleico (C18:2 ω-6), mentre per la serie ω-3 sono risultati predominanti gli acidi eicosapentaenoico e docoesaenoico sugli acidi linolenico e stearidonico (C18:4 ω-3).

Il rapporto fra gli acidi grassi saturi e gli acidi grassi insaturi si è attestato su un valore medio pari a 0,38. La maggiore percentuale di acidi grassi insaturi sui saturi è una caratteristica nutrizionale della carne delle specie ittiche in contrapposizione con quanto riscontrabile nella

4. Risultati e discussione

carne dei vertebrati terrestri che presenta una maggior percentuale di acidi grassi saturi. Il rapporto fra gli acidi grassi monoinsaturi e quelli polinsaturi è risultato uguale ad 1.

Le variazioni di composizione osservate sono da ascrivere sostanzialmente al regime alimentare cui gli animali erano sottoposti nelle diverse condizioni di allevamento, così come già riportato da altri autori (Alasalvar e coll., 2002). Il minore contenuto di grasso nelle spigole di allevamento estensivo è risultato direttamente correlato con la mancata somministrazione di mangime artificiale e l'assenza di un controllo della temperatura nelle acque delle valli venete. Conseguentemente, in autunno e inverno, il progressivo abbassamento della temperatura comporta una progressiva sospensione dell'alimentazione, di per sé già poco abbondante durante la buona stagione.

Anche le differenze fra allevamento intensivo e semi-intensivo possono essere spiegate in funzione del diverso regime alimentare: sebbene i mangimi utilizzati nei due allevamenti avessero un contenuto lipidico simile (estratto etereo pari a circa il 22%), la riduzione di temperatura dell'acqua nel periodo invernale nell'allevamento semi-intensivo, caratterizzato dall'allevamento in estesi bacini all'aperto, potrebbe essere responsabile di una riduzione dei consumi e, quindi, degli accrescimenti, nonostante la somministrazione di mangimi artificiali.

Le differenze fra allevamento intensivo e allevamento in gabbia sarebbero invece da ascrivere al minore contenuto lipidico (11%) delle diete somministrate alle spigole allevate in mare rispetto a quelle allevate a terra (circa 20%) e alla sospensione dell'alimentazione artificiale di queste, almeno un mese prima della cattura.

Per tutti i campionamenti considerati, il contenuto di proteina grezza ha presentato una ridotta variabilità, con valori medi del 19,5% in accordo con i dati riportati da altri autori sulla stessa specie (Poli e coll., 2001; Alasalvar e coll., 2002; Xiccato e coll., 2004).

La composizione chimica del muscolo è risultata simile per le due classi di taglia commerciale qui considerate e sovrapponibile a quella riportata in precedenti ricerche condotte sulla spigola (Orban e coll., 1999; Poli e coll., 2001; Xiccato e coll., 2004). Riguardo alla tipologia di allevamento il prodotto di estensivo è risultato chiaramente distinguibile dagli altri soprattutto per contenuti lipidici decisamente più contenuti tanto da poter far considerare questo prodotto come "magro" a tutti gli effetti.

Le differenze nella composizione chimica osservate erano probabilmente conseguenza sia del regime alimentare che dalle condizioni ambientali dei diversi sistemi di allevamento (Lanari e coll., 1999; Poli e coll., 2001; Alasalvar e coll., 2002; Xiccato e coll., 2004; Ferreira e

4. Risultati e discussione

coll., 2008). Nell'allevamento intensivo, infatti, variando la composizione in nutrienti del mangime e il livello di somministrazione giornaliera è possibile influenzare non solo le performance di crescita, ma anche la composizione delle carni. In particolar modo il contenuto di acqua e lipidi e la qualità stessa dei lipidi depositati riflettono le scelte qualitative e quantitative del regime alimentare (Mohr, 1987; Orban e coll., 2002, Cahu e coll., 2004). A tal proposito Alasalvar e coll. (2002) osservarono differenze di composizione chimica tra spigole selvatiche e spigole allevate, evidenziando come quelle sottoposte ad alimentazione artificiale possedevano un contenuto di lipidi maggiore e un contenuto di acqua minore rispetto a quelle selvatiche, queste ultime assimilabili per abitudini e disponibilità alimentari a quelle di allevamento estensivo in valle. Per quanto concerne il contenuto di proteina e di ceneri, anche nella ricerca sopra citata non si osservarono differenze tra i pesci allevati e quelli selvatici.

Il contenuto lipidico del muscolo è il carattere che maggiormente attira l'attenzione dei consumatori, poiché oltre a rappresentare un'importante componente del valore nutrizionale, condiziona alcuni attributi sensoriali delle carni e può diventare un fattore discriminante a sfavore degli animali allevati, in cui la notevole disponibilità di alimento generalmente si riflette in un maggior livello di grassi nella porzione edule (Shearer, 1994). Per quanto concerne la qualità del grasso nelle carni dei pesci, numerosi lavori riportano che la proporzione dei vari acidi grassi dipende principalmente dalla dieta e, in particolare nei pesci allevati in modo intensivo, dalla composizione acidica dei mangimi utilizzati. Anche altri fattori quali taglia o età, stato riproduttivo, localizzazione geografica e stagione possono influenzare la quantità e la composizione del grasso dei pesci (Nettleton, 1985; Ackman, 1989; Saito e coll., 1999; Alasalvar e coll., 2002).

In termini generali, i risultati ottenuti dalle nostre ricerche ribadiscono il complessivo eccellente valore nutritivo delle spigole provenienti dagli allevamenti nazionali campionati, caratterizzato da un buon livello proteico (19%) e livelli lipidici e calorici crescenti con l'intensità produttiva (estensivo < semi-intensivo e gabbie a mare < intensivo a terra). Il livello medio e il profilo acidico dei lipidi delle carni di spigola permette di classificare questa specie nella categoria dei pesci semi-grassi (Messina e coll., 2009), con un contenuto elevato di acidi grassi polinsaturi a favorevole rapporto ω -3/ ω -6.

4. Risultati e discussione

4.2. Obiettivo 2. CONTAMINANTI - Determinare la presenza e il livello di contaminanti ambientali (PCB e metalli pesanti) in spigole provenienti da differenti sistemi di allevamento italiani

4.2.1. Variatione dei livelli di PCB nei filetti di spigole e nei mangimi

L'analisi dei dati relativi alla concentrazione di PCB nelle spigole provenienti dal campionamento n. 1 ha evidenziato una minore concentrazione di PCB nei pesci sottoposti ad un regime alimentare naturale nei sistemi di allevamento estensivi piuttosto che in quelle alimentate artificialmente negli altri sistemi di produzione (Tabella 4.8). La concentrazione espressa in funzione del contenuto di grasso dei 12 PCB determinati (PCB_{tot}) e dei 7 PCB indicatori (PCB_7) è risultata minore nelle spigole di allevamento estensivo (112,0 e 74,6 ng/g grasso, rispettivamente) rispetto alle spigole degli altri sistemi di allevamento (in media 179,7 e 123,2 ng/g grasso, rispettivamente) ($P < 0,001$).

Tabella 4.8. Concentrazione di PCB (ng/g grasso) in spigole: effetto del sistema di allevamento

	Sistema di allevamento				Prob.	DSR ¹
	Estensivo	Semi-intensivo	Intensivo a terra	Gabbie		
Spigole, n.	25	28	46	34		
PCB 18	0,93	1,31	1,50	1,78	0,16	1,45
PCB 28	1,22	1,81	2,12	1,33	0,15	1,88
PCB 31	0,82	0,16	1,08	0,75	0,14	0,82
PCB 44	3,48 ^a	6,55 ^b	5,51 ^b	5,84 ^b	<0,01	2,95
PCB 52	2,48	4,00	4,16	4,43	0,08	3,02
PCB 101	5,28 ^a	9,71 ^b	10,47 ^b	9,73 ^b	<0,001	4,30
PCB 118	3,17 ^a	5,88 ^b	5,94 ^b	4,73 ^{ab}	<0,001	2,73
PCB 138	15,72 ^a	23,93 ^b	25,49 ^b	23,02 ^b	<0,001	6,12
PCB 149	17,08 ^a	23,72 ^b	27,72 ^b	23,51 ^b	<0,001	6,96
PCB 153	25,92 ^a	43,03 ^{bc}	49,16 ^c	41,56 ^b	<0,001	11,7
PCB 180	20,81 ^a	32,75 ^b	33,63 ^b	32,80 ^b	<0,001	10,2
PCB 194	15,07 ^a	21,93 ^b	24,09 ^b	22,83 ^b	<0,001	7,21
PCB_7 ²	74,63 ^a	121,1 ^b	131,0 ^b	117,6 ^b	<0,001	27,5
PCB_{tot} ³	112,0 ^a	175,8 ^b	190,9 ^b	172,3 ^b	<0,001	38,9

Lettere diverse (^{a, b, c}) sulla stessa riga indicano differenze significative fra i sistemi di allevamento, $P < 0,05$.

¹Deviazione standard residua.

²Somma della concentrazione dei 7 PCB indicatori (n. 28, 52, 101, 118, 138, 153 e 180) evidenziati in grassetto.

³Somma della concentrazione dei 12 PCB determinati.

Quando i valori sono stati espressi per g di muscolo fresco (Tabella 4.9), le concentrazioni di PCB_{tot} e PCB_7 sono risultate inferiori nelle spigole di allevamento estensivo (3,412 e 2,266 ng/g peso fresco, rispettivamente), intermedie nei pesci degli stagni semi-intensivi (15,398 e 10,632) e delle gabbie a mare (13,123 e 8,882), e superiori nei campioni delle vasche di allevamento intensivo (18,176 e 12,440) ($P < 0,001$).

4. Risultati e discussione

Tabella 4.9. Concentrazione di PCB (ng/g filetto fresco) in spigole: effetto del sistema di allevamento

	Sistema di allevamento				Prob.	DSR ¹
	Estensivo	Semi-intensivo	Intensivo a terra	Gabbie		
Spigole, n.	25	28	46	34		
PCB 18	0,027 ^a	0,111 ^{ab}	0,146 ^b	0,143 ^b	<0,01	0,142
PCB 28	0,037 ^a	0,185 ^a	0,220 ^b	0,100 ^a	<0,01	0,217
PCB 31	0,027 ^a	0,105 ^b	0,103 ^b	0,055 ^{ab}	<0,001	0,087
PCB 44	0,100 ^a	0,600 ^b	0,527 ^b	0,449 ^b	<0,001	0,372
PCB 52	0,071 ^a	0,332 ^b	0,396 ^b	0,340 ^b	<0,001	0,330
PCB 101	0,150 ^a	0,851 ^b	0,992 ^b	0,737 ^b	<0,001	0,567
PCB 118	0,100 ^a	0,529 ^{bc}	0,566 ^c	0,349 ^b	<0,001	0,343
PCB 138	0,484 ^a	2,061 ^{bc}	2,411 ^c	1,730 ^b	<0,001	1,050
PCB 149	0,544 ^a	2,052 ^{bc}	2,651 ^c	1,839 ^b	<0,001	1,190
PCB 153	0,781 ^a	3,804 ^{bc}	4,658 ^c	3,137 ^b	<0,001	2,105
PCB 180	0,642 ^a	2,871 ^b	3,198 ^b	2,489 ^b	<0,001	1,595
PCB 194	0,447 ^a	1,898 ^b	2,308 ^b	1,755 ^b	<0,001	1,138
PCB ₇ ²	2,266 ^a	10,632 ^{bc}	12,440 ^c	8,882 ^b	<0,001	5,474
PCB _{tot} ³	3,412 ^a	15,398 ^{bc}	18,176 ^c	13,123 ^b	<0,001	7,996

Lettere diverse (^{a, b, c}) sulla stessa riga indicano differenze significative fra i sistemi di allevamento, P<0,05.

¹Deviazione standard residua.

²Somma della concentrazione dei 7 PCB indicatori (n. 28, 52, 101, 118, 138, 153 e 180) evidenziati in grassetto.

³Somma della concentrazione dei 12 PCB determinati.

Indipendentemente dal sistema di allevamento, il congenere n. 153 è stato il più rappresentato, come trovato anche precedentemente in altre specie (Bayarri e coll., 2001, Antunes e Gil, 2004; Carubelli e coll., 2007; Ferreira e coll., 2008), seguito dai PCB 180 e 138 fra i PCB indicatori, e dai n. 194 e 149 fra gli altri PCB. La concentrazione del congenere n. 118, diossina-simile, è variata fra 0,100 e 0,566 ng/g peso fresco, con il valore più basso (P<0,001) in spigole di sistemi estensivi e quello più alto in pesci allevati in sistemi intensivi con vasche in cemento.

In tabella 4.10, sono riportate le correlazioni intra-classe fra peso del pesce, contenuto di grasso muscolare e contaminazione da PCB.

Tabella 4.10. Coefficienti di correlazione intra-classe fra peso di macellazione, contenuto di grasso muscolare e concentrazione dei 7 PCB indicatori (PCB₇) (come ng/g grasso e ng/g peso fresco)

	Peso macellazione g	Grasso muscolare %	PCB ₇ ng/g grasso
Grasso muscolare, %	0,79		
PCB ₇ , ng/g grasso	0,71	0,86	
PCB ₇ , ng/g peso fresco	0,73	0,96	0,93

Entro allevamento, la concentrazione lipidica del filetto e il peso di macellazione sono risultati correlate positivamente (r=0,79) o, piuttosto, la concentrazione di grasso aumenta con

4. Risultati e discussione

il peso (e l'età) di macellazione delle spigole. La concentrazione dei 7 PCB indicatori espressa in funzione del grasso muscolare è stata correlata positivamente sia con il peso di macellazione delle spigole ($r=0,71$) che con il grasso muscolare ($r=0,86$). La correlazione fra il peso delle spigole e la concentrazione lipidica del filetto è aumentata quando la concentrazione dei PCB indicatori è stata espressa per g di peso fresco ($r=0,73$ e $0,96$, rispettivamente). Tuttavia, a pesi simili, il livello di grasso è variato notevolmente tra i sistemi di allevamento in funzione del regime alimentare (alimentazione naturale o artificiale, contenuto lipidico della dieta, durata del periodo di digiuno invernale, etc.) e le condizioni ambientali (ambiente naturale o controllato) (Figura 4.1).

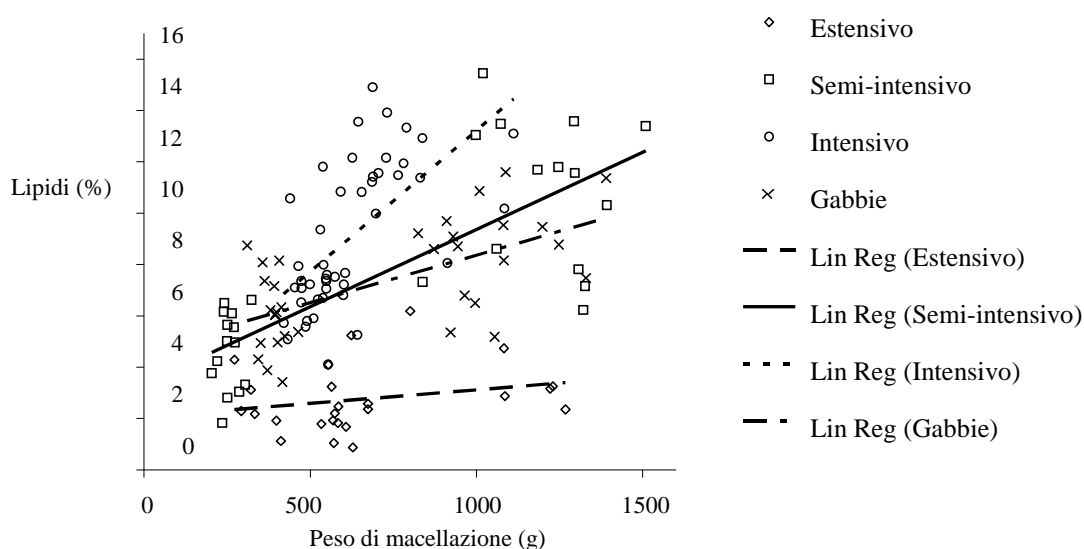


Figura 4.1. Variazioni della concentrazione lipidica del filetto (%) in funzione del peso di macellazione (g) e regressione lineare (Lin Reg) entro sistema di allevamento

In maniera simile, la correlazione fra la concentrazione di PCB indicatori (ng/g peso fresco) e il peso dei pesci è stata influenzata dal sistema di allevamento (Figura 4.2). Al contrario, la relazione dei 7 PCB indicatori e la concentrazione lipidica del filetto non è stata influenzata dal sistema di allevamento e ha evidenziato un aumento di PCB₇ pari a circa 8 ng/g grasso per ogni unità di incremento percentuale della concentrazione lipidica (Figura 4.3).

I risultati delle regressioni sopra indicate confermano l'elevata correlazione fra i livelli di grasso e la concentrazione di PCB, che dipende dalla lipofilicità dei PCB (Bayarri e coll., 2001; Smith e Cangolli, 2002; Antunes e Gils, 2004). Di conseguenza, normalizzando la concentrazione di PCB esprimendoli in funzione della concentrazione lipidica dei filetti si riduce la variabilità imputabile ad altri fattori (peso degli animali, sistema di produzione, condizioni ambientali) (Pastor e coll., 1996; Carubelli e coll., 2007; Trocino e coll., 2009).

4. Risultati e discussione

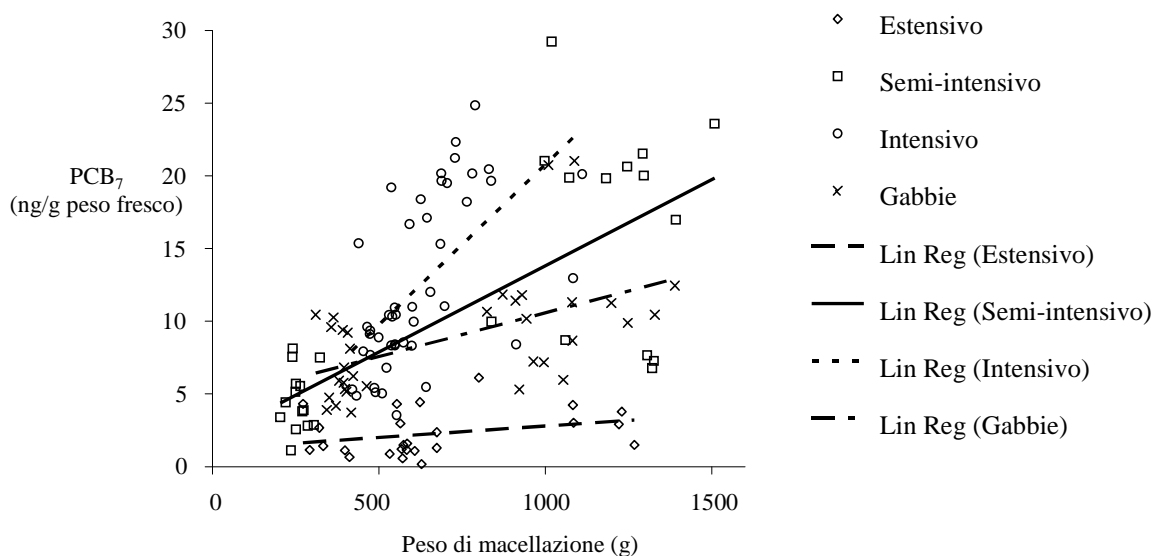


Figura 4.2. Variazioni della concentrazione di PCB₇ (ng/g peso fresco) in funzione del peso di macellazione del pesce (g) e regressioni lineari (Lin Reg) entro sistema di allevamento

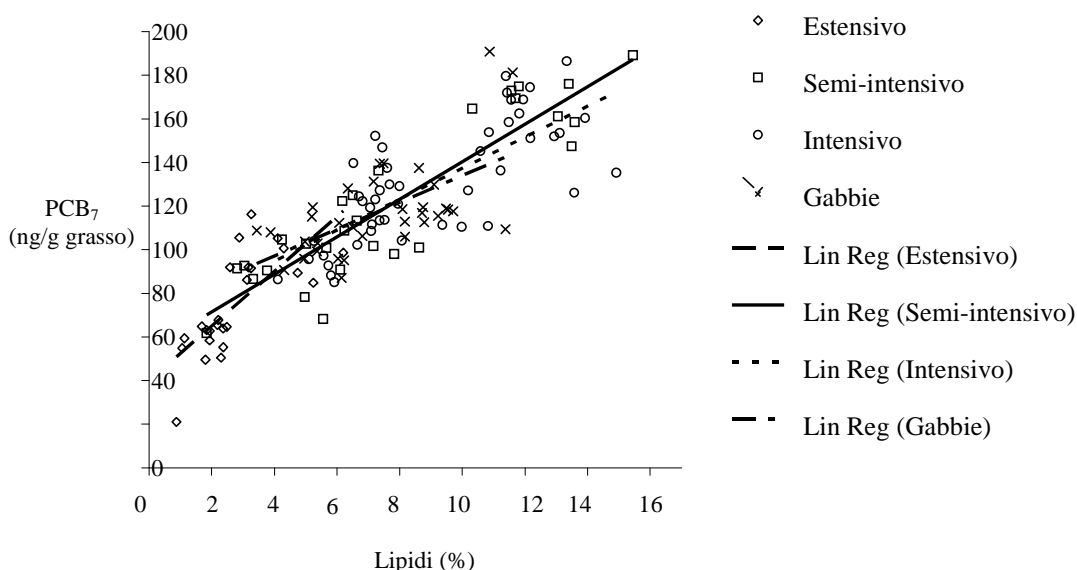


Figura 4.3. Variazioni della concentrazione di PCB₇ (ng/g grasso) in funzione della concentrazione lipidica del filetto (%) e regressioni lineari (Lin Reg) entro sistema di allevamento

Le concentrazioni dei 12 PCB diossina-simili (ng/g di grasso), i coefficienti di tossicità equivalente (TEF, *toxic equivalency factor*) per ciascun congenere e le quantità di equivalenti tossici di PCB in termini di TEQ (pg/g grasso) rilevati nei campioni di mangimi e nei filetti di spigole provenienti dal campionamento n. 2 sono riportati in tabella 4.11 e 5.12, rispettivamente. La Σ TEQ (*total toxic equivalency quantity*) si ottiene come somma dei

4. Risultati e discussione

prodotti della concentrazione di ogni contaminante per il suo TEF, i cui valori sono stati recentemente rivalutati dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (Van den Berg e coll., 2006). Il TEF è un valore compreso tra 0 e 1, dove lo 0 corrisponde ad assenza di tossicità mentre e il valore 1 corrisponde alla tossicità della 2,3,7,8 tetracloro dibenzo-p-diossina comunemente detta diossina.

Il contenuto di PCB diossina-simili totale (Σ PCB, espresso in ng/g grasso) nei mangimi prelevati presso gli allevamenti al momento del campionamento delle spigole, e quindi relativi all'ultimo periodo di allevamento, è risultato maggiore negli allevamenti con gabbie in mare G1 (29,35 ng/g grasso) e G3 (15,80 ng/g grasso) seguiti dagli allevamenti intensivi I1 e I3 (12,72 e 12,62 ng/g grasso rispettivamente), mentre valori decisamente inferiori sono stati riscontrati nei mangimi degli altri allevamenti (Tabella 4.11).

Tabella 4.11. Contenuto di PCB diossina-simili (ng/g grasso) e TEQ (pg/g grasso) nei mangimi prelevati presso gli allevamenti al momento del campionamento n. 2

Allevamento	TEF	E3	I1	I2	I3	G1	G3	G4
Contenuto, ng/g grasso								
PCB n. 77	0,0001	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,22
PCB n. 81	0,0003	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
PCB n. 105	0,00003	2,01	2,86	1,70	2,60	6,39	2,94	1,20
PCB n. 114	0,00003	0,15	0,18	0,14	0,19	0,37	0,27	0,00
PCB n. 118	0,00003	5,48	8,01	5,03	7,78	18,72	10,00	3,28
PCB n. 123	0,00003	0,85	0,23	0,19	0,15	0,24	0,36	0,53
PCB n. 126	0,1	0,02	0,03	0	0	0,03	0	0,00
PCB n. 156	0,00003	0,50	0,70	0,53	0,90	1,88	0,78	0,24
PCB n. 157	0,00003	0,17	0,17	0,12	0,23	0,48	0,81	0,05
PCB n. 167	0,00003	0,31	0,47	0,32	0,63	1,22	0,56	0,15
PCB n. 169	0,03	0,00	0	0,10	0,02	0,02	0,00	0,00
PCB n. 189	0,00003	0,06	0,07	0,07	0,12	0	0,08	0,03
Σ PCB, ng/g grasso		9,55	12,72	8,20	12,62	29,35	15,80	5,70
TEQ, pg/g grasso								
PCB n. 77		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,02
PCB n. 81		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,00
PCB n. 105		0,060	0,086	0,051	0,078	0,192	0,088	0,04
PCB n. 114		0,005	0,005	0,004	0,006	0,011	0,008	0,00
PCB n. 118		0,164	0,240	0,151	0,233	0,562	0,300	0,10
PCB n. 123		0,026	0,007	0,006	0,005	0,007	0,011	0,02
PCB n. 126		2,000	3,000	0,000	0,000	3,000	0,000	0,00
PCB n. 156		0,015	0,021	0,016	0,027	0,056	0,023	0,01
PCB n. 157		0,005	0,005	0,004	0,007	0,014	0,024	0,00
PCB n. 167		0,009	0,014	0,010	0,019	0,037	0,017	0,00
PCB n. 169		0,000	0,000	3,000	0,600	0,600	0,000	0,00
PCB n. 189		0,002	0,002	0,002	0,004	0,000	0,002	0,00
Σ TEQ (pg/g grasso)		2,286	3,381	3,243	0,978	4,479	0,474	0,187

4. Risultati e discussione

Nei mangimi, così come nei filetti (Tabelle 4.11 e 4.12), i congeneri maggiormente presenti sono risultati il n. 118 e il n. 105. Il congenere n. 126, considerato il più tossico (TEF di 0,1 ossia pari al 10% della tossicità della diossina) è stato riscontrato in basse concentrazioni (0,02-0,03 ng/g grasso) solamente in tre dei sette mangimi analizzati e, in particolare, nei mangimi somministrati negli allevamenti G1, I1 e E3.

Tabella 4.12. Effetto del sistema di allevamento e della taglia sul contenuto di PCB nei filetti di spigola (campionamento 2)

	Allevamento				Taglia			DSR ¹
	Estensivo	Intensivo	Gabbie	Prob.	Small	Large	Prob.	
Contenuto (ng/g grasso)								
PCB n. 77	0,71	0,19	0,40	0,09	0,45	0,42	0,84	0,39
PCB n. 81	0,02	0,12	0,29	0,15	0,12	0,17	0,68	0,21
PCB n. 105	8,53	5,00	7,18	0,16	7,23	6,58	0,67	3,16
PCB n. 114	0,48	0,38	0,51	0,41	0,46	0,46	0,99	0,17
PCB n. 118	33,2	15,0	20,3	0,09	24,4	21,3	0,65	14,0
PCB n. 123	0,45	0,87,	0,36	0,64	0,72	0,40	0,52	1,00
PCB n. 126	0,20	0,08	0,11	0,05	0,15	0,11	0,32	0,08
PCB n. 156	3,46	1,21	1,61	0,07	2,47	1,71	0,34	1,63
PCB n. 157	0,83	0,33	0,44	0,06	0,58	0,49	0,62	0,35
PCB n. 167	2,81	0,83	1,07	0,08	1,80	1,34	0,54	1,54
PCB n. 169	0,02	0,02	0,02	0,52	0,02	0,02	0,28	0,01
PCB n. 189	0,41	0,13	0,15	0,04	0,28	0,18	0,21	0,19
ΣPCB (ng/g grasso)	51,1	24,1	32,4	0,11	38,7	33,1	0,60	21,4
TEQ (pg/g grasso)								
PCB n. 77	0,07	0,02	0,04	0,09	0,05	0,04	0,84	0,04
PCB n. 81	0,09	0,04	0,01	0,15	0,04	0,05	0,68	0,06
PCB n. 105	0,26	0,15	0,22	0,16	0,22	0,20	0,67	0,09
PCB n. 114	0,01	0,01	0,02	0,41	0,01	0,01	0,99	0,01
PCB n. 118	1,00	0,45	0,61	0,09	0,73	0,64	0,65	0,42
PCB n. 123	0,01	0,03	0,01	0,64	0,02	0,01	0,52	0,03
PCB n. 126	19,7	7,58	11,0	0,05	14,7	10,8	0,32	7,99
PCB n. 156	0,10	0,04	0,05	0,07	0,07	0,05	0,34	0,05
PCB n. 157	0,02	0,01	0,01	0,06	0,02	0,01	0,62	0,01
PCB n. 167	0,08	0,03	0,03	0,08	0,05	0,04	0,54	0,05
PCB n. 169	0,70	0,55	0,53	0,52	0,66	0,52	0,28	0,28
PCB n. 189	0,01	0,00	0,00	0,03	0,01	0,01	0,29	0,01
ΣTEQ (pg/g grasso)	21,9	8,89	12,6	0,05	16,6	12,4	0,33	8,75
Estratto etereo (%)	5,32	8,42	7,19	0,25	6,60	7,34	0,63	3,18
ΣTEQ (pg/g peso fresco)	0,77	0,72	0,83	0,77	0,82	0,73	0,47	0,24

¹Deviazione standard residua.

Il contenuto del congenere n. 169, il secondo per tossicità (TEF=0,03), è stato maggiore nel mangime dell'allevamento I2 (0,10 ng/g grasso) rispetto a quello degli allevamenti I3 e G1 (0,02) e assente negli altri mangimi. Di conseguenza, poiché i congeneri no. 126 e 169 sono stati misurati solo in pochi mangimi, il livello di PCB, espresso come ΣTEQ, è stato rilevante

4. Risultati e discussione

in 4 dei 7 mangimi, e pari a 4,479 pg/g grasso nel mangime dell'allevamento G1, 3,381 pg/g grasso in quello dell'allevamento I1, 3,243 pg/g grasso per il mangime dell'impianto I2 e 2,286 pg/g grasso per il mangime campionato nell'allevamento E3.

Nei filetti di spigole provenienti dal campionamento n. 2, il congenere maggiormente rappresentato è stato il n. 118 con valori pari a 33,2, 15,0 e 20,3 ng/g grasso per i sistemi estensivi, intensivi e gabbie a mare, rispettivamente ($P=0,09$) (Tabella 4.12). A seguire, maggiormente rappresentati sono risultati i congeneri n. 105 (5-9 ng/g grasso) e n. 156 (1-4 ng/g grasso), con differenze non significative tra i sistemi di allevamento ($P>0,05$).

In funzione del sistema di allevamento è significativamente variato ($P<0,05$) il contenuto di PCB dei soli congeneri n. 126 e 189, laddove è proprio la variazione del congenere n. 126, molto tossico, a determinare le maggiori ricadute sulla tossicità dei prodotti. Il valore maggiore di TEQ è stato misurato per il PCB 126 nei filetti di spigole da allevamenti estensivi (19,7 pg TEQ/g grasso; $P=0,05$) piuttosto che in quelli di pesci da sistemi intensivi (7,58) o da gabbie a mare (11,0). Di conseguenza, la Σ TEQ è variata significativamente ($P=0,05$) in funzione del sistema di allevamento (21,9 vs. 8,89 e 12,6 pg/g grasso per i sistemi estensivi rispetto a quelli intensivi a terra e in gabbie marine, rispettivamente) soprattutto come conseguenza delle variazioni nella concentrazione di PCB n. 126, oltre che n. 118. Esprimendo i dati sul peso fresco, tuttavia, la Σ TEQ è variata in modo limitato e non significativo fra i sistemi di allevamento (da 0,72 a 0,83 pg/g di peso fresco).

Appare opportuno evidenziare che i livelli di PCB (espressi come Σ TEQ, pg/g grasso) misurati nei mangimi campionati presso gli allevamenti non rispecchiano in genere quanto osservato nei filetti dei pesci provenienti dai rispettivi allevamenti. I livelli maggiori di Σ TEQ sono stati riscontrati nei filetti di animali provenienti da sistemi di allevamento estensivo e quindi non sottoposti ad alcun tipo di alimentazione artificiale. Pur non trovandoci nelle condizioni di produrre dati relativi alla contaminazione da PCB nei mangimi somministrati agli animali durante tutto l'arco della loro vita, il contenuto di PCB misurato nei filetti di spigola sembra fortemente condizionato dall'ambiente in cui i pesci sono allevati oltre che dal regime alimentare.

Anche Carubelli e coll. (2007) avevano riportato una maggiore contaminazione delle spigole pescate nella laguna di Orbetello piuttosto che di quelle allevate nelle stesse acque quando la concentrazione dei PCB indicatori (PCB_7) era espressa per g di grasso e una situazione inversa (4,32 e 7,81 ng/g) quando i dati erano espressi sul peso fresco a causa della

4. Risultati e discussione

maggiore concentrazione di grasso dei pesci allevati nelle spigole pescate e allevate. Una variazione più ampia (PCB₇ da 6,04 a 40,0 ng/g peso fresco) è stata misurata in spigole pescate da differenti allevamenti lungo i mari del Tirreno e dell'Adriatico (Pinto e coll., 2008). Il grado di contaminazione da PCB riscontrato nei diversi studi, compresi i nostri due campionamenti, può essere messo in relazione con il diverso grado di contaminazione dell'alimento (Antunes e Gil, 2004; Gil e Antunes, 2004; Carubelli e coll., 2007), ma anche con l'esposizione a sedimenti e materiale organico contaminati dei diversi ambienti acquatici (Ferreira e coll., 2008; Pinto e coll., 2008).

I livelli di PCB in varie specie marine (acciughe, calamari, mitili, scampi, sgombri, triglie e vongole) pescate nel Nord Adriatico hanno evidenziato un'elevata variabilità (PCB₇ da 0,20 a 80,6 ng/g peso fresco) in funzione di specie, concentrazione di grasso corporeo e distanza da aree inquinate (Bayarri e coll., 2001). Bordajandi e coll. (2006) hanno riportato una concentrazione totale di PCB (22 congeneri) in pesci pescati sulla costa spagnola sud-occidentale da 0,9 a 23,8 ng/g peso fresco, così come Storelli e coll. (2007) hanno misurato una concentrazione di PCB (17 congeneri) da 0,70 a 20,9 ng/g grasso in varie specie ittiche edibili pescate nel Mar Adriatico.

Con riferimento alla salute umana e alla sicurezza alimentare, nelle spigole provenienti dal campionamento n. 1, la concentrazione dei PCB₇ (da 75 a 131 ng/g grasso) è risultata sempre inferiore al limite (200 ng/g grasso) stabilito dalla legislazione dell'Unione Europea per la carne suina, la carne avicola fresca e i prodotti derivati destinati al consumo umano (EC, 1999). Per i pesci ed i prodotti ittici, nello specifico, il Regolamento EC 199/2006 sancisce il contenuto massimo accettabile di diossine e furani di 4,0 pg TEQ/g di peso fresco e la sommatoria dei livelli di diossine, furani e PCB diossina-simili di 8,0 pg TEQ/g di peso fresco. Nei filetti provenienti dal campionamento n. 2, anche il valore più elevato di concentrazione di PCB diossina-simili riscontrato in un allevamento estensivo (TEQ 45,3 pg/g grasso, corrispondenti a 0,735 pg/g peso fresco) misurato in uno degli allevamenti estensivi, è risultato comunque largamente inferiore ai limiti di legge.

4.2.2. Variazione dei metalli pesanti nei filetti di spigole e nei mangimi

Sui mangimi e sui filetti delle spigole raccolti con il campionamento n. 2, sono state anche eseguite le analisi per la determinazione del contenuto di diversi metalli pesanti.

4. Risultati e discussione

In quanto ai mangimi (Tabella 4.13), sono state evidenziate notevoli variazioni nella presenza dei singoli elementi in funzione dell'allevamento considerato: la concentrazione dell'arsenico è risultata superiore nei mangimi utilizzati negli allevamenti G1 e I2 e inferiore nei mangimi degli allevamenti E3, I1, I3, G3 e G4. La concentrazione degli altri metalli è risultata meno variabile tra i diversi mangimi e, apparentemente, senza correlazione fra i singoli elementi. In nessuno dei campioni analizzati è stato possibile rilevare la presenza di mercurio, mentre zinco e rame sono risultati più abbondanti, anche in relazione alla probabile integrazione effettuata negli stessi mangimi. In nessun caso, tuttavia, è stato possibile riscontrare una correlazione fra la concentrazione dei singoli metalli pesanti nel mangime e quella nei filetti delle spigole alimentati nella fase finale di allevamento con quegli stessi mangimi.

Tabella 4.13. Contenuto di metalli pesanti (mg/kg s.s.) nei mangimi prelevati presso gli allevamenti al momento del campionamento delle spigole

Allevamento	E3	I1	I2	I3	G1	G3	G4
Arsenico	0,48	0,48	2,45	0,70	5,21	0,62	1,18
Cadmio	0,21	0,31	0,13	0,30	0,18	0,26	0,41
Cromo	0,61	0,59	0,79	0,74	1,39	0,66	0,99
Rame	15,7	16,5	15,2	11,7	9,36	13,3	11,2
Mercurio	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
Piombo	0,40	n.r.	0,36	0,52	0,38	0,41	0,44
Selenio	0,51	n.r.	0,50	0,52	0,56	0,96	1,25
Zinco	138,4	162,8	142,7	136,0	81,2	121,7	80,5

n.r.: non rilevabile

Analizzando la contaminazione della carne di spigola, laddove determinabile, il mercurio nei filetti è stato rilevato a livelli compresi tra 0,023 e 0,152 mg/kg s.s., con i valori maggiori negli allevamenti estensivi. L'arsenico è stato rilevato in concentrazioni elevate (12-15 mg/kg s.s.) in uno degli allevamenti estensivi, mentre in tutti gli altri allevamenti i valori sono risultati compresi tra 1 e 3 mg/kg s.s. e anche inferiori a 1 mg/kg s.s. Cromo, piombo e selenio sono risultati nella media inferiori a 0,5-1 mg/kg s.s. Il cadmio non è stato rilevato in alcun campione di pesce.

L'analisi statistica ha permesso di evidenziare solo poche differenze significative in funzione della tipologia di allevamento, mentre nessuna differenza di concentrazione dei metalli pesanti è stata individuata in funzione della taglia del pesce (Tabella 4.14). I livelli misurati di rame e zinco sono stati corrispondenti a quelli tipici delle carni di pesce. La concentrazione di rame nelle spigole provenienti da allevamenti estensivi è risultata inferiore rispetto agli allevamenti intensivi a terra o in gabbia (0,82 vs. 1,03 e 1,06 mg/kg peso fresco;

4. Risultati e discussione

P<0,01) da correlare con l'uso di tale elemento come comune integratore alimentare. D'altro canto lo zinco, anch'esso largamente incluso nei mangimi per pesci, è stato riscontrato in concentrazioni simili nei pesci provenienti dai diversi sistemi di allevamento.

Tabella 4.14. Effetto del sistema di allevamento e della taglia sul contenuto di metalli pesanti (mg/kg fresco) nei filetti di spigola

	Allevamento				Taglia			DSR ¹
	Estensivo	Intensivo	Gabbie	Prob.	Small	Large	Prob.	
Arsenico	1,37	0,47	0,29	0,12	0,78	0,65	0,76	0,88
Cromo	0,07	0,09	0,08	0,39	0,08	0,08	0,75	0,02
Rame	0,82 ^a	1,03 ^b	1,06 ^b	<0,01	1,00	0,94	0,17	0,09
Mercurio	0,018 ^b	0,007 ^{ab}	0,003 ^a	0,04	0,011	0,008	0,47	0,009
Piombo	0,06	0,13	0,02	0,14	0,06	0,09	0,50	0,09
Selenio	0,21	0,13	0,11	0,14	0,18	0,12	0,13	0,08
Zinco	4,84	4,97	4,64	0,44	4,88	4,76	0,53	0,43

^{a,b}Valori sulla stessa riga contrassegnati da lettere diverse differiscono significativamente, P<0,05.

¹Deviazione standard residua.

Le concentrazioni di mercurio sono risultate superiori (P=0,04) nelle spigole provenienti da allevamenti estensivi rispetto agli altri sistemi di allevamento, sebbene a livelli nettamente inferiori ai 0,5 mg/kg peso fresco fissati dalla normativa UE (Reg. EC 466/2001, modificato dal Reg. EC 78/2005). Poiché il mercurio non era stato individuato a dosaggi rilevabili nei mangimi, la sua presenza nelle carni va attribuita alla contaminazione ambientale, mentre l'alimentazione artificiale sembra rappresentare un fattore di diluizione.

Viceversa, il cadmio pure presente nei mangimi, non è risultato rilevabile nella carne di pesce. La normativa europea fissa un limite al cadmio nei prodotti ittici di 0,05 mg/kg muscolo fresco.

La concentrazione di piombo nei filetti, seppure non diversa significativamente tra sistemi di allevamento, evidenzia una maggiore presenza nell'allevamento intensivo (0,13 mg/kg peso fresco). Sebbene questo valore sia risultato nella media inferiore ai limiti di legge, in due dei quattro allevamenti intensivi monitorati, tale concentrazione è risultata superiore (0,22 e 0,30 mg/kg peso fresco) ai suddetti limiti, fissati in 0,20 mg/kg di muscolo fresco dal Reg. EC 466/2001 (modificato dal Reg. EC 78/2005).

Anche l'arsenico è stato dosato a livelli 3-4 volte superiori nei pesci allevati con sistema estensivo rispetto all'intensivo a terra e in gabbia, seppure a con livelli di probabilità statistica non significativi (P=0,12). Questo era dovuto a valori molto elevati in un unico allevamento, sia nei pesci di taglia Small che in quelli Large. Per l'arsenico, tuttavia, come per gli altri

4. Risultati e discussione

metalli da noi rilevati (rame, zinco, nichel, cromo, selenio) non sono ad ora stabilite dalla legge concentrazioni massime nei prodotti ittici.

Alasalvar e coll. (2002) hanno misurato concentrazioni di metalli pesanti sostanzialmente simili in spigole allevate e selvatiche. Rispetto ai nostri risultati, questi autori hanno riscontrato la presenza di cadmio (0,04-0,07 mg/kg fresco) e piombo (0,2-0,3 mg/kg fresco), ossia valori vicini o superiori ai limiti ammessi. Hanno inoltre trovato valori nettamente superiori ai nostri per lo zinco, mentre valori simili o inferiori sono stati rilevati per il rame e il cromo.

4. Risultati e discussione

4.3. Obiettivo 3. FRESCHENZA - Valutare l'evoluzione della freschezza in spigole d'allevamento in funzione del tempo di conservazione e del sistema produttivo

La valutazione dell'evoluzione della freschezza all'aumentare del tempo di conservazione ha riguardato due gruppi di spigole provenienti dai campionamenti n. 3 e 4. Considerate la diversa struttura e l'applicazione di schemi QIM diversi, le due prove sono state di seguito descritte e discusse separatamente.

4.3.1. Evoluzione della freschezza di spigole provenienti da un unico allevamento conservate per una durata di otto giorni

La valutazione dell'evoluzione della freschezza nelle 90 spigole provenienti da un unico allevamento (campionamento n. 3) è stata fatta analizzando 15 spigole per ciascun tempo di conservazione: 0, 1, 2, 4, 6 e 8 giorni. Come dettagliato in materiali e metodi, la conservazione dei pesci interi avveniva in cassette senza ghiaccio e in cella frigorifera a 2°C. Per la valutazione dello stato di conservazione delle spigole ci si è avvalsi di diversi rilievi relativi a biometrie, caratteristiche reologiche, analisi sensoriali e, infine, analisi chimiche.

Come previsto in fase di costituzione del set, le spigole sottoposte ad analisi alle diverse età di conservazione presentavano un peso medio simile (circa 300 g), trattandosi di un campione di animali della stessa età prelevato da un'unica vasca (Tabella 4.15).

Tabella 4.15. Effetto della conservazione sulle caratteristiche morfologiche e biometriche delle spigole

	Giorni di conservazione						Prob.	Prob. ¹		DSR ²
	0	1	2	4	6	8		L	Q	
Peso morto, g	324	305	303	305	308	301	n.s.	n.s.	n.s.	0,37
Peso eviscerato, g	287	273	276	274	276	271	n.s.	n.s.	n.s.	3,18
Resa di macellazione, %	88,8	89,5	91,1	89,8	89,8	89,9	<0,01	0,10	<0,01	1,49
Resa in filetti, %	48,5	49,6	47,9	48,1	49,2	49,8	n.s.	n.s.	n.s.	2,31
Lunghezza totale, cm	29,7	28,8	28,6	29,1	28,8	28,7	n.s.	n.s.	n.s.	1,12
Lunghezza standard, cm	25,3	24,5	24,4	24,8	24,7	24,5	n.s.	n.s.	n.s.	1,03
Diametro max, cm	6,80	6,81	6,73	6,70	6,58	6,60	n.s.	0,02	n.s.	0,33
Fattore di condizione	1,23	1,27	1,29	1,24	1,28	1,27	n.s.	n.s.	n.s.	0,08
Indice viscerale	9,53	10,13	9,50	10,14	9,32	10,26	n.s.	n.s.	n.s.	1,82
pH occhio	7,25	7,05	7,14	7,05	7,30	7,48	<0,001	<0,001	<0,001	0,16

¹L: componente lineare della varianza; Q: componente quadratica della varianza. ²Deviazione standard residua.

In media, sia la resa di macellazione (89,8%) che la resa in filetti (48,8%) sono risultate soddisfacenti e corrispondenti al peso di macellazione delle spigole analizzate (Poli e coll., 2001). Il tendenziale aumento della resa di macellazione con la durata della conservazione e la

4. Risultati e discussione

maggiore resa osservata negli animali analizzati dopo 2 giorni di conservazione ($Q < 0,01$) sono difficilmente spiegabili come effetto della durata della conservazione. Anche le misure biometriche (lunghezza totale, lunghezza standard, altezza massima), il fattore di condizione e l'indice viscerale hanno evidenziato una buona conformazione degli animali e un buono stato degli animali alla macellazione (Poli e coll., 2001). Queste variabili non sono state influenzate dal tempo di conservazione.

Diversamente, il pH del liquido oculare è variato significativamente con la durata della conservazione (L e $Q < 0,001$) con un valore medio pari a 7,21. Accanto all'aumento lineare del pH oculare da 7,25 a 7,48 ($L < 0,001$) dalla misurazione effettuata sulle spigole subito dopo la macellazione a quella realizzata dopo 8 giorni di conservazione, è stata misurata una significativa riduzione del valore di pH nei primi 4 giorni dopo la macellazione ($Q < 0,001$). La regressione quadratica calcolata fra i dati di pH oculare e la durata della conservazione ha spiegato il 43% della variabilità dei dati, evidenziando una discreta correlazione fra evoluzione del pH oculare e freschezza del pesce (Figura 4.4).

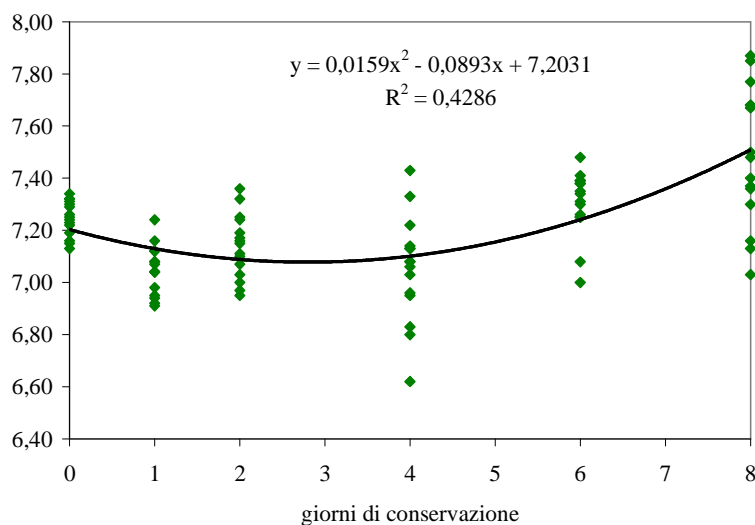


Figura 4.4. Evoluzione del pH oculare

Il pH oculare è considerato un indice affidabile di valutazione della freschezza sulle spigole ancora intere (Poli e coll., 2001). Solitamente, il valore medio misurabile nel liquido presente nel bulbo oculare è superiore a quello misurabile sul filetto e tende ad aumentare con i giorni di conservazione del pesce a causa della proteolisi, batterica ed endogena, con produzione di cataboliti basici, quali ammine ed ammoniaca. Inoltre, il valore del pH oculare è diverso a seconda delle specie e delle modalità di conservazione del pesce (De Francesco, 2004).

4. Risultati e discussione

La valutazione sensoriale è stata realizzata utilizzando lo schema QIM proposto da Alasalvar e coll. (2001) che prevede un punteggio massimo di 39 punti. La durata della conservazione ha significativamente modificato le variabili considerate (Tabella 4.16). In generale, 8 giorni dopo la macellazione, le spigole presentavano ancora un grado di freschezza accettabile (QIM=18), anche se alcuni tratti (brillantezza, muco, durezza per l'aspetto generale; odore e muco delle branchie) hanno evidenziato una degradazione più rapida rispetto ad altri caratteri. Le caratteristiche dell'occhio sono rimaste sostanzialmente invariate e lo scolorimento dell'addome limitato (valore fino a 0,4), mentre la compattezza dell'addome e l'odore della cloaca hanno presentato una degradazione intermedia (1,4-1,5).

Tabella 4.16. Effetto della conservazione sul punteggio attribuito secondo QIM

	Giorni di conservazione						Prob.	Prob. ¹		DSR ²
	0	1	2	4	6	8		L	Q	
Aspetto generale										
Brillantezza	0,0	1,0	1,1	1,2	2,0	2,1	<0,001	<0,001	0,04	0,33
Pelle ³	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,5	<0,001	- ⁴	-	-
Muco	0,0	1,0	0,7	1,9	2,0	2,3	<0,001	<0,001	0,05	0,30
Durezza	0,0	1,0	1,0	1,5	1,9	1,9	<0,001	<0,001	<0,001	0,19
Occhio										
Chiarezza ³	0,0	0,0	0,0	0,7	1,2	1,1	<0,001	-	-	-
Forma ³	0,0	0,0	0,0	0,5	1,0	0,9	<0,001	-	-	-
Iride ³	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	<0,001	-	-	-
Sangue ³	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-	-	-	-
Branchie										
Colore	0,0	1,0	1,2	1,5	1,0	1,8	<0,001	<0,001	<0,001	0,36
Muco	0,0	0,3	1,3	2,0	2,4	2,3	<0,001	<0,001	<0,001	0,48
Odore	0,0	0,0	0,7	1,2	1,4	1,2	<0,001	<0,001	<0,001	0,44
Addome										
Scolorimento ³	0,0	0,1	0,1	0,7	0,2	0,4	<0,001	-	-	-
Compattezza ³	0,0	0,5	1,0	1,1	1,4	1,4	<0,001	-	-	-
Cloaca										
Condizione ³	0,0	0,1	0,1	0,5	0,9	0,3	<0,001	-	-	-
Odore	0,0	0,1	1,3	1,2	1,5	1,5	<0,001	<0,001	<0,001	0,45
Punteggio QIM	0,0	5,2	8,5	13,9	17,8	18,0	<0,001	<0,001	<0,001	1,53

¹L: componente lineare della varianza; Q: componente quadratica della varianza. ²Deviazione standard residua.

³Distribuzione non normale: analisi non parametrica della varianza. ⁴“-“ valore statistico non stimabile.

La regressione fra i punteggi QIM nel periodo da 0 a 8 giorni di conservazione è stata spiegata da un elevato coefficiente di determinazione ($R^2=0,95$), con un'evoluzione lineare (aumento con il tempo di conservazione) e quadratica (rallentamento dell'incremento di valore col tempo di conservazione) (Figura 4.5).

4. Risultati e discussione

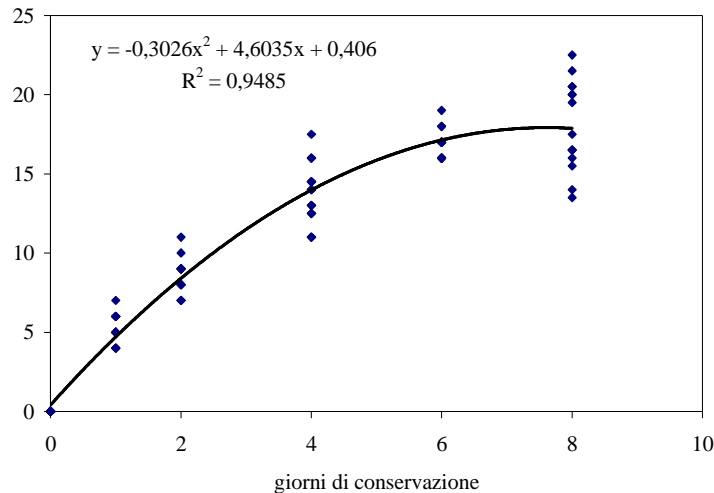


Figura 4.5. Evoluzione del punteggio QIM con la durata della conservazione

La misurazione strumentale delle variabili di colore realizzata sulla pelle delle spigole intere con colorimetro potrebbe rappresentare un metodo oggettivo per la valutazione dell'evoluzione della freschezza nel pesce intero. Sia la luminosità (L^*) che l'indice del rosso (a^*) e l'indice del giallo (b^*) sono cambiati significativamente e linearmente con la durata della conservazione (Tabella 4.17). In particolare, la luminosità è aumentata linearmente all'aumentare del numero di giorni da 44,8 a 52,3, con il valore maggiore misurato dopo 2 giorni di conservazione. L'indice del rosso si è spostato da valori positivi pressoché vicini allo zero (0,28) verso valori minori e tendenti al colore verde (-1,22). La riduzione dell'indice b^* ha evidenziato una corrispondente diminuzione della colorazione gialla (da 5,63 a 2,42) pur con alcune differenze fra i diversi giorni di conservazione ($Q=0,02$).

Tabella 4.17. Effetto della conservazione sul colore della pelle delle spigole

	Giorni di conservazione						Prob.	Prob. ¹		DSR ²
	0	1	2	4	6	8		L	Q	
L^*	44,8	49,5	54,4	50,7	51,7	52,3	<0,001	<0,001	<0,001	3,31
a^*	0,28	0,50	0,37	-0,73	-0,48	-1,22	<0,001	<0,001	0,01	0,52
b^*	5,63	5,83	6,34	3,68	4,82	2,42	<0,001	<0,001	0,02	1,81

¹L: componente lineare della varianza; Q: componente quadratica della varianza. ²Deviazione standard residua.

Mentre il pH misurato sui filetti non ha evidenziato differenze in funzione dei giorni di conservazione, l'evoluzione delle variabili di colore misurate sui filetti è stata simile a quanto sopra descritto per la pelle (Tabella 4.18). La luminosità del filetto è aumentata con i giorni di conservazione ($L<0,001$ e $Q<0,01$). Inoltre gli indici di colore sono risultati superiori nei giorni successivi alla macellazione 1-2-4 piuttosto che al giorno 0 o dopo 6-8 giorni di conservazione ($Q<0,05$): l'indice del rosso è risultato più negativo durante la conservazione (a 1, 2 e 4 giorni)

4. Risultati e discussione

piuttosto che all'inizio e alla fine del periodo ($Q < 0,01$); l'indice del giallo invece è linearmente diminuito all'aumentare dei giorni di conservazione delle spigole da $-0,17$ a $-2,71$. Vale la pena comunque di evidenziare che il valore negativo vicino allo zero dei due indici di colore (rosso e giallo) indica un colore della carne del filetto sostanzialmente grigio con lievi sfumature verde-bluastre.

Tabella 4.18. Effetto della conservazione sul pH e sul colore del filetto

	Giorni di conservazione						Prob.	Prob. ¹		DSR ²
	0	1	2	4	6	8		L	Q	
pH	6,44	6,42	6,41	6,47	6,45	6,39	0,15	0,58	0,22	0,09
L*	37,8	34,6	36,8	37,7	39,2	39,4	<0,001	<0,001	<0,01	2,01
a*	-2,46	-2,92	-2,68	-2,95	-2,75	-2,71	0,01	0,24	0,01	0,40
b*	-0,17	-0,98	-1,88	-2,48	-2,73	-3,01	<0,001	<0,001	0,03	1,02

¹L: componente lineare della varianza; Q: componente quadratica della varianza. ²Deviazione standard residua.

La struttura del filetto è variata significativamente con la conservazione: la durezza (i.e.: la forza massima impiegata durante la prima compressione) è aumentata dalla macellazione (4,86 N al giorno 0) al giorno 4 di conservazione (7,20 N) per poi diminuire ai giorni 6 e 8 ($L < 0,001$; $Q = 0,02$) seguendo l'instaurarsi e la risoluzione del *rigor mortis* (Tabella 4.19). La coesività non è stata significativamente modificata. Il valore di elasticità è linearmente diminuito ($L = 0,09$), anche se i valori più bassi sono stati misurati 1 e 2 giorni dopo la macellazione ($Q < 0,01$), quando il *rigor mortis* era nella sua massima fase. Tuttavia, la risoluzione del *rigor* non ha permesso al filetto di riacquistare la sua iniziale elasticità, la sua capacità di reagire alle deformazioni.

Tabella 4.19. Effetto della conservazione sulle caratteristiche meccaniche (TPA) del filetto

	Giorni di conservazione						Prob.	Prob. ¹		DSR ²
	0	1	2	4	6	8		L	Q	
Durezza, N	4,86	5,98	6,38	7,20	6,77	6,89	<0,001	<0,001	<0,001	1,43
Coesività	0,81	0,80	0,79	0,80	0,79	0,79	n.s.	n.s.	n.s.	0,02
Elasticità	0,46	0,42	0,41	0,43	0,42	0,43	0,02	0,09	<0,01	0,04

¹L: componente lineare della varianza; Q: componente quadratica della varianza. ²Deviazione standard residua.

Nel corso della conservazione, la composizione chimica dei filetti è rimasta costante per contenuto di acqua e di lipidi, mentre quello di proteina grezza è linearmente diminuito (dal 20,0 al 19,3%) (Tabella 4.20). La concentrazione di azoto basico volatile totale (TVBN) è aumentata in modo significativo, anche se in misura ridotta in valore assoluto (da 15,6 a 16,5 mg/100 g; $L < 0,001$).

4. Risultati e discussione

Tabella 4.20. Effetto della conservazione sulla composizione chimica del filetto

	Giorni di conservazione						Prob.	Prob. ¹		DSR ²
	0	1	2	4	6	8		L	Q	
Acqua, %	71,8	70,8	71,9	72,1	72,0	71,1	n.s.	n.s.	n.s.	1,58
Proteina grezza, %	20,0	19,8	19,4	19,2	19,1	19,3	<0,01	<0,001	0,09	0,70
Estratto etereo, %	6,9	8,1	7,4	7,4	7,6	8,3	n.s.	n.s.	n.s.	1,78
Energia lorda, MJ/kg	7,2	7,6	7,2	7,0	7,2	7,5	n.s.	n.s.	n.s.	0,62
TVBN ³ , mg/100 g	15,6	15,0	15,3	15,0	15,0	16,5	<0,001	0,05	<0,01	0,98

¹L: componente lineare della varianza; Q: componente quadratica della varianza. ²Deviazione standard residua.

³Azoto basico volatile totale.

Questa variabile è largamente utilizzata per valutare lo stato di conservazione del pesce in diverse specie, essendo di semplice determinazione e di elevata correlazione con lo stato di degradazione del prodotto (Connel, 1995). I valori di riferimento sono diversi secondo le specie, le modalità di conservazione (refrigerazione, congelamento) e il destino del pesce (inscatolamento, essiccazione, etc.). Per il pesce tenuto su ghiaccio, si può ritenere che a concentrazioni di TVBN di 50-70 mg/100 g il prodotto non possa più considerarsi fresco la sua qualità non sia più accettabile (Connel, 1995). Il Regolamento (EC) 1022/2008 stabilisce che alcune specie di pesci non trasformati sono inadatti al consumo umano qualora risulti dubbia la loro freschezza dal controllo organolettico e il controllo chimico dimostri il superamento dei valori di TVBN di 25-35 mg/100 g, a seconda della specie, per pesci destinati al consumo diretto e di 60 mg/100 g di pesci interi utilizzati per la preparazione di olio di pesce destinato al consumo umano.

Il profilo acidico del grasso del filetto delle spigole è cambiato durante la conservazione dei pesci in maniera limitata in valore assoluto, seppure a volte statisticamente significativa (Tabella 4.21). La percentuale di acido palmitico è diminuita linearmente dal 17,8 al 17,1% all'aumentare dei giorni di conservazione. La variazione a carico dell'acido stearico è apparsa limitata in termini assoluti per la sua bassa percentuale (inferiore allo 0,5%), sebbene significativa dal punto di vista statistico. Non è variata la concentrazione di acidi grassi monoinsaturi, mentre, fra gli acidi grassi polinsaturi della serie ω -6, la concentrazione di acido alfa-linoleico è risultata superiore dopo 8 giorni di conservazione. L'acido arachidonico, poco rappresentato, è risultato maggiore nel campione analizzato lo stesso giorno della macellazione, mentre è significativamente diminuito durante la conservazione. Fra gli acidi grassi della serie ω -3, l'acido linolenico è aumentato linearmente (da 2,04 a 2,23%), mentre l'EPA e, soprattutto, il DHA sono significativamente diminuiti con i giorni di conservazione.

4. Risultati e discussione

Le significative variazioni a carico di altri acidi grassi, polinsaturi o meno, non identificati dall'analisi gas-cromatografica spiegano le limitate variazioni del rapporto fra acidi grassi saturi e insaturi e fra acidi grassi mono e polinsaturi in funzione della conservazione.

Tabella 4.21. Effetto della conservazione sul profilo acidico (% acidi grassi totali) del grasso dei filetti

	Giorni di conservazione						Prob.	Prob. ¹		DSR ²
	0	1	2	4	6	8		L	Q	
Acido miristico (C14:0)	4,38	4,40	4,37	4,52	4,33	4,40	n.s.	n.s.	n.s.	0,21
Acido pentadecanoico (C15:0)	0,35	0,35	0,34	0,36	0,34	0,35	n.s.	n.s.	n.s.	0,02
Acido palmitico (C16:0)	17,8	17,4	17,3	17,4	17,5	17,1	n.s.	n.s.	n.s.	0,36
Acido stearico (C18:0)	3,16	3,14	3,19	3,18	3,21	3,09	n.s.	n.s.	n.s.	0,21
Acido arachico (C20:0)	0,12	0,12	0,13	0,13	0,13	0,13	n.s.	n.s.	n.s.	0,01
Altri acidi saturi	0,93	0,97	0,97	1,03	0,92	1,02	n.s.	n.s.	n.s.	0,15
Totale saturi	26,8	26,3	26,3	26,6	26,4	26,0	0,01	0,02	n.s.	0,57
Acido miristoleico (14:1)	0,06	0,07	0,06	0,07	0,06	0,06	0,08	n.s.	n.s.	0,02
Acido palmitoleico (C16:1)	5,50	5,50	5,45	5,46	5,41	5,46	n.s.	n.s.	n.s.	0,22
Acido oleico (C18:1 ω-9)	18,4	18,8	18,6	18,2	18,8	18,2	n.s.	n.s.	n.s.	1,04
Acido vaccenico (C18:1 ω-7)	3,20	3,19	3,27	3,21	3,21	3,19	n.s.	n.s.	0,09	0,10
Acido gondoico (20:1 ω-9)	3,68	3,75	3,75	3,70	3,67	3,69	n.s.	n.s.	n.s.	0,19
Altri acidi monoinsaturi	3,11	3,35	3,31	3,19	3,68	3,40	0,03	0,03	n.s.	0,48
Totale monoinsaturi	34,2	34,8	34,6	34,1	34,0	34,2	n.s.	n.s.	n.s.	1,24
Acido alfa-linoleico (C18:2 ω-6)	14,3	14,0	14,4	14,3	14,4	15,0	0,02	n.s.	n.s.	0,83
Acido arachidonico (C20:4 ω-6)	0,44	0,42	0,41	0,42	0,40	0,40	n.s.	0,02	n.s.	0,05
Totale serie ω6	15,6	15,4	15,9	15,8	15,9	16,5	0,02	n.s.	n.s.	0,86
Acido linolenico (C18:3 ω-3)	2,04	2,06	2,17	2,13	2,14	2,23	n.s.	n.s.	n.s.	0,12
Acido stearidonico (C18:4 ω-3)	1,14	1,19	1,21	1,18	1,19	1,19	0,09	n.s.	0,03	0,06
Acido eicosapentaenoico (C20:5 ω-3)	5,44	5,28	5,24	5,16	5,14	5,14	n.s.	n.s.	0,06	0,20
Acido docosaenoico (C22:6 ω-3)	8,06	7,65	7,29	7,35	7,25	7,27	0,02	n.s.	0,08	0,74
Totale serie ω-3	18,0	17,5	17,2	17,1	17,0	17,2	0,04	0,10	0,06	0,91
Altri acidi polinsaturi	3,23	3,34	3,33	3,36	3,29	3,41	0,01	n.s.	n.s.	0,14
Totale polinsaturi	34,8	34,1	34,3	34,2	34,1	34,9	n.s.	n.s.	0,02	1,17
Altri acidi	4,28	4,71	4,79	5,13	4,41	4,87	n.s.	0,05	0,02	0,55
Rapporto saturi/insaturi	0,39	0,38	0,38	0,39	0,38	0,38	0,03	0,09	n.s.	0,01
Rapporto mono/poli insaturi	0,98	1,02	1,01	1,01	1,03	0,98	n.s.	n.s.	0,10	0,07
Rapporto ω-3/ω-6	1,15	1,14	1,09	1,09	1,08	1,04	n.s.	n.s.	n.s.	0,09

¹L: componente lineare della varianza; Q: componente quadratica della varianza. ²Deviazione standard residua.

4.3.2. Evoluzione della freschezza di spigole provenienti da tre allevamenti e conservate per una durata di 17 giorni

Le 90 spigole appartenenti al campionamento n. 4 provenivano da 3 allevamenti a diverso grado di intensità produttiva (estensivo, intensivo a terra e intensivo in gabbie marine). Le spigole intere, suddivise in 15 cassette, coperte di ghiaccio e mantenute in cella frigorifera a 2°C, sono state conservate per 5 tempi (3, 6, 10, 13 e 17 giorni), e quindi per un periodo molto più lungo di quanto fatto per il campionamento precedente. Questa scelta è stata motivata dal

4. Risultati e discussione

buon grado di conservazione evidenziato dai pesci conservati per 8 giorni nell'esperienza precedente e dalla volontà di indagare anche le fasi di maggior degradazione dello stato di freschezza.

L'effetto del sistema di allevamento sulle biometrie e le caratteristiche reologiche del pesce e del filetto è stato precedentemente discusso nel capitolo 4.1 relativo alla caratterizzazione morfologica e chimico-nutrizionale. Di seguito tratteremo l'evoluzione delle caratteristiche fisiche e reologiche all'aumentare del tempo di conservazione.

Durante la conservazione (Tabella 4.22), le caratteristiche fisiche delle spigole intere non sono state influenzate dalla conservazione, mentre l'indice a^* della pelle ha assunto valori negativi crescenti ($P < 0,01$), indicativi della tendenza verso una colorazione bluastra, e l'indice b^* è diminuito, indicativo di una progressiva decolorazione della pelle. Questa stessa evoluzione era stata osservata per i pesci e i filetti appartenenti al campionamento n. 3.

Tabella 4.22. Effetto della conservazione sulle caratteristiche qualitative di spigole provenienti da sistemi diversi di allevamento (media dei tre sistemi di allevamento, $n=90$)

	Giorni di conservazione					Prob.	Prob. ¹		DSR ²
	3	6	10	13	17		L	Q	
Peso morto, g	525	542	549	567	585	0,11	<0,01	0,85	70
Peso eviscerato, g	470	485	494	504	522	0,14	<0,01	0,87	62
Resa eviscerato, %	89,7	89,6	89,9	89,0	89,4	0,55	0,37	0,90	1,7
Resa filetti, %	45,9	45,7	45,2	46,1	44,7	0,17	0,15	0,59	2,0
Pesce intero porzione dorsale:									
Indice di luminosità, L^*	36,3	35,3	34,3	35,3	34,3	0,59	0,20	0,59	4,2
Indice del rosso, a^*	-0,63	-0,71	-0,70	-0,84	-0,98	<0,01	<0,001	0,30	0,29
Indice del giallo, b^*	2,55	1,85	2,27	1,37	1,80	0,02	0,01	0,32	1,06
Pesce intero porzione ventrale:									
Indice di luminosità, L^*	62,9	62,4	61,2	61,6	59,6	0,06	<0,01	0,65	3,6
Indice del rosso, a^*	-0,91	-0,95	-0,88	-1,01	-1,07	0,36	0,11	0,36	0,31
Indice del giallo, b^*	6,00	5,78	4,92	5,16	5,48	0,40	0,23	0,18	1,84
Tessitura del pesce intero									
Forza massima, N	28,9	26,8	25,0	25,5	23,4	<0,01	<0,001	0,58	4,3
Coersività	0,75	0,77	0,76	0,77	0,76	<0,01	0,09	<0,01	0,02
Elasticità	0,52	0,55	0,53	0,54	0,53	0,02	0,61	0,01	0,02
pH filetto	6,31	6,31	6,31	6,28	6,45	0,10	0,10	0,07	0,20

¹L: componente lineare della varianza; Q: componente quadratica della varianza. ²Deviazione standard residua.

Anche in altri studi su Sparidi dalla pelle rossa (*Pagrus pagrus*, *Pagrus caeruleostictus* e *Dentex gibbosus*) è descritto un aumento della luminosità della pelle e una diminuzione delle componenti del colore rosso e giallo all'aumentare del tempo di conservazione (Pavlidis e coll., 2006). In spigole e orate sono state misurate una diminuzione di L^* e perdita di colore su un

4. Risultati e discussione

periodo di conservazione più lungo (fino a 21 giorni) (Cakli e coll., 2006; Álvarez e coll., 2008).

In maniera simile a quanto in precedenza descritto per il campionamento n. 3, anche per le spigole prelevate nel quarto campionamento, la durezza del pesce (cioè la forza massima impiegata durante la prima compressione) è progressivamente diminuita dal giorno 3 di conservazione al diciassettesimo giorno (da 28,9 a 23,4 N; $P < 0,01$) seguendo la risoluzione del *rigor*. Le variazioni di coesività e elasticità, pur significative, sono rimaste in un range piuttosto limitato. L'intenerimento della carne all'aumentare della conservazione è stato descritto e misurato strumentalmente anche da altri autori sia su spigole che su orate (Alasalvar e coll., 2002; Álvarez e coll., 2008).

A differenza di quanto osservato nel prova precedente per un periodo di conservazione più breve (8 giorni), nelle spigole di questo studio il pH del filetto è rimasto stabile su valori intorno a 6,30 fino al giorno 13 di conservazione per poi aumentare a 6,45 ($P = 0,10$) al 17° giorno (Tabella 4.22).

Come per la carne dei vertebrati terrestri, le variazioni di pH misurate sul filetto di pesce possono fornire diverse informazioni riguardo alla qualità del prodotto. In condizioni normali, il pH subisce un abbassamento più o meno marcato entro 24 ore dalla morte in quanto in condizioni di respirazione anaerobia si ha produzione di acido lattico. Successivamente si osserva un'inversione di tendenza ed il pH tende ad aumentare a seguito dell'accumulo dei prodotti di degradazione della struttura proteica per l'azione di enzimi autolitici e per la progressiva invasione batterica (Poli, 1999b). L'assenza di una simile e significativa evoluzione del pH nelle spigole appartenenti al campionamento n. 3 e conservate per 8 giorni può essere ascritta al fatto che la prima misurazione del pH è stata già piuttosto bassa perché effettuata circa 24 ore dopo la macellazione. Successivamente, la refrigerazione in condizioni ottimali per modalità di stoccaggio e per temperatura (2°C) ha rallentato i fenomeni catalitici, permettendo il mantenimento di una elevata qualità del prodotto in un periodo di conservazione abbastanza breve (8 giorni), così come in effetti evidenziabile dall'insieme delle misurazioni effettuate. Diversamente, dopo una conservazione di 17 giorni, il pH del filetto delle spigole è aumentato in relazione all'avanzare della degradazione cellulare. In spigole conservate su ghiaccio per 14 giorni, Trocino e coll. (2005) avevano descritto un grado di freschezza accettabile anche alla fine del periodo massimo di conservazione, misurando inoltre un aumento del pH del filetto e dell'occhio, una riduzione dell'indice di rigor ($P < 0,01$) e della luminosità della pelle, mentre non erano state osservate variazioni dell'indice di luminosità o

4. Risultati e discussione

della tessitura del filetto. In una recente review, Abbas e coll. (2008) hanno confermato la chiara correlazione fra la freschezza e il pH muscolare, così come hanno evidenziato un aumento del valore di questo ultimo solo dopo 10-12 d di conservazione.

Il principale obiettivo dello studio realizzato sulle spigole ottenute dal campionamento n. 4 era valutare l'ipotesi che l'evoluzione dello stato di freschezza potesse variare in funzione della tipologia di allevamento, ovvero che pesci provenienti da sistemi di allevamento estensivi si potessero conservare per un tempo diverso rispetto a quelli provenienti da forme intensive, oppure che i processi di alterazione della freschezza potessero assumere velocità diverse in funzione del sistema di allevamento. A quest'ultima domanda possiamo dare una risposta negativa in quanto non sono state osservate interazioni significative tra i fattori sperimentali tempo di conservazione e sistema di allevamento. Tuttavia, la valutazione sensoriale è risultata mediamente diversa per le spigole ottenute nei tre allevamenti campionati.

La valutazione sensoriale della freschezza sulle spigole del campionamento in esame è stata realizzata con una griglia QIM di più recente sviluppo rispetto a quanto utilizzato per le spigole provenienti dal campionamento n. 3. La griglia è stata proposta da Knowles e coll. (2007) specificatamente per le spigole. Nel caso della valutazione sensoriale della freschezza sia con griglia QIM che classificazione UE, l'allevamento di provenienza ha manifestato un effetto significativo sul punteggio attribuito per le diverse caratteristiche (Tabella 4.23).

Tabella 4.23. Effetto del sistema di allevamento sui punteggi QIM e la classificazione UE delle spigole durante la conservazione (media dei giorni 3, 6, 10, 13 e 17 di conservazione, n=90)

	Allevamento			Prob.	DSR ²
	Estensivo	Intensivo	Gabbie		
Aspetto					
Pelle	0,70 ^a	0,76 ^a	1,15 ^b	<0,001	0,15
Emorragie	0,73	0,46	0,73	0,09	0,46
Consistenza	0,83 ^a	1,06 ^b	1,21 ^c	<0,001	0,13
Occhio					
Cornea	0,52 ^a	0,68 ^b	0,78 ^b	<0,001	0,17
Pupilla	0,53 ^a	0,76 ^b	0,99 ^c	<0,001	0,21
Forma	0,55 ^a	1,00 ^c	0,82 ^b	<0,001	0,23
Branchie					
Colore	1,46 ^a	1,71 ^b	1,36 ^a	<0,001	0,20
Odore	0,98 ^a	1,27 ^b	0,99 ^a	<0,001	0,17
Addome					
Colore	0,37 ^a	0,52 ^b	0,75 ^c	<0,001	0,23
Sfintere anale	0,80 ^b	0,61 ^{ab}	0,56 ^a	<0,001	0,34
Punteggio totale	7,45 ^a	8,83 ^b	9,33 ^b	<0,001	0,87
Classe UE ¹	2,33 ^a	2,48 ^c	2,42 ^b	<0,001	0,07

¹E = 1, A = 2, B = 3, Non ammesso = 4. ²Deviazione standard residua.

4. Risultati e discussione

I pesci provenienti dall'allevamento estensivo hanno evidenziato una degradazione più lenta rispetto a quelli dell'allevamento intensivo e, soprattutto, delle gabbie, con un punteggio QIM (media di tutti i tempi di conservazione) pari a 7,45 e 8,83 e 9,33 ($P < 0,001$). Nei pesci provenienti dalle gabbie in mare, l'aspetto della pelle, la consistenza del pesce e le caratteristiche dell'occhio sono risultati più degradati rispetto agli altri allevamenti e alle altre caratteristiche valutate. Le spigole di allevamento intensivo hanno ricevuto il punteggio migliore per la presenza di emorragie (0,46 vs. 0,73 e 0,73; $P < 0,10$), che lascia supporre una migliore gestione dei pesci prima e durante la macellazione.

Nel corso della conservazione (Tabella 4.24), il punteggio QIM totale (media dei tre allevamenti) è significativamente aumentato con i giorni di conservazione, anche se il punteggio finale è risultato in media pari a 14,7, su un massimo possibile di 22, anche dopo 17 giorni. L'aspetto della pelle e la consistenza delle spigole già dopo 3 giorni di conservazione hanno presentato una certa degradazione (punteggio $> 0,80$), così come le caratteristiche delle branchie (odore e colore). Al contrario, le caratteristiche dell'occhio (cornea, pupilla, forma) e quelle dell'addome (colore e aspetto sfintere anale) sono variate in maniera apprezzabile solo a partire dai 13 giorni di conservazione.

Tabella 4.24. Effetto della conservazione sui punteggi QIM delle spigole del campionamento n. 2 (media dei tre sistemi di allevamento, $n=90$)

	Giorni di conservazione					Prob.	Prob. ²		DSR ³
	3	6	10	13	17		L	Q	
Aspetto									
Pelle	0,27	0,85	0,81	1,01	1,41	<0,001	<0,001	0,38	0,14
Emorragie	0,52	0,54	0,53	0,72	0,88	0,04	0,01	0,25	0,46
Consistenza	0,48	0,93	1,08	1,23	1,46	<0,001	<0,001	<0,001	0,13
Occhio									
Cornea	0,14	0,54	0,54	0,80	1,27	<0,001	<0,001	<0,001	0,17
Pupilla	0,17	0,52	0,73	0,81	1,57	<0,001	<0,001	<0,001	0,21
Forma	0,02	0,40	0,77	0,01	1,70	<0,001	<0,001	0,02	0,23
Branchie									
Colore	1,11	1,25	1,54	1,68	1,97	<0,001	<0,001	0,34	0,20
Odore	0,26	0,69	1,05	1,41	1,98	<0,001	<0,001	0,05	0,17
Addome									
Colore	0,15	0,24	0,48	0,69	1,17	<0,001	<0,001	<0,001	0,23
Sfintere anale	0,28	0,58	0,40	0,75	1,27	0,02	<0,001	0,001	0,34
Punteggio QIM totale	3,39	6,54	7,93	10,2	14,7	<0,001	<0,001	<0,001	0,87
Classe EU ¹	1,99	2,00	2,10	2,63	3,35	<0,001	<0,001	<0,001	0,07

¹E = 1, A = 2, B = 3, Non ammesso = 4. ²L: componente lineare della varianza; Q: componente quadratica della varianza. ³Deviazione standard residua.

La correlazione fra il punteggio QIM totale e i giorni di conservazione è sempre risultata elevata (Figure 4.6 e 4.7) indipendentemente dal sistema di allevamento (R^2 da 0,84 a 0,95). Già al giorno 3 di conservazione il punteggio QIM attribuito alle spigole di allevamento

4. Risultati e discussione

estensivo è risultato inferiore (e quindi migliore) rispetto a quello attribuito alle spigole provenienti dagli altri sistemi di allevamento. Questo andamento si è mantenuto nel tempo con rette di regressione parallele tra i tre allevamenti e che vedono la migliore conservabilità mantenuta dall'allevamento estensivo, seguita dall'intensivo a terra e quindi dalle gabbie a mare. È possibile, ma resta da verificare sperimentalmente, che le condizioni più stressanti di allevamento nei sistemi intensivi e i maggiori tempi richiesti dalle operazioni di pesca, uccisione in acqua e ghiaccio e trasporto nel caso delle gabbie marine possano spiegare la minor conservabilità delle spigole provenienti da questi sistemi di allevamento.

L'elevata correlazione misurata fra il punteggio QIM e i giorni di conservazione sia su un periodo di 8 giorni (campionamento n. 3) che di 17 giorni (campionamento n. 4) conferma l'affidabilità del metodo QIM nella predizione della durata della conservazione nelle spigole così come riportato anche in altre specie (Alasalvar e coll., 2002; Álvarez e coll., 2008).

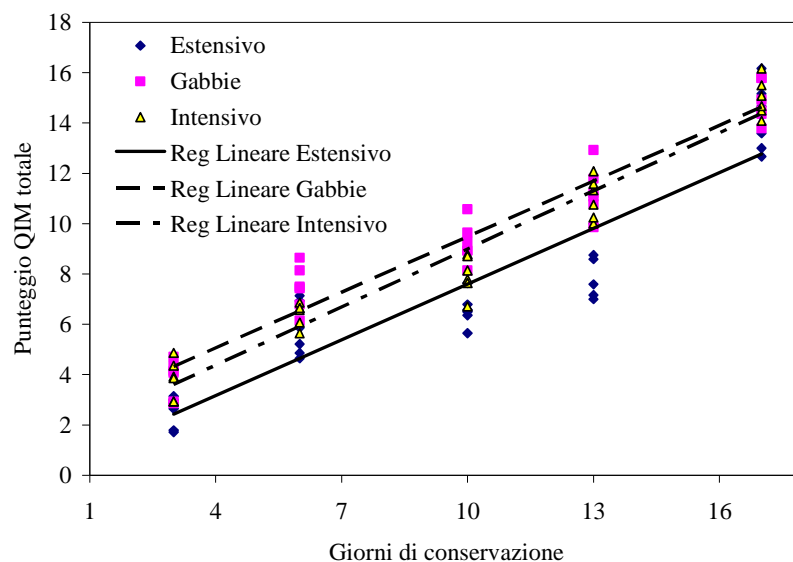


Figura 4.6. Punteggio QIM in funzione dei giorni di conservazione: regressione lineare calcolata entro sistema di allevamento

4. Risultati e discussione

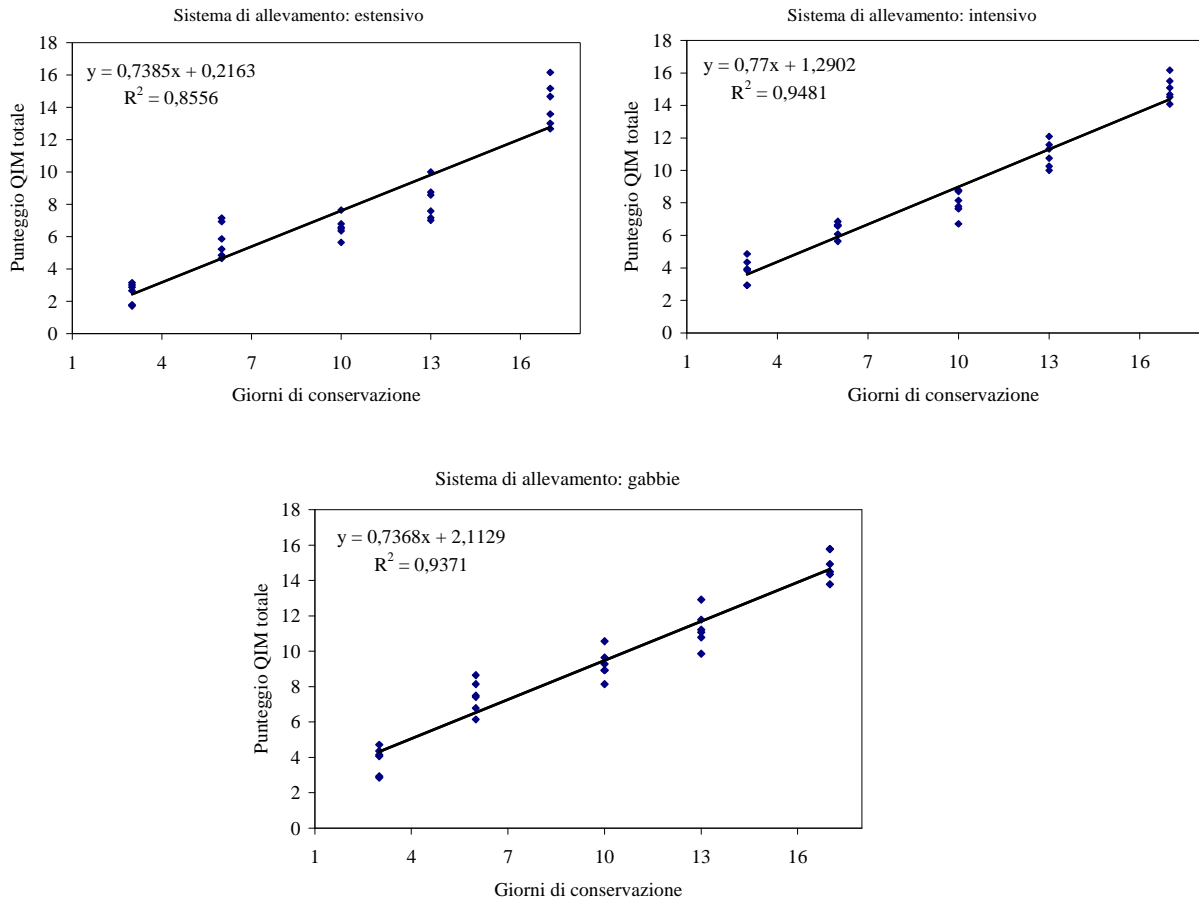


Figura 4.7. Punteggio QIM in funzione dei giorni di conservazione: regressioni lineari per i tre sistemi di allevamento

Un esame più attento delle regressioni tra QIM e tempo di conservazione evidenzia un andamento più complesso rispetto a quello rettilineo sopra modellizzato. L'andamento del QIM è infatti meglio rappresentato da una curva di 3° grado, con un rapido incremento del punteggio da 0, 3 e 6 giorni (QIM da 0 a 3,4 a 6,5), seguito da una crescita più rallentata tra 10 e 13 giorni (da 7,9 a 10,2) seguita infine da un'accelerazione rilevata a 17 giorni (14,7).

Trasformando i valori di QIM in percentuale del valore massimo (pari a 22), è possibile tracciare una curva normalizzata che esprime l'evoluzione della freschezza con valori che vanno da 0 per il prodotto appena pescato a 100 per il prodotto completamente deteriorato. L'andamento dei valori QIM normalizzati di tutti i campioni (insieme dei 3 allevamenti) è rappresentato in Figura 4.8 e conferma l'iniziale rapido peggioramento dell'indice, conseguenza dell'alterazione rapida di alcune caratteristiche esteriori (branchie, muco, occhio), seguito da una fase di rallentamento della degradazione apparente tra 5-6 e i 10-12 giorni, per concludersi con un'accelerazione della perdita di freschezza dovuta all'alterarsi delle caratteristiche degli organi e tessuti interni (compattezza, addome).

4. Risultati e discussione

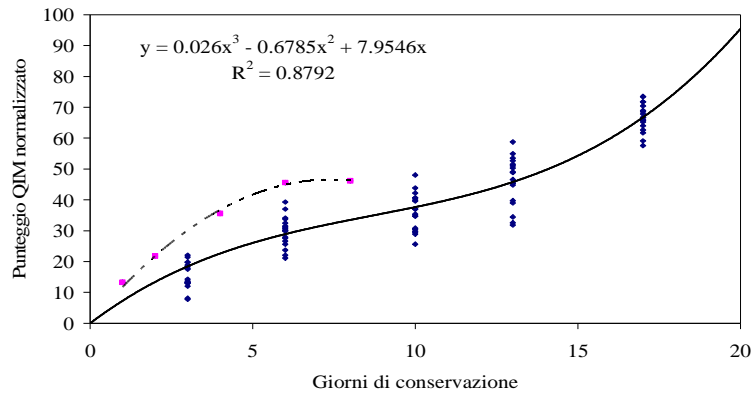


Figura 4.8. Punteggio QIM normalizzato in funzione dei giorni di conservazione (insieme dei tre allevamenti): i punti blu e la linea continua si riferiscono al campionamento n. 4; i punti rosa e la linea tratteggiata rappresentano l'andamento del punteggio QIM normalizzato delle spigole provenienti dal campionamento n. 3

Dalla regressione di cui sopra, che spiega oltre il 90% della variabilità dei dati, è possibile prevedere a circa 20-21 giorni il momento di completa perdita di freschezza.

Questo andamento è solo apparentemente diverso da quello evidenziato per le spigole provenienti dal campionamento n. 3, in quanto il tempo massimo di conservazione era di soli 8 giorni. Inoltre i valori di QIM si riferivano a un massimo di 39 punti, propri dello schema proposto da Alasalvar e coll. (2001). Normalizzando questi valori, analogamente a quanto fatto per il campionamento successivo, è possibile ottenere una curva (Figura 4.8) che presenta un simile andamento curvilineo seppure limitata a un periodo molto più breve e con valori medi superiori, da ascrivere sia alle diverse caratteristiche esaminate dallo schema QIM che dalle differenze nella tecnica di conservazione (assenza di ghiaccio).

4. Risultati e discussione

4.4. Obiettivo 4. NIRS - Utilizzare l'analisi NIRS per la caratterizzazione chimica e dietetica, la valutazione della freschezza e l'identificazione di origine di spigole provenienti da diversi sistemi di allevamento

La figura 4.9 rappresenta gli spettri NIR in assorbanza ottenuti da gruppi di campioni di filetti freschi (a) e liofilizzati (b) di spigole provenienti dal campionamento n. 3 (un allevamento semi-intensivo, n=90).

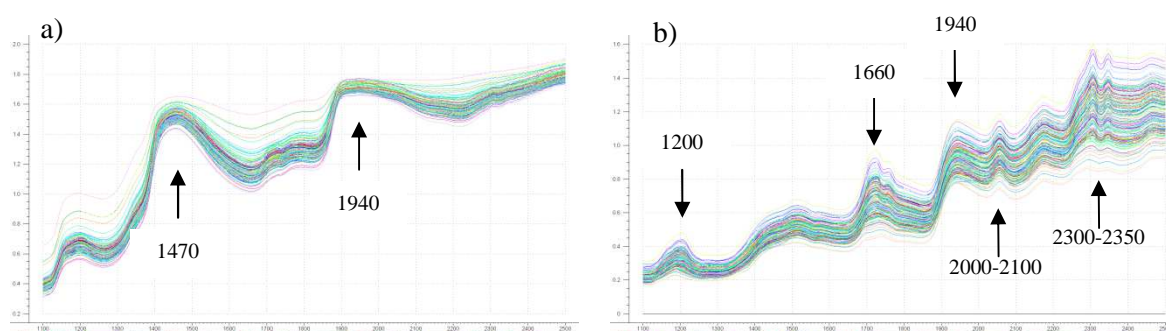


Figura 4.9. Spettri in assorbanza dei filetti di spigole: campioni freschi (a) e liofilizzati (b)

Gli spettri presentano caratteristici picchi di assorbimento che indicano la presenza di determinate sostanze chimiche le cui vibrazioni molecolari assorbono in misura rilevante la radiazione NIR. Nei campioni macinati freschi (Figura 4.9a), gli spettri hanno mostrato un elevato assorbimento intorno a 1470 e 1940 nm da associarsi al contenuto di acqua del campione. Il primo overtone del legame O-H è stato identificato a 1470 nm, così come a 1940 nm l'assorbimento della luce è stato correlato con una banda di combinazione del legame O-H (Osborne e coll., 1993). Negli spettri dei campioni liofilizzati (Figura 4.9b) l'assenza dell'acqua ha permesso di evidenziare anche i picchi relativi all'assorbimento di legami di altre molecole e situati intorno a 1200, 1660, 1940 nm. Quest'ultimo picco è riconducibile all'assorbimento dell'acqua residua nel liofilizzato, mentre i picchi della regione 2000-2100 nm possono essere associati con le vibrazioni dei legami dei composti proteici (Shenk e coll., 1992). Intorno a 2310 e 2350 nm è riconosciuto rispettivamente l'assorbimento dovuto al secondo overtone del legame C-H dei lipidi (Shenk e coll., 1992) e ai movimenti ed alla deformazione di un doppio legame C=C, riconducibili ai doppi legami dei lipidi insaturi (Osborne e coll., 1993).

La trasformazione in derivata seconda (Figura 4.10) dei dati spettrali semplifica l'interpretazione dei dati e migliora i risultati di calibrazione, risolvendo le bande di

4. Risultati e discussione

assorbimento in più picchi come evidenziabile sia sugli spettri dei campioni freschi (Figura 4.10a), in cui risaltano i picchi corrispondenti all'acqua, che su quelli dei campioni liofilizzati (Figura 4.10b), dove sono invece amplificati i picchi corrispondenti ad altri costituenti chimici.

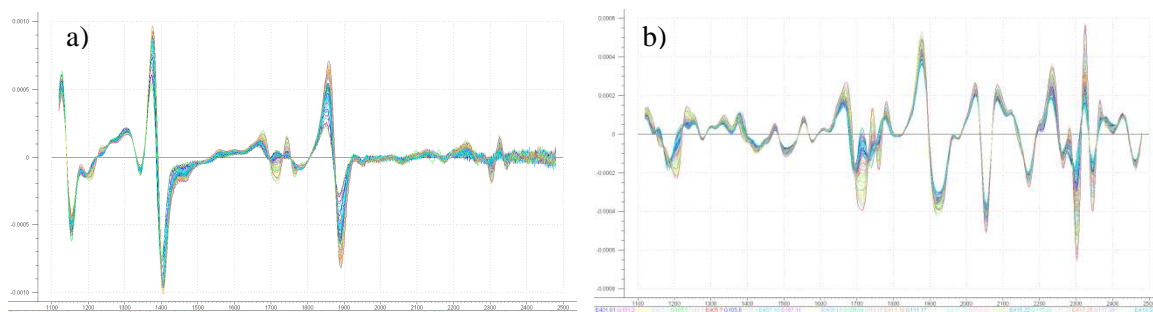


Figura 4.10. Spettri trasformati in derivata seconda da filetti freschi (a) o liofilizzati (b)

4.4.1. Previsione NIRS delle caratteristiche chimico-nutrizionali e morfologiche delle spigole

I valori medi e l'intervallo di variazione della composizione chimico-nutrizionale dei filetti di spigola provenienti dal campionamento n. 3 (unico allevamento) sono riportati in tabella 4.25.

Tabella 4.25. Composizione chimica dei filetti di spigola (n=90) del campionamento 3 inclusi nel set di calibrazione

	Minimo	Massimo	Media	DS ¹
Acqua, %	67,5	74,6	71,6	1,61
Proteina grezza, %	16,0	21,3	19,5	0,75
Estratto etereo, %	4,6	12,4	7,6	1,79
Energia lorda, MJ/kg	6,3	9,0	7,3	0,63

¹Deviazione standard

Il contenuto di acqua è variato da un minimo del 67,5% a un massimo del 74,6%, con un valore medio del 71,6%. Il contenuto lipidico è variato dal 4,6% al 12,4%, con un valore medio di 7,6%, quello di energia da un minimo di 6,3 a un massimo di 9,0 MJ/kg. Sulle spigole dello stesso campionamento, l'analisi NIRS è stata estesa alla valutazione del profilo acidico del grasso del filetto, le cui caratteristiche sono state descritte in precedenza (vedi capitolo 4.1; Tabella 4.7).

Analizzando i campioni freschi macinati, la predizione del contenuto di acqua è risultata buona con una correlazione in validazione comparabile a quella di calibrazione (0,95) e un errore di predizione pari allo 0,47% (Tabella 4.26, Figura 4.11a). I risultati particolarmente buoni in calibrazione per la predizione del contenuto di proteina grezza (Figura 4.11b) ($R^2_c =$

4. Risultati e discussione

0,98, SEC = 0,10%) non sono stati mantenuti in validazione, pur rimanendo ancora accettabili ($R^2_{cv} = 0,72$, $SECV = 0,37\%$). Come per l'acqua, la predizione per il contenuto lipidico del filetto ha evidenziato un elevato grado di correlazione ($R^2_{cv} = 0,96$) (Figura 4.12) con un numero limitato di fattori (2) sia in calibrazione sia in validazione e un SECV pari a 0,50%.

Tabella 4.26. Statistiche di calibrazione e di validazione per la previsione delle caratteristiche chimiche dei filetti di spigola (Campionamento n. 3)

	Calibrazione			Full-cross validazione	
	Fattori n.	R^2_c	SEC	R^2_{cv}	SECV
Acqua, %	2	0,95	0,42	0,95	0,47
Proteina grezza, %	9	0,98	0,10	0,72	0,37
Estratto etereo, %	2	0,96	0,47	0,96	0,50
Energia lorda, MJ/kg	2	0,96	0,15	0,95	0,18

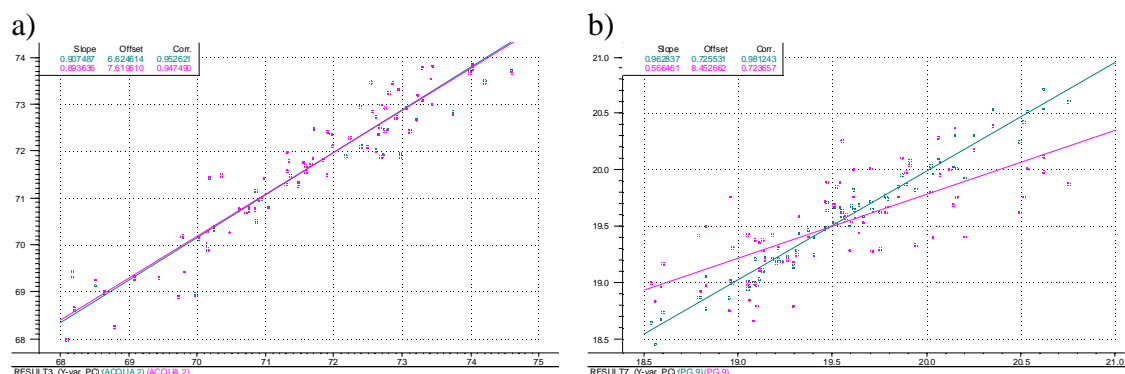


Figura 4.11. Regressione per la previsione del contenuto di acqua (a) e proteina grezza (b) dei filetti freschi macinati (campionamento n. 3)

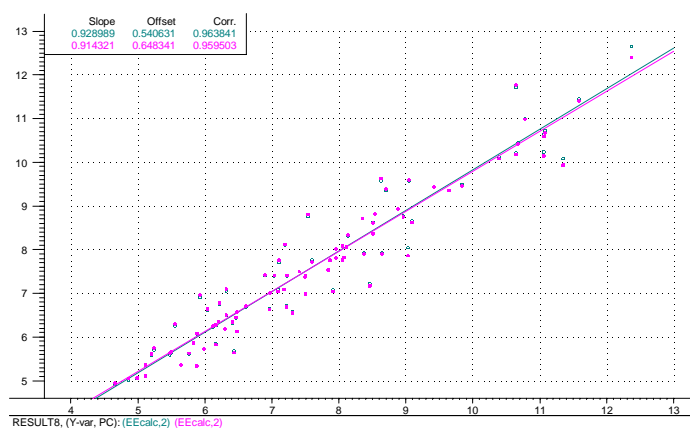


Figura 4.12. Regressione per la previsione del contenuto di estratto etereo dei filetti freschi macinati (campionamento n. 3)

La predizione NIRS della percentuale di acidi grassi dei lipidi muscolari non ha fornito risultati molto incoraggianti e nella tabella 4.27 sono presentate le poche calibrazioni per le quali il coefficiente di correlazione in calibrazione è risultato superiore a 0,50 (acido palmitico, acidi grassi saturi, acido alfa-linoleico, acido docosaenoico) (Figura 4.13). In generale, è stato

4. Risultati e discussione

selezionato un basso numero di fattori (1-2), se non nel caso della predizione del contenuto di acido α -linoleico (4 fattori) per la quale è stato misurato il più elevato coefficiente di correlazione in calibrazione (0,66). Tuttavia, i risultati in validazione hanno evidenziato un SECV elevato (da 0,17% a 0,74%) che indica un grado di errore della stima troppo elevato ai fini di una stima sufficientemente precisa da poter essere applicata nella pratica.

Tabella 4.27. Statistiche di calibrazione e di validazione per la previsione del contenuto iniziale di acidi grassi (%) in filetti analizzati al NIRS dopo macinazione (campionamento n. 3)

	Calibrazione			Full-cross validazione	
	Fattori n.	R ² c	SEC	R ² cv	SECV
Acido palmitico (C16:0)	1	0,52	0,32	0,49	0,34
Totale acidi grassi saturi	1	0,50	0,33	0,45	0,34
Acido α -linoleico (C18:2 ω -6)	4	0,66	0,56	0,43	0,71
Acido docoesaenoico (C22:6 ω -3)	2	0,51	0,16	0,42	0,17

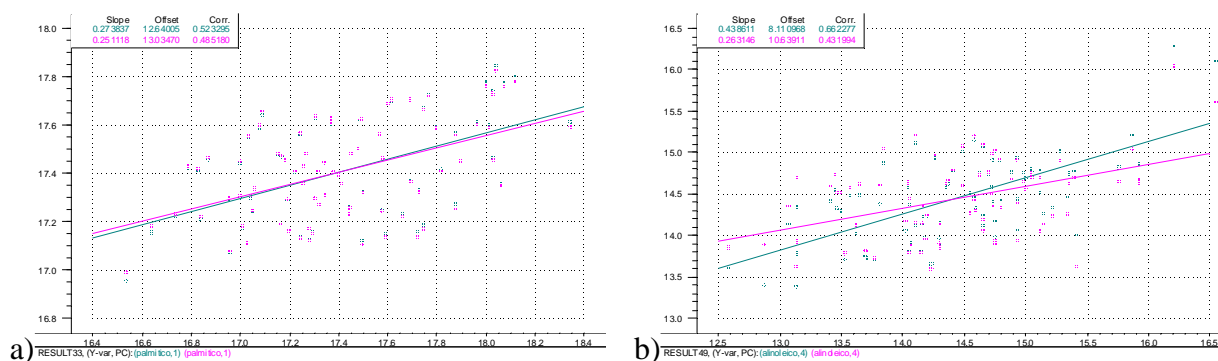


Figura 4.13. Regressione per la previsione del contenuto di acido palmitico (a) e acido linoleico (b) dei filetti freschi macinati

Nel set di calibrazione delle spigole appartenenti al campionamento n. 2 (provenienti da 11 allevamenti diversi distribuiti sul territorio nazionale), l'estratto etereo è variato da un minimo dello 0,17% a un massimo del 16,0%, la proteina grezza dal 16,2% al 26,8% e il contenuto di energia da 4,09 a 10,96 MJ/kg (Tabella 4.28). Per questo set di campioni, l'analisi NIRS è stata utilizzata per la predizione della composizione chimica, ma la sua applicazione è stata estesa anche alla predizione di alcune variabili legate all'animale e alle caratteristiche della carcassa. Nel set di calibrazione, le ampie differenze di peso vivo (da 269 a 1032 g), resa della carcassa e dei filetti, e fattore di condizione sono dipese sia dal sistema di allevamento che dall'impianto considerato, come discusso nel Capitolo 4.1.

4. Risultati e discussione

Tabella 4.28. Composizione chimica dei filetti (sul peso fresco) e alcune caratteristiche della carcassa e delle spigole utilizzate in calibrazione (n = 164) (campionamento n. 2)

	Minimo	Massimo	Media	DS
Acqua, %	61,3	79,7	71,4	3,7
Proteina grezza, %	16,2	26,8	19,5	0,9
Estratto etereo, %	0,17	16,0	7,3	3,6
Energia, MJ/kg	4,09	10,96	7,54	1,56
Peso di macellazione, g	269	1032	588	169
Fattore di condizione	0,79	1,59	1,19	0,18
Resa carcassa, %	80,0	93,2	86,9	2,5
Resa filetti, %	38,9	54,8	47,9	3,1

Allo scopo di migliorare le prestazioni delle calibrazioni, soprattutto quelle relative ai caratteri morfologici e alle rese, le analisi NIRS per questo insieme di campioni sono state realizzate sui filetti liofilizzati, nei quali l'interferenza del contenuto di acqua risulta ridotta rispetto ai campioni macinati freschi. Le regressioni calcolate per la previsione NIRS del contenuto di acqua, estratto etereo ed energia lorda hanno dato un elevato coefficiente di determinazione ($R^2_{cv} > 0,90$) a confermare l'elevata correlazione tra le informazioni contenute negli spettri NIR e il contenuto dei diversi costituenti chimici (Tabella 4.29). Anche in questo caso, la predizione del contenuto di proteina grezza si è rivelata meno accurata, sebbene soddisfacente, rispetto alle altre variabili ($R^2_{cv} = 0,73$, $SECV = 0,34$). I risultati ottenuti sul presente campionamento e sugli spettri analizzati come liofilizzati confermano quanto osservato utilizzando gli spettri dei campioni freschi provenienti dal campionamento n. 3.

Tabella 4.29. Risultati di calibrazione e cross-validazione per la predizione NIRS di alcune caratteristiche delle carcasse e della composizione chimica dei filetti di spigole del campionamento n. 2

	Calibrazione			Full cross-validazione	
	Fattori	R^2_c	SEC	R^2_{cv}	SECV
Acqua, %	3	0,97	0,62	0,96	0,67
Proteina grezza, %	9	0,85	0,25	0,73	0,34
Estratto etereo, %	2	0,99	0,42	0,98	0,46
Energia, MJ/kg	3	0,95	0,36	0,94	0,38
Peso di macellazione, g	6	0,66	96	0,55	113
Fattore di condizione	8	0,86	0,08	0,79	0,09
Resa carcassa, %	1	0,24	2,06	0,22	2,09
Resa filetti, %	8	0,65	1,76	0,48	2,22

I risultati delle calibrazioni per alcune caratteristiche della carcassa sono stati diversi a seconda della variabile considerata (Tabella 4.29): le predizioni del peso di macellazione e della resa in filetti sono state accettabili ($R^2_{cv} = 0,48-0,55$), mentre la predizione della resa in

4. Risultati e discussione

carcassa è risultata debole. Al contrario, la predizione NIRS del fattore di condizione è stata realizzata con successo e con un limitato errore di predizione ($R^2_{cv}=0,79$, $SECV=0,09$).

Considerando le caratteristiche chimiche, in passato l'analisi NIRS è stata applicata ai prodotti ittici per la valutazione della loro composizione con risultati diversi in funzione delle modalità di preparazione dei campioni, delle strumentazioni utilizzate, dell'intervallo di spettro e delle variabili considerate. In generale, contenuto di acqua, estratto etereo ed energia sono predetti in maniera soddisfacente, mentre il contenuto proteico non è sempre ben correlato con le informazioni spettrali. Le informazioni sull'applicazione alla valutazione della qualità della spigola sono piuttosto limitate (Xiccato e coll., 2004), mentre, come sotto indicato, sono disponibili molte più informazioni su altre specie di pesce.

Downey (1996) ha ottenuto buone predizioni del contenuto di acqua ($R^2_c=0,69$; errore di predizione, $SEP=1,45\%$) e estratto etereo ($R^2_c=0,70$; $SEP=2,04\%$) sul salmone intero di allevamento analizzando la superficie cutanea con uno strumento FT-NIR a fibre ottiche nell'intervallo da 400 a 1100 nm. Lee e coll. (1992) hanno analizzato filetti interi di trote (da 700 a 1050 nm) e predetto con successo il contenuto lipidico ($R^2_c=0,81$; $SEP=2,27\%$).

Analizzando filetti macinati freschi di salmone in trasmittanza nella regione 700-1100 nm), Sollid e Solberg (1992) hanno predetto la concentrazione di estratto etereo con R^2_v di 0,99 e SEP di 0,5%. Anche Solberg (1995) ha ottenuto una buona predizione per contenuto di acqua ($R^2_c>0,96$; $SEP<0,21\%$), proteina ($R^2_c=0,92$; $SEP=0,22\%$) e lipidi ($R^2_c=0,98$; $SEP=0,33\%$) in filetti freschi di merluzzo, capelino e salmone. La buona accuratezza di predizione NIRS della composizione chimica del pesce è stata confermata da Solberg e Fredriksen (2001) in capelino fresco macinato, da Nortvedt e coll. (1998b) in halibut ($SECV=0,27\%$, 0,2% e 0,42% per lipidi, proteina e acqua, rispettivamente) e da Fasolato e coll. (2008a) in sogliola.

Analizzando campioni freschi macinati di salmone, Isaksson e coll. (1995) hanno ottenuto una buona accuratezza per la previsione del contenuto proteico ($SECV=0,37\%$) e risultati simili ai nostri per la predizione di contenuto di acqua ed estratto etereo. Secondo Rasco e coll. (1991), l'accuratezza della predizione NIRS del contenuto proteico della carne di pesce potrebbe essere condizionata negativamente dalla presenza di numerosi composti azotati non proteici, come ossido di trimetilammina, urea, taurina, piccoli peptidi e aminoacidi, nucleotidi e altre purine. In effetti, proprio su campioni di spigole, sia macinati freschi che liofilizzati, e in maniera simile a quanto osservato nella presente sperimentazione, Xiccato e

4. Risultati e discussione

coll. (2004) hanno riportato le peggiori prestazioni per la predizione del contenuto di proteina ($R^2_{cv}=0,68$ e $SECV=0,35\%$ con i campioni liofilizzati). Cozzolino e coll. (2002), invece, hanno ben predetto il contenuto di TVBN ($R^2_v=0,83$; $SECV=0,35\%$) nel muscolo fresco macinato di varie specie ittiche. Fasolato e coll. (2008a) non hanno invece ottenuto risultati soddisfacenti nella previsione del TVBN nella sogliola.

Confrontando i risultati che abbiamo ottenuto sugli spettri macinati freschi delle spigole provenienti dal campionamento n. 3 rispetto agli spettri liofilizzati delle spigole del campionamento n. 2, il trattamento di liofilizzazione non pare aver migliorato le prestazioni delle calibrazioni in maniera evidente, anche se il confronto deve essere fatto con cautela trattandosi di set di campioni con una variabilità dei costituenti chimici molto differente. In particolare, il maggiore errore di predizione in genere osservato per le calibrazioni calcolate sugli spettri liofilizzati del campionamento n. 2 rispetto a quelli freschi del campionamento n. 3 ($SECV=0,67\%$, $0,46\%$ e $0,38$ MJ/kg per acqua, estratto etereo ed energia, rispettivamente, vs. $0,47\%$, $0,50\%$ e $0,18$ MJ/kg), è da imputarsi al più ampio intervallo di variazione delle variabili considerate nel campionamento n. 2 (con spigole provenienti da diversi allevamenti e con taglia diversa).

Anche Xiccato e coll. (2004), confrontando diverse modalità di preparazione di filetti di spigole appartenenti allo stesso set di calibrazione, avevano evidenziato che la predizione NIRS della composizione chimica non era migliorata in maniera sostanziale sugli spettri dei campioni liofilizzati rispetto ai freschi. La correlazione fra i costituenti chimici e i dati spettrali rimaneva sostanzialmente simile e il debole miglioramento dell'errore di predizione non era tale da giustificare i costi ed i tempi addizionali richiesti per la liofilizzazione del campione. Al contrario, su campioni liofilizzati di trota, Valdes e coll. (1989) avevano ottenuto migliori calibrazioni delle nostre e di quelle di Xiccato e coll. (2004) per il contenuto proteico ($R^2_v=0,76$; $SEP=0,18\%$), ma risultati peggiori per l'energia ($SEP=1,7$ MJ/kg). Una elevata accuratezza di predizione per il contenuto di lipidi e proteine era stata ottenuta anche da Mathias e coll. (1987) analizzando campioni liofilizzati di pesci d'acqua dolce.

Le informazioni disponibili sull'applicazione dell'analisi NIRS per la predizione del profilo acido della carne in generale e del pesce in particolare sono piuttosto limitate. Il metodo è stato utilizzato per la valutazione della qualità di grassi animali, evidenziando una buona capacità del metodo NIRS per la previsione di acido laurico ($R^2_c=0,67$), miristico ($R^2=0,97$), palmitico ($R^2=0,98$), palmitoleico ($R^2=0,86$), stearico ($R^2=0,98$), oleico ($R^2=0,92$), linoleico ($R^2=0,99$) e arachidonico ($R^2=0,86$) (Garrido e coll., 2003). González-Martín e coll.

4. Risultati e discussione

(2003) sono riusciti ad ottenere calibrazioni molto accurate per la predizione di C14:0, C16:0, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3 e C20:1 utilizzando una fibra ottica direttamente sul grasso delle carcasse suine. Tra le altre matrici analizzate per la previsione del contenuto acidico, Dalle Zotte e coll. (2006) hanno verificato la possibilità di utilizzare con buoni risultati l'analisi NIRS per stimare il contenuto di PUFA totali ($R^2_c = 0,75$) e dei singoli acidi grassi del tuorlo d'uovo.

Per quanto riguarda i prodotti ittici, si conoscono poche applicazioni alla valutazione del profilo acidico della carne di pesce mediante analisi NIRS. Negli oli di pesce, Cozzolino e coll. (2004) hanno dimostrato l'utilità della tecnica NIRS per un rapido e semplice monitoraggio dei processi idrolitici e ossidativi che si instaurano durante la produzione e conservazione degli oli di pesce mediante la previsione del contenuto di acidi grassi liberi. I risultati poco incoraggianti ottenuti nella presente sperimentazione potrebbero essere legati al fatto che l'analisi è stata effettuata sul filetto macinato e non sul grasso di deposito o l'estratto lipidico, come sopra indicato (González-Martín e coll., 2003), e quindi su una matrice dove i lipidi (e ancor più i singoli acidi grassi) sono eccessivamente diluiti.

4.4.2. Previsione NIRS della freschezza e della durata di conservazione

I filetti macinati delle spigole pescati in un unico allevamento e appartenenti al campionamento n. 3, oltre che essere utilizzati per le valutazioni sensoriali e reologiche della freschezza (capitolo 4.3.1), sono stati sottoposti ad analisi NIRS e gli spettri analizzati con *Principal Component Analysis* (PCA) allo scopo di individuare eventuali raggruppamenti in funzione della durata della conservazione.

In prima istanza, è stata utilizzata la PLSR per mettere in correlazione i dati spettrali con la durata della conservazione espressa in giorni (Analisi n. 1, Tabella 4.30, Figura 4.14a). L'analisi dei campioni freschi macinati ha dato buone prestazioni di calibrazione, mantenendo una buona correlazione anche in fase di validazione ($R^2_{cv}=0,95$). L'errore di stima è stato contenuto e pari a 0,89 giorni. Allo scopo di migliorare la capacità discriminante dell'analisi NIRS, la regressione fra i dati spettrali e la durata della conservazione è stata ripetuta raggruppando i campioni in diverse classi di freschezza: 0 per i campioni analizzati al giorno 0; 1,5 per i campioni analizzati al giorno 1 e al giorno 2; 5 per i campioni analizzati al giorno 4 e al giorno 6, e 8 per i campioni analizzati al giorno 8 (Analisi n. 2, Tabella 4.30). Anche in questo caso la regressione è risultata soddisfacente (Figura 4.14b). Sulla base dei risultati ottenuti dal calcolo delle precedenti regressioni, si è deciso di valutare la possibilità dell'analisi

4. Risultati e discussione

di discriminare i campioni più freschi (ai giorni 0, 1 e 2) da quelli sottoposti a una maggiore conservazione (4, 6 e 8 giorni): il coefficiente di correlazione sia in calibrazione che in validazione è risultato elevato così come buona è apparsa la separazione fra i campioni (Analisi n. 3, Tabella 4.30, Figura 4.15).

Tabella 4.30. Statistiche di calibrazione e di validazione per la previsione della durata della conservazione (giorni) in filetti di spigola

	Calibrazione			Full-cross validazione	
	Fattori n.	R ² c	SEC	R ² cv	SECV
Analisi n. 1 (giorni 0, 1, 2, 4, 6, 8)	8	0,99	0,35	0,95	0,89
Analisi n. 2 (giorni 0, 1+ 2, 4+ 6, 8)	8	0,99	0,29	0,96	0,77
Analisi n. 3 (giorni 0+1+ 2, 4+ 6+ 8)	5	0,97	0,54	0,95	0,75

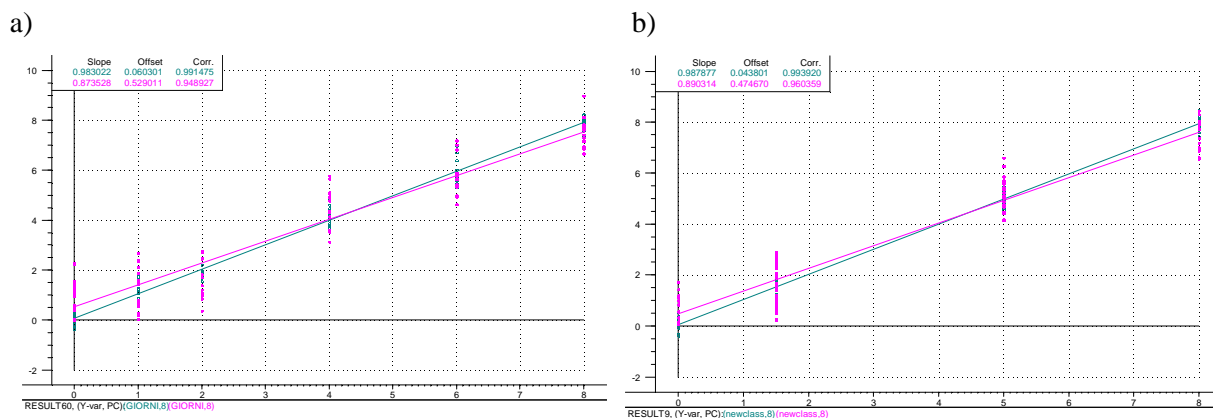


Figura 4.14. Regressione per la previsione della durata della conservazione in filetti freschi macinati: **a)** Analisi n. 1 (giorni di conservazione 0, 1, 2, 4, 6, 8); **b)** Analisi n. 2 (giorni di conservazione 0, 1+ 2, 4+ 6, 8)

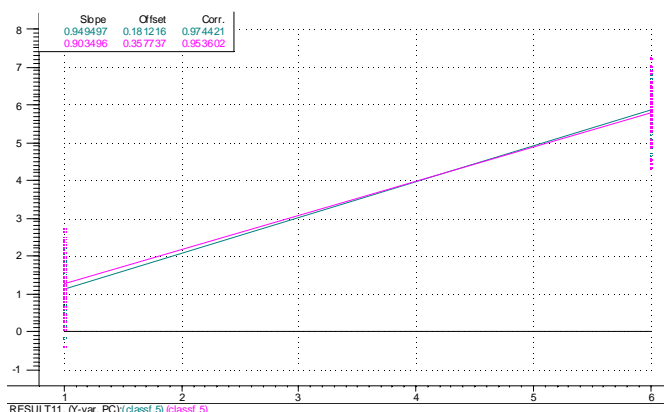


Figura 4.15. Regressione per la previsione della durata della conservazione in filetti freschi macinati (Analisi n. 3, giorni di conservazione 0+1+ 2, 4+ 6+ 8)

I dati spettrali dei filetti delle spigole del campionamento n. 3 sono stati analizzati utilizzando anche l'analisi SIMCA, trattamento statistico utilizzato per la classificazione dei campioni su base spettrale. La prima fase di elaborazione prevede la costruzione mediante

4. Risultati e discussione

PCA di singoli modelli statistici per ogni tipologia o classe di campioni. Nella seconda fase, la SIMCA utilizza contemporaneamente tutti i modelli PCA calcolati per i singoli gruppi in modo da assegnare campioni sconosciuti ad una classe o all'altra in funzione delle analogie spettrali. Ogni nuovo campione viene trattato separatamente nell'ambito di ciascun modello e l'assegnazione a una classe o a un'altra è fatta sulla base della distanza dai singoli modelli. Pertanto, la PCA è stata utilizzata sugli spettri a nostra disposizione per calcolare 6 modelli relativi ai campioni sottoposti a diversa durata di conservazione (0, 1, 2, 4, 6 e 8 giorni). I sei modelli così ottenuti sono stati utilizzati nella SIMCA per calcolare la distanza fra i modelli stessi (*model to model distance*) e la percentuale di campioni assegnati correttamente alla durata di conservazione corrispondente. In generale, si ritiene che due modelli siano sufficientemente diversi quando la loro distanza è superiore al valore di 3. In questo caso, la classificazione di campioni sconosciuti nella classe corrispondente è possibile senza sovrapposizioni. Altrimenti, è facile che un certo numero di campioni sia assegnato alla classe errata o a più di una classe.

Nella tabella 4.31, è riportata la distanza fra i modelli ottenuti sui dati spettrali dei filetti macinati freschi delle spigole sottoposte a diversi tempi di conservazione (sei classi).

Tabella 4.31. Distanza fra i modelli calcolati per ciascun giorno di conservazione nell'analisi SIMCA degli spettri dei filetti freschi macinati

Giorni	Giorni di conservazione					
	0	1	2	4	6	8
0	1					
1	3,810	1				
2	4,390	2,083	1			
4	7,925	3,833	3,901	1		
6	9,673	6,647	5,426	2,673	1	
8	7,445	4,596	5,306	3,794	3,225	1

La distanza fra i modelli è stata superiore a 3 per la maggior parte delle classi considerate, evidenziando una buona possibilità di distinguere i campioni per la freschezza su base meramente spettrale. Un'insufficiente distanza fra i modelli è stata misurata solo fra i campioni conservati per 1 e 2 giorni (2,083) e fra i campioni conservati per 4 e 6 giorni (2,673). La distanza fra il modello calcolato sui campioni freschi (al giorno 0) e gli altri campioni è andata progressivamente aumentando con la durata della conservazione, evidenziando una maggiore distanza (>7) rispetto ai modelli dei campioni conservati per 4, 6 e 8 giorni. In generale, la distanza fra i modelli è aumentata con la differenza della durata della conservazione. Quando i modelli calcolati sono stati utilizzati per predire la durata della

4. Risultati e discussione

conservazione dei diversi campioni, i risultati ottenuti sono stati differenti in funzione della freschezza (Tabella 4.32).

Tabella 4.32. Classificazione dei campioni appartenenti ai diversi giorni di conservazione nell'analisi SIMCA degli spettri

Conservazione (giorni)	Classificazione corretta in una sola classe	Classificazione in due o più classi	Classificazione in classe errata	Nessuna classificazione
0	13 (87%)	1 (7%)	-	1 (7%)
1	-	11 (73%)	2 (13%)	2 (7%)
2	-	14 (93%)	1 (7%)	-
4	8 (53%)	7 (47%)	-	-
6	5 (33%)	8 (53%)	1 (7%)	1 (7%)
8	5 (33%)	8 (53%)	1 (7%)	1 (7%)
Totale	31 (34%)	49 (54%)	5 (6%)	5 (6%)

I campioni freschi, corrispondenti alle spigole appena macellate (giorno 0), sono stati classificati correttamente per l'87%; un campione è stato classificato come appartenente anche ad un'altra classe, e un solo altro campione non è stato classificato e, fatto particolarmente importante, nessun campione è stato assegnato ad una classe errata. Nel caso dei campioni conservati per 1 o 2 giorni, i risultati sono stati differenti e nella maggior parte dei casi (per più del 70% del set di campioni) le spigole sono state assegnate alla classe di freschezza corrispondente, ma anche ad un'altra classe, evidenziando la difficoltà del metodo di distinguere in modo efficace fra campioni conservati per un tempo piuttosto breve (1 e 2 giorni). Nel caso dei campioni analizzati dopo 4 giorni di conservazione, il 53% dei campioni è stato assegnato correttamente, mentre per il 47% degli stessi è stata indicata l'assegnazione anche ad una delle classi adiacenti. Per i campioni più vecchi (conservati per 6 e 8 giorni), infine, l'assegnazione è stata corretta per il 33% del set, mentre il 53% è stato assegnato a entrambe le classi. Il numero dei campioni che sono stati assegnati ad una classe sbagliata o non sono stati assegnati affatto è risultato sempre piuttosto limitato (1 o 2).

Sulla base dei risultati appena descritti e vista la difficoltà di separare i campioni conservati per 1 e 2 giorni e quelli conservati per 4 e 6 giorni, è stato effettuato un diverso raggruppamento dei campioni considerando solo 4 classi: la prima con i campioni analizzati al giorno 0, la seconda con i campioni analizzati a 1 e 2 giorni, la terza classe con i campioni analizzati dopo 4 e 6 giorni e l'ultima e quarta classe con i campioni analizzati dopo 8 giorni di conservazione. La distanza fra il modello per la classe 0 e gli altri modelli è sempre risultata superiore a 3, anche se di poco rispetto alla classe 1+2 (Tabella 4.33). La classe 1+2 è risultata vicina alla classe 4+6 (<3) ma sufficientemente lontana dalla classe 8 (3,90). Anche tra le classi 4+6 e 8, la distanza è risultata insufficiente per un'adeguata discriminazione dei campioni.

4. Risultati e discussione

Tabella 4.33. Distanza fra i modelli calcolati per ciascun giorno di conservazione nell'analisi SIMCA degli spettri dei filetti freschi macinati

Giorni	Giorni di conservazione			
	0	1+2	4+6	8
0	1			
1+2	3,278	1		
4+6	5,166	2,590	1	
8	6,203	3,901	2,588	1

Quando i modelli calcolati sono stati utilizzati per predire la durata della conservazione dei diversi campioni, i risultati ottenuti sono stati poco differenti da quanto ottenuto considerando gli effettivi giorni di conservazione (Tabella 4.34). I campioni freschi, provenienti dalle spigole appena macellate, sono stati classificati correttamente per l'80% nella classe di freschezza corrispondente; un campione è stato classificato come appartenente anche ad un'altra classe, mentre due campioni non sono stati assegnati ad alcuna classe. Nel caso dei campioni conservati per 1 e 2 giorni, il 43% dei campioni è stato assegnato solo alla classe di freschezza corrispondente e il 43% anche ad un'altra classe. In questo caso, la percentuale di campioni classificati correttamente è aumentata rispetto alla SIMCA sugli effettivi giorni di conservazione. Un andamento simile è stato riscontrato per la classificazione dei campioni analizzati dopo conservazione per 4 e 6 giorni, mentre per i campioni conservati per 8 giorni si è misurata la più bassa percentuale di corretta ed esclusiva assegnazione alla classe corrispondente (33%) e la più alta percentuale di assegnazione multipla (60%). In ogni caso, l'esclusiva assegnazione ad una classe errata ha riguardato un solo campione su 90.

Tabella 4.34. Classificazione dei campioni appartenenti ai diversi giorni di conservazione nell'analisi SIMCA degli spettri dei filetti

Conservazione (giorni)	Classificazione corretta in una sola classe	Classificazione in due o più classi	Classificazione in classe errata	Nessuna classificazione
0	12 (80%)	1 (7%)	-	2 (13%)
1+2	13 (43%)	12 (43%)	-	4 (13%)
4+6	13 (43%)	12 (40%)	1 (3%)	4 (13%)
8	5 (33%)	9 (60%)	-	1 (7%)
Totale	43 (48%)	34 (38%)	1 (1%)	7 (8%)

A un ulteriore raggruppamento dei campioni in due classi, pesce fresco (giorni 0, 1 e 2) e pesce conservato più a lungo (giorni 4, 6 e 8), la distanza fra i due modelli è risultata inferiore a 3 (2,575). Tuttavia la percentuale di campioni classificati correttamente è stata elevata e pari all'80% per i campioni della classe 1 e al 62% per i campioni della classe 2 (Tabella 4.35). Nel caso dei campioni più freschi, il rimanente 20% non è stato assegnato a nessuna classe, mentre il 20% dei campioni conservati più a lungo è stato assegnato ad entrambe le classi e il 16% a

4. Risultati e discussione

nessuna. Nell'insieme, ben il 71% dei campioni è stato assegnato alla classe corretta, il 27% è stato assegnato alle due classi o non è stato assegnato ad alcuna e solo l'1% alla classe errata.

Tabella 4.35. Distanza fra i modelli calcolati per ciascun giorno di conservazione nell'analisi SIMCA degli spettri dei filetti freschi macinati

Conservazione (giorni)	Classificazione corretta in una sola classe	Classificazione in due o più classi	Classificazione in classe errata	Nessuna classificazione
0+1+2	36 (80%)	-	-	9 (20%)
4+6+8	28 (62%)	9 (20%)	1 (2%)	7 (16%)
Totale	64 (71%)	9 (10%)	1 (1%)	16 (18%)

Pertanto, la discriminazione degli spettri dei campioni macinati freschi di spigole in funzione della durata della conservazione è apparsa possibile ed efficace soprattutto per separare i campioni più freschi (0-2 giorni) da quelli conservati più a lungo (4-8 giorni). Al contrario è risultato più difficile separare campioni con differenze della durata della conservazione intorno alle 48 ore. Il numero limitato di campioni disponibili per ogni classe di freschezza (15 vs. 30-40 consigliabili) potrebbe aver negativamente influenzato i risultati della predizione NIRS.

Anche i filetti liofilizzati delle spigole pescate in 3 allevamenti e appartenenti al campionamento n. 4, sono stati sottoposti ad analisi NIRS e gli spettri analizzati con PCA allo scopo di individuare eventuali raggruppamenti in funzione della durata della conservazione (da 3 a 17 giorni). La liofilizzazione dei filetti avrebbe dovuto migliorare le informazioni contenute negli spettri rispetto al campione fresco. Tuttavia, lo score plot relativo alla PCA sugli spettri dei filetti liofilizzati, in cui i campioni sono denominati in funzione dei giorni di conservazione, non ha permesso l'identificazione di alcun cluster (Figura 4.16). Pertanto, anche l'analisi SIMCA non ha prodotto modelli utili per la classificazione dei campioni.

La scarsa variabilità degli spettri NIRS delle spigole di questo campionamento, rispetto al precedente, in funzione dei giorni di conservazione nelle condizioni di refrigerazione e stoccaggio in ghiaccio utilizzate potrebbe essere spiegata con le seguenti argomentazioni: 1) il pesce intero in ghiaccio (campionamento n. 4) è stato conservato meglio rispetto al pesce in cassetta all'aria (campionamento n. 3) e ha manifestato una minore degradazione chimica; la liofilizzazione del campione sottoposto ad analisi NIRS potrebbe aver uniformato le caratteristiche strutturali e chimiche del campione e quindi ridotto le informazioni contenute nello spettro NIR; 2) le prime analisi di freschezza sono state realizzate dopo 3 giorni di conservazione, laddove, sulla base dei risultati ottenuti sugli spettri delle spigole provenienti

4. Risultati e discussione

dal campionamento n. 3, le migliori discriminazioni erano state fatte rispetto ai campioni freschi e appena pescati (giorno 0).

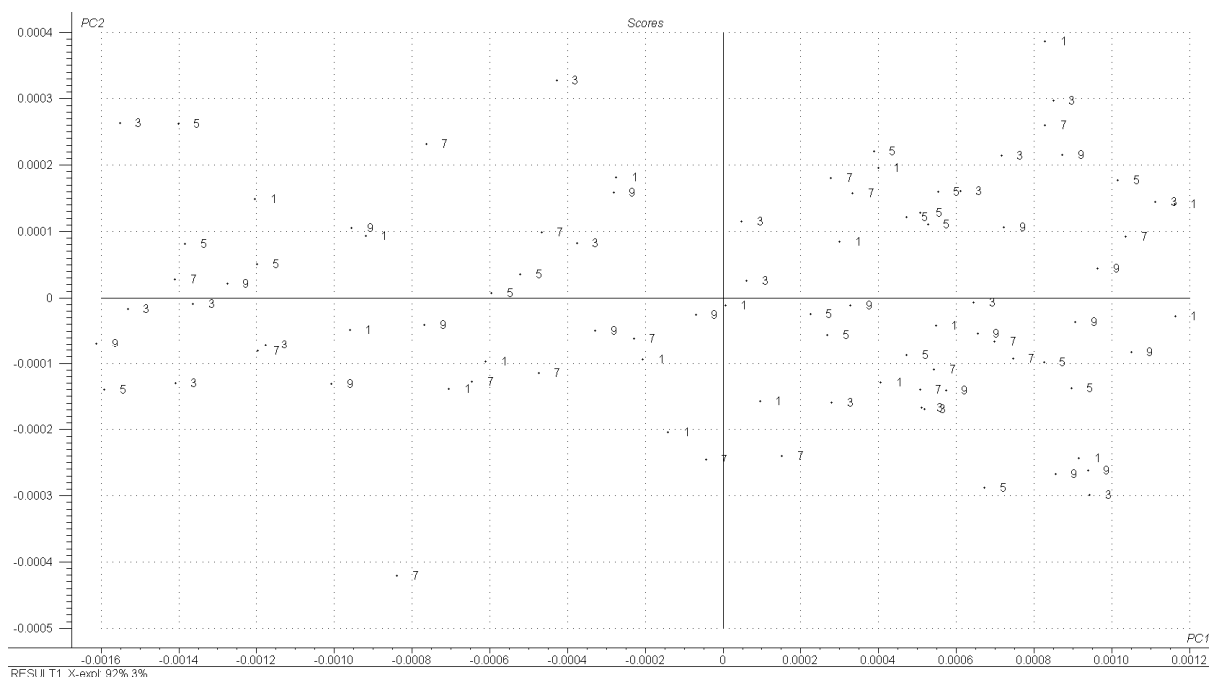


Figura 4.16. Analisi per componenti principali degli spettri dei campioni liofilizzati: giorni di conservazione (1= 3 giorni; 3= 6 giorni; 5= 10 giorni; 7= 13 giorni; 9= 17 giorni) (campionamento n. 4)

I metodi di elaborazione delle informazioni spettrali (PCA e SIMCA) sono già stati utilizzati in passato con successo per la classificazione di prodotti ittici di diverso tipo o sottoposti a diversi trattamenti di congelamento e scongelamento (Windham e coll., 1995; Downey e Beauchêne, 1997). Bøknæs e coll. (2002) ha utilizzato con discreto successo l'analisi NIRS per la valutazione della freschezza in filetti di merluzzo scongelati e refrigerati, valutando gli effetti sui dati spettrali della temperatura di congelamento, della durata del congelamento e della durata del periodo di refrigerazione nei filetti scongelati. In modo simile, Uddin e coll. (2005) hanno differenziato su base spettrale campioni di orata freschi da campioni della stessa specie scongelati, mentre Nilsen e coll. (2002) hanno misurato un'elevata correlazione fra i giorni di conservazione (da 0 a 14) di filetti di merluzzo su ghiaccio e gli spettri VIS/NIR degli stessi. Lavorando nella regione del SW infrarosso (short-wavelength da 600 a 1100 nm) sul pesce intero, Lin e coll. (2006) erano riusciti a discriminare gli spettri delle trote fresche rispetto a quelli di esemplari conservati per più di 4 giorni. La discriminazione di campioni di pesce fresco e congelato è stata realizzata in campioni di sogliola (Fasolato e coll., 2008a) e di pesce spada (Fasolato e coll., 2008b), con corrette assegnazioni alla classe di appartenenza superiori al 90% (Berzaghi e Riovanto, 2009).

4. Risultati e discussione

4.4.3. Caratterizzazione di origine e tipologia di allevamento

La PCA è stata utilizzata per analizzare la variabilità dei dati spettrali relativi alle analisi dei filetti freschi macinati e liofilizzati ottenuti dalle spigole provenienti da tre allevamenti (estensivo, intensivo a terra, intensivo in gabbie marine; campionamento n. 4). L'esame dello score plot relativo alla PCA sugli spettri delle spigole macinate fresche (Figura 4.17) ha evidenziato il raggruppamento dei campioni in funzione del sistema di allevamento con una separazione delle spigole di allevamento intensivo (I) rispetto a quelle di allevamento estensivo, mentre gli spettri delle spigole pescate da gabbie marine (G) hanno mostrato una distribuzione più dispersa e fortemente sovrapposta al gruppo estensivo (E).

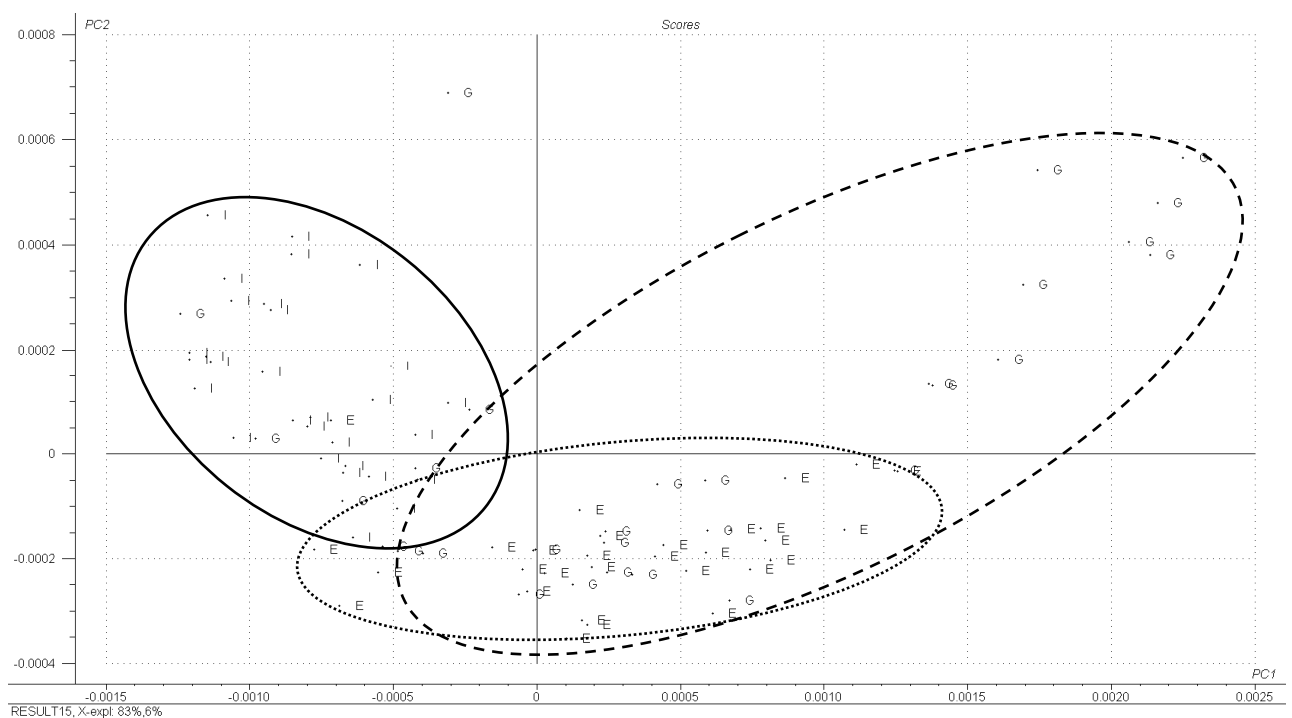


Figura 4.17. Analisi per componenti principali degli spettri dei campioni macinati freschi in funzione del sistema di allevamento (E = estensivo, cluster racchiuso dalla linea punteggiata, I = intensivo a terra, cluster racchiuso dalla linea continua; G = intensivo in gabbie marine, cluster racchiuso dalla linea tratteggiata)

Nella figura 4.18, lo score plot calcolato dalla PCA sugli spettri delle spigole liofilizzate ha permesso di accentuare la separazione dei campioni in funzione dell'allevamento di appartenenza, in particolare tra i campioni E e I, mentre i campioni G si sono collocati in posizione intermedia, ma occupando largamente l'area dei due cluster limitrofi, in particolare il cluster E.

4. Risultati e discussione

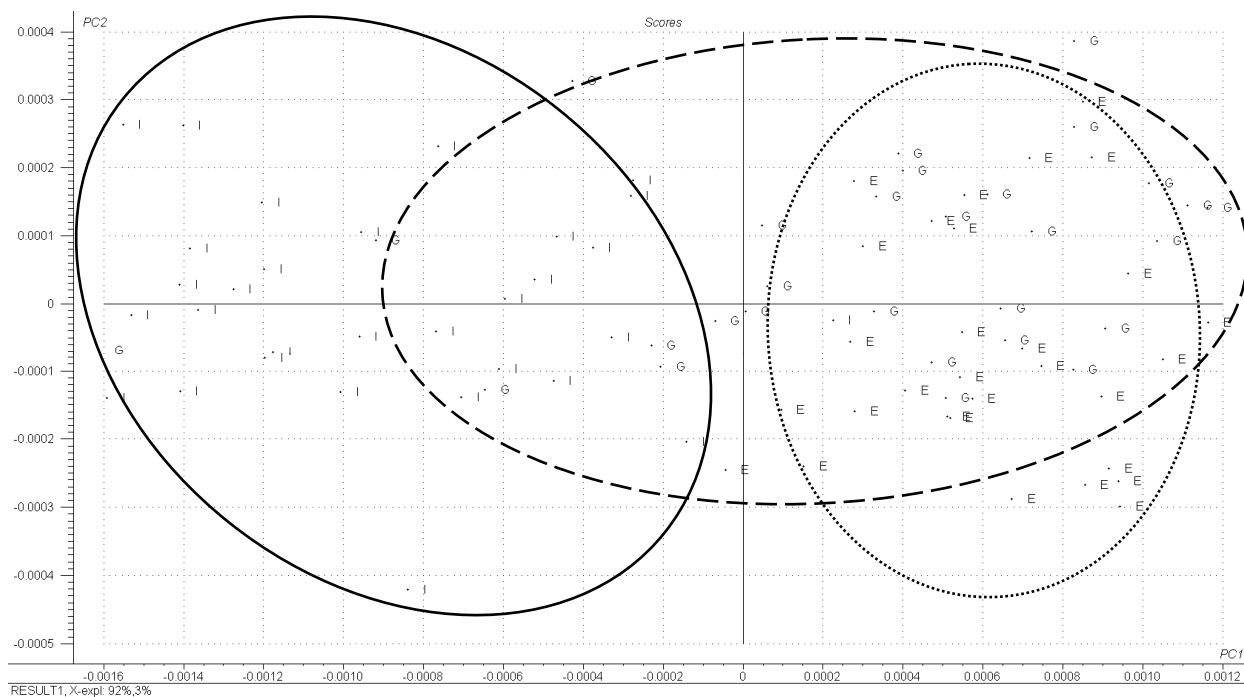


Figura 4.18. Analisi per componenti principali degli spettri dei campioni liofilizzati in funzione del sistema di allevamento (E = estensivo, cluster racchiuso dalla linea punteggiata, I = intensivo a terra, cluster racchiuso dalla linea continua; G = intensivo in gabbie marine, cluster racchiuso dalla linea tratteggiata)

Anche gli spettri dei filetti liofilizzati delle spigole appartenenti al campionamento n. 2 riferito a 11 allevamenti sono stati sottoposti a PCA allo scopo di spiegare la variabilità dei dati in funzione della tipologia di allevamento da cui provenivano i pesci (estensivo, intensivo a terra, gabbie marine) e, considerata la superiore disponibilità di campioni rispetto al campionamento n. 4, per costituire modelli utili per la classificazione di nuovi campioni con analisi SIMCA.

La maggior parte della variabilità dei dati spettrali è stata spiegata con la prima componente selezionata (Figura 4.19). In questo caso, la distribuzione degli score ha evidenziato la separazione delle spigole allevate con sistemi estensivi (E) rispetto a quelle provenienti da sistemi intensivi (I e G). Entro sistema estensivo, le spigole si sono differenziate lungo la seconda componente principale, con gli allevamenti E1 ed E4 separati dall'allevamento E2. I pesci provenienti dalle gabbie a mare, trovandosi in posizione intermedia rispetto ai pesci allevati intensivamente ed estensivamente, sono stati parzialmente confusi con questi ultimi: le spigole dell'allevamento intensivo I4 si sono collocate in posizione adiacente alle spigole del sistema in mare G4; i pesci delle gabbie dell'impianto G3 si sono distribuiti fra quelli allevati intensivamente. Gli spettri dei campioni provenienti dall'allevamento E3 meritano una discussione specifica. In questo sistema produttivo, i bacini

4. Risultati e discussione

di allevamento sono simili a quelli delle valli da pesca, ma l'alimentazione naturalmente disponibile è integrata con mangimi commerciali. Per questo motivo, pur provenendo da un allevamento classificato come estensivo (o semi-intensivo), in realtà, sia per le caratteristiche chimiche (contenuto lipidico) dei filetti che per la caratterizzazione degli spettri NIR, i pesci pescati in E3 si sono mostrati più vicini a quelle di allevamenti intensivi piuttosto che estensivi. Pertanto, a posteriori, la classificazione dell'allevamento E3 è stata cambiata in I5. I campioni I5 appaiono raggruppati e localizzati a sinistra della PC1 e in posizione intermedia della PC2, tra i campioni I2 e I3 e vicino ai campioni G3.

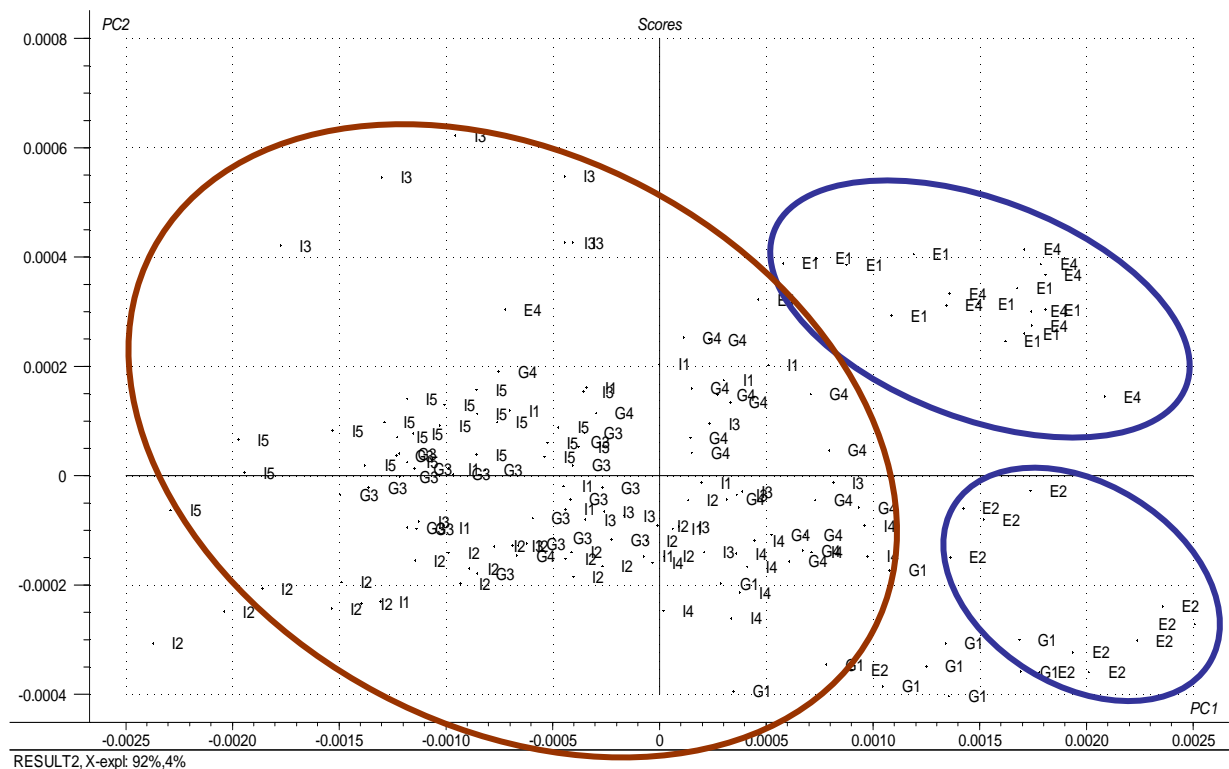


Figura 4.19. Analisi per componenti principali degli spettri NIR: score plot (E: pesci di allevamenti estensivi; I: intensivi a terra; G: gabbie marine)

La distanza misurata nell'analisi SIMCA fra i modelli PCA relativi alle spigole di sistema estensivo rispetto a quelli di sistemi intensivi e gabbie a mare è risultata sempre superiore a 3 (17,3 e 12,9, rispettivamente) (Tabella 4.36), evidenziando così la buona capacità di classificazione dell'analisi NIRS. La distanza dei modelli per le spigole di allevamento intensivo e quelle provenienti da gabbie a mare (2,3) non è invece risultata sufficiente per un'adeguata separazione dei campioni.

4. Risultati e discussione

Tabella 4.36. Distanza fra i modelli calcolati per il sistema di allevamento nell'analisi SIMCA degli spettri dei filetti liofilizzati

	Sistema di allevamento		
	Estensivo	Intensivo	Gabbie
Estensivo	1,00		
Intensivo	17,3	1,00	
Gabbie	12,9	2,3	1,00

I campioni provenienti dagli allevamenti estensivi sono stati classificati correttamente per il 77%, mentre il restante 23% non è stato assegnato ad alcuna classe (Tabella 4.37). I campioni provenienti dagli allevamenti intensivi sono stati classificati correttamente con una precisione inferiore (64%), con una doppia (8%) o mancata assegnazione (25%), mentre il 2% dei campioni è stato erroneamente classificato. Come prevedibile dalle distanze tra i modelli, le spigole provenienti dalle gabbie a mare sono state classificate correttamente con minor frequenza (43%), mentre le errate classificazioni hanno riguardato il 14% dei campioni.

Tabella 4.37. Classificazione dei campioni appartenenti ai diversi sistemi di allevamento nell'analisi SIMCA degli spettri dei filetti liofilizzati

Sistema di allevamento)	Classificazione corretta in una sola classe	Classificazione in due classi	Classificazione in classe errata	Nessuna classificazione
Estensivo	24 (77%)	-	-	7 (23%)
Intensivo	54 (64%)	7 (8%)	2 (2%)	21 (25%)
Gabbie	21 (43%)	14 (29%)	7 (14%)	7 (14%)
Totale	99 (60%)	21 (13%)	9 (6%)	35 (21%)

Le applicazioni dell'analisi NIR ai pesci e ai prodotti ittici stanno aumentando negli ultimi anni, soprattutto in relazione alla possibilità di predire la composizione chimico-nutrizionale del pesce, mentre un numero inferiore di applicazioni sono note per l'autenticazione e la classificazione (Downey 1996, Fasolato e coll., 2008a e 2008b). Mathias e coll. (1987) non avevano riportato differenze negli spettri di muscoli liofilizzati di *Oncorhynchus mykiss* e *Salvelinus alpinus*, mentre Solberg (1995) era riuscito a classificare con successo mediante PCA la carne macinata fresca di tre diverse specie di pesci (*Gadus morhua*, *Mallotus villosus* and *Salmo salar*).

Sotto ponendo ad analisi NIRS spigole provenienti da diversi sistemi di allevamento, Xiccato e coll. (2004) erano riusciti ad ottenere una buona separazione dei campioni di allevamento estensivo rispetto a quelle di altra origine (distanza fra i modelli da 2,99 rispetto alle spigole di gabbia a mare a 6,14 rispetto a spigole di allevamento intensivo) già all'analisi dei filetti macinati freschi. Le prestazioni della classificazione erano state però decisamente migliorate dall'analisi dei filetti liofilizzati con la maggiore distanza fra modelli per

4. Risultati e discussione

l'allevamento estensivo rispetto agli altri (>20) e la distanza minore fra il sistema intensivo e quello con gabbie a mare, così come confermato anche dalle osservazioni della presente tesi sperimentale. Nella classificazione, più dell'80% dei campioni da allevamento estensivo, semi-intensivo e gabbie e il 74% di quelli di allevamento intensivo erano stati assegnati correttamente ed esclusivamente alla classe corrispondente.

5. Conclusioni

5. Conclusioni

Le attività svolte e i risultati ottenuti nella presente tesi di dottorato hanno permesso di conseguire l'**obiettivo generale** di contribuire a rinforzare i programmi per la qualità totale, la sicurezza alimentare e la valorizzazione della spigola attraverso uno studio ad ampio raggio delle caratteristiche biometriche, chimico-nutrizionali, sensoriali e tossicologiche di pesci di diversa taglia commerciale, provenienti dalle più diffuse tipologie di allevamento a terra e in mare e da diverse aree geografiche del territorio nazionale.

Le attività svolte nell'ambito dell'**Obiettivo 1 - Qualità** hanno permesso di caratterizzare dal punto di vista morfologico, chimico e dietetico spigole provenienti da allevamenti italiani con differenti sistemi produttivi. L'effetto della *taglia del pesce* (small vs. large) sulla qualità in senso lato è risultato modesto, nonostante l'ampio intervallo di variazione di pesi considerato, mentre differenze più rilevanti sono state osservate fra i pesci pescati nei diversi impianti. In quanto alle caratteristiche morfologiche e alle biometrie, il *sistema di allevamento* non ha prodotto sostanziali modifiche delle caratteristiche delle spigole prodotte, con l'eccezione delle migliori rese di macellazione nelle spigole di allevamento estensivo piuttosto che intensivo. Le spigole hanno presentato invece un aspetto e una consistenza diversa in funzione del sistema di allevamento, anche se in questo caso la caratterizzazione realizzata non implica necessariamente un diverso livello qualitativo. La luminosità e l'intensità delle tonalità di rosso e giallo della pelle sono risultate più marcate nelle spigole di allevamenti estensivi, rispetto a quelle di allevamenti intensivi a terra e, in maniera ancora più evidente, di quelle di allevamenti in mare, come diretta conseguenza dell'ambiente di allevamento. La maggiore attività fisica delle spigole allevate nei bacini di valle estensivamente e nelle gabbie a mare rispetto ai pesci nelle vasche intensive, dovuta sia alla più attiva ricerca del cibo che alla minor densità di allevamento, ha reso i pesci più compatti e, presumibilmente, più resistenti alla manipolazione *post-mortem*. Il perdurare di bassi valori di pH del filetto nei pesci provenienti da allevamento estensivo conferma questa valutazione e testimonia anche una rallentata degradazione chimica del filetto.

In quanto al valore dietetico delle spigole prodotte nei diversi sistemi, le produzioni di allevamento estensivo si sono caratterizzate per il minore contenuto di grasso (circa 2,5%) e valore energetico rispetto a quelle da sistema intensivo (in vasche a terra e in gabbie a mare) per la mancata somministrazione di mangime artificiale. Differenze sono state osservate anche fra spigole di allevamenti intensivi a terra (tendenzialmente più grassi) e spigole allevate in

5. Conclusioni

gabbie a mare, dipendenti sia dal differente regime alimentare che dalle condizioni termiche dei diversi allevamenti.

Con l'**Obiettivo 2 - Contaminanti** è stata verificata la presenza e determinato il livello di contaminanti ambientali (PCB e metalli pesanti) in spigole provenienti da differenti sistemi di allevamento italiani. La contaminazione da PCB è stata significativamente influenzata dal *sistema di allevamento*, pur con differenze legate ai congeneri di PCB analizzati. Quando sono stati misurati i 7 PCB indicatori, la contaminazione del muscolo (per g di grasso) è risultata minore nelle spigole di allevamento estensivo, intermedia nei pesci degli stagni semi-intensivi e delle gabbie a mare, e superiore nei campioni delle vasche di allevamento intensivo. Quando sono stati misurati i 12 PCB diossina simili, invece, la maggiore tossicità (per g di grasso) è stata misurata per le spigole dei sistemi estensivi, non sottoposte ad alcun tipo di alimentazione artificiale, rispetto a quelle da allevamenti intensivi a terra e in gabbie marine. Inoltre, è stata confermata l'elevata correlazione fra i livelli di grasso e la concentrazione di PCB, che dipende dalla lipofilicità di questi contaminanti. Di conseguenza, normalizzando la concentrazione di PCB esprimendoli in funzione della concentrazione lipidica dei filetti, si può ridurre la variabilità imputabile ad altri fattori (peso degli animali, sistema di produzione, condizioni ambientali).

La concentrazione di metalli pesanti nei mangimi utilizzati nei diversi allevamenti è risultata molto variabile, ma apparentemente non correlata con la concentrazione degli stessi nei filetti delle spigole. Quest'ultima è stata poco modificata dal *sistema di allevamento* ed è risultata indipendente dalla *taglia* dell'animale. Nei filetti di spigole da allevamenti estensivi la minore concentrazione di rame rispetto a quelli di sistemi intensivi è da ascrivere alla somministrazione di mangimi integrati in questi ultimi; la superiore concentrazione di mercurio e arsenico nelle spigole di allevamento estensivo, pur nettamente inferiore ai limiti di legge, è riconducibile alla contaminazione ambientale in assenza di somministrazione di mangimi artificiali.

I risultati ottenuti nell'ambito dell'**Obiettivo 3 - Freschezza** hanno permesso di valutare l'evoluzione della freschezza in spigole d'allevamento in funzione del tempo di conservazione e del sistema produttivo. Durante la *conservazione* delle spigole non sono cambiate le caratteristiche morfologiche o gli indici biometrici, mentre la valutazione sensoriale ha evidenziato una degradazione più rapida per alcuni tratti (brillantezza, muco, durezza per l'aspetto generale; odore e muco delle branchie) rispetto ad altri (caratteristiche dell'occhio, colorazione dell'addome). L'evoluzione dei punteggi QIM conferma un iniziale rapido

5. Conclusioni

peggioramento dell'indice, conseguenza dell'alterazione rapida di alcune caratteristiche esteriori (branchie, muco, occhio), seguito da una fase di rallentamento della degradazione apparente tra 5-6 e i 10-12 giorni che si conclude con un'accelerazione della perdita di freschezza dovuta all'alterarsi delle caratteristiche degli organi e tessuti interni (compattezza, addome) con una perdita completa di freschezza intorno a 20-21 giorni. Il metodo QIM, inoltre, è risultato utile per la caratterizzazione sensoriale del prodotto, mostrando una forte correlazione fra i punteggi assegnati e i giorni di conservazione.

Anche il colore misurato strumentalmente su pelle e filetti può rappresentare un metodo oggettivo utile per la valutazione della freschezza, mentre il pH del filetto cambia significativamente solo dopo una conservazione piuttosto lunga (13 giorni). La composizione chimica e il profilo acidico del grasso del filetto delle spigole sono rimasti sostanzialmente costanti nei periodi brevi di conservazione e solo la concentrazione di azoto basico volatile totale ha mostrato un certo incremento. Durante la conservazione, e seguendo l'instaurarsi e la risoluzione del *rigor mortis*, è invece cambiata la struttura del filetto, inizialmente compatto ed elastico ed in seguito morbido e meno elastico.

Il *sistema di allevamento* non ha modificato l'evoluzione della freschezza nelle spigole. Tuttavia, alla valutazione sensoriale, le spigole di allevamento estensivo hanno evidenziato una degradazione più lenta rispetto a quelle di allevamento intensivo e, soprattutto, di gabbie in mare. È possibile, ma resta da verificare sperimentalmente, che le condizioni più stressanti di allevamento nei sistemi intensivi e i maggiori tempi richiesti dalle operazioni di pesca, uccisione in acqua e ghiaccio e trasporto nel caso delle gabbie marine possano spiegare i peggiori risultati misurati con valutazione sensoriale sulle spigole provenienti da questi sistemi di allevamento.

Le attività relative all'**Obiettivo 4 - NIRS** hanno confermato le grandi capacità di questa metodica di predire le caratteristiche chimiche e dietetiche delle spigole in tempi rapidi e senza la necessità di procedere a complessi trattamenti del campione e costose analisi chimiche. La spettrometria NIR ha evidenziato promettenti potenzialità per la valutazione del grado di freschezza, come pure per l'identificazione di origine di spigole provenienti da diversi sistemi di allevamento. La *composizione chimica* e il contenuto energetico della carne di spigola sono stati predetti al NIRS con elevata (umidità, estratto etereo) e buona (proteina grezza) accuratezza sia sui campioni macinati freschi che liofilizzati. Inoltre è stato possibile ottenere informazioni su alcune caratteristiche non direttamente collegabili con la composizione chimica del campione, quali gli indici biometrici (fattore di condizione) e la resa in carcassa,

5. Conclusioni

mentre le calibrazioni per la predizione del profilo acidico del grasso muscolare sono risultate inadeguate.

L'analisi NIRS è stata in grado anche di discriminare i campioni di pesce sulla base del grado di freschezza e predire i *giorni di conservazione*. In particolare i campioni analizzati subito dopo la cattura sono stati differenziati con maggiore precisione rispetto a quelli sottoposti a una certa conservazione, anche molto breve. Questi risultati incoraggianti sono stati ottenuti con l'analisi NIRS dei filetti freschi, mentre la liofilizzazione del campione, alterando la concentrazione di composti volatili e ossidabili e modificando la struttura del campione, ha comportato una perdita delle informazioni relative alla freschezza del pesce.

Sebbene la caratterizzazione realizzata nell'ambito degli obiettivi 1, 2 e 3 non abbia evidenziato differenze particolarmente marcate ed evidenti nella qualità delle spigole di diversa origine, l'analisi NIRS è risultata molto sensibile e strumento idoneo alla discriminazione dei campioni di spigole in funzione del *sistema di allevamento*. Sia analizzando i filetti freschi macinati che liofilizzati, i campioni sono stati raggruppati e classificati in funzione del sistema di allevamento con una separazione delle spigole di allevamento intensivo rispetto a quelle di allevamento estensivo, mentre gli spettri delle spigole pescate da gabbie hanno mostrato di una distribuzione più dispersa e sovrapposta con quella degli altri gruppi.

In **conclusione**, i risultati ottenuti ribadiscono il complessivo eccellente valore dietetico delle spigole provenienti dagli allevamenti nazionali campionati, caratterizzato da un buon livello proteico (19%) e livelli lipidici e calorici crescenti con l'intensità produttiva, (estensivo < semi-intensivo e gabbie a mare < intensivo a terra). Il livello medio e il profilo acidico dei lipidi misurati nelle carni di spigola permette di classificare questa specie nella categoria dei pesci semi-grassi, con un contenuto elevato di acidi grassi polinsaturi a favorevole rapporto ω -3/ ω -6.

Con riferimento alla salute umana e alla sicurezza alimentare, le spigole di allevamenti nazionali sono risultate prodotti sicuri con una concentrazione di PCB e metalli pesanti sempre inferiore ai limiti di legge. Fra i diversi sistemi produttivi, la contaminazione finale del pesce è risultata più dipendente dalla contaminazione ambientale piuttosto che dalla contaminazione dei mangimi eventualmente somministrati.

Lo studio dell'evoluzione del grado di freschezza della spigola ha evidenziato una buona resistenza della specie alla degradazione, qualora manipolata con cura e conservata in ghiaccio, e ritmi di degradazione più lenti nel caso di spigole derivate dall'allevamento estensivo.

5. Conclusioni

Per tutti questi aspetti qualitativi, è stato evidenziato un ruolo importante del sistema di allevamento piuttosto che della taglia, rinforzando la necessità di una caratterizzazione qualitativa e dello sviluppo di indici, criteri e tecniche analitiche innovative e rapide quali il NIRS utili allo sviluppo di sistemi di tracciabilità, certificazione e identificazione di origine, strumenti questi indispensabili per orientare le scelte di consumo e incontrare le preferenze del consumatore, al fine di accrescere la competitività del settore sui mercati nazionali e internazionali.

6. Bibliografia

6. Bibliografia

- Abbas K.A., Mohamed A., Jamilah B., Ebrahimian M., 2008. A review on correlations between fish freshness and pH during cold storage. *Am. J. Biochem. Biotech.* 4, 416-421.
- Abdulla M., Svensson S., Norden A., 1979. Antagonistic effect of zinc in heavy metal poisoning. In: *Proceedings of Management and control of heavy metals in the environment.* CEP consultants, Edinburgh, UK.
- Ackman R.G., 1989. *Marine Biogenic Lipids, Fats and Oils.* CRC Press Inc, Boca Raton, FL, USA.
- Ackman R.G., 1995. Composition and nutritional value of fish and shellfish lipids. In: Ruiter A. (ed.) *Fish and Fisheries Products. Composition, Nutritive Properties and Stability.* CAB International, Wallingford, UK, 117-156.
- Alasalvar C., Taylor K.D.A., Oskuz A., Garthwaite T., Alexis M.N., Grigorakis K., 2001. Freshness assessment of cultured sea bream (*Sparus aurata*) by chemical, physical and sensory methods. *Food Chemistry* 72, 33-40.
- 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.
- Alcock R., Behnisch P.A., Jones K.C., Hagenmaier H., 1998. Dioxin-like PCBs in the environment-Human exposure and significance of sources. *Chemosphere* 37, 1457-1472.
- Allinger N.L., Cava M.P., De Jongh D.C., Johnson C.R., Lebel N.A., Stevens C.L., 1986. *Chimica Organica.* Zanichelli Editore, Bologna, Italia.
- Álvarez A., García B., Garrido M.D., Hernández M.D., 2008. The influence of starvation time prior to slaughter on the quality of commercial-sized gilthead seabream (*Sparus aurata*) during ice storage. *Aquaculture* 284, 106-114.
- Antunes P., Gil O., 2004. PCB and DDT contamination in cultivated and wild sea bass from Ria de Aveiro, Portugal. *Chemosphere* 54, 1503-1507.
- AOAC, 1990. *Official Methods of Analysis (15th ed.).* Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA.
- Ballschmiter K., Zell M., 1980. Analysis of polychlorinated biphenyls (PCB) by glass capillary gas chromatography. *Fresenius Z. Anal. Chem.* 302, 20-31.
- Barbosa A., Vaz Pires P., 2004. Quality Index Method (QIM): development of a sensorial scheme for common octopus (*Octopus vulgaris*). *Food Control* 15, 161-168.

6. Bibliografia

- Bayarri S., Baldassarri L.T., Iacovella N., Ferrara F., di Domenico A., 2001. PCDDs, PCDFs, PCBs and DDE in edible marine species from the Adriatic Sea. *Chemosphere* 43, 601-610.
- Behrntssen M.H.G., Lundebye A.K., Torstensen B.E., 2005. Reducing the levels of dioxins and dioxin-like PCBs in farmed Atlantic salmon by substitution of fish oil with vegetable oil in the feed. *Aquaculture Nutrition* 11, 219-231.
- Bell J.G., McGhee F., Dick J.R., Tocher D.R., 2005. Dioxin and dioxin-like polychlorinated biphenyls (PCBs) in Scottish farmed salmon (*Salmo salar*): effects of replacement of dietary marine fish oil with vegetable oils. *Aquaculture* 243, 305-314.
- Beretta C., 1994. *Tossicologia veterinaria*. Casa Editrice Ambrosiana, Milano, Italia.
- Berzaghi P., Riovanto R., 2009. Near infrared spectroscopy in animal science production: principles and applications. *Ital. J. Anim. Sci.* 8 (Suppl. 3), 39-62.
- Bjork M., Gilek M., 1997. Bioaccumulation kinetics of PCB 31, 49 and 153 in the blue mussel (*Mytilus edulis* L.) as a function of algal food concentration. *Aquatic Toxicology* 38, 101-123.
- Bordajandi L.R., Martín I., Abad E., Rivera J., Gonzáles M.J., 2006. Organochlorine compounds (PCBs, PCDDs and PCDFs) in seafish and seafood from the Spanish Atlantic Southwest Coast. *Chemosphere* 64, 1450-1457.
- Bøknæs N., Jensen N.K., Andersen M.C., Martens H., 2002. Freshness assessment of thawed and chilled cod fillets packed in modified atmosphere using Near-infrared Spectroscopy. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 35, 628-634.
- Bronzi P., Rampacci M., Ugolini R., 2001. L'acquacoltura intensiva. In: Cataudella S., Bronzi P. (eds.) *Acquacoltura Responsabile. Verso le Produzioni Acquatiche del Terzo Millennio*. Unimar-Uniprom, Roma, 319-351.
- Brouwer A., Ahlborg U.G., van Leeuwen F.X.R., Feelay M.M., 1998. Report from WHO working group on the assessment of health risks for human infants from exposure to PCDDs, PCDFs and PCBs. *Chemosphere* 37, 1627-1643.
- Cahu C., Salen P., de Lorgeril M., 2004. Farmed and wild fish in the prevention of cardiovascular diseases: assessing possible differences in lipid nutritional values. *Nutr. Metab. Cardiovas.* 14, 34-41.
- Cakli S., Kilinc B., Cadun A., Dincer T., Tolasa S., 2006. Effect of uncutting on microbiological, chemical and sensory properties of aquacultured sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in ice. *Eur. Food Res. Technol.* 222, 719-726.
- CAMO ASA, 1998. *The Unscrambler. User manual*. CAMO ASA, Oslo, Norway.

6. Bibliografia

- Carubelli, G., Fanelli, R., Mariani, G., Nichetti, S., Crosa, G., Calamari, D., Fattore E., 2007. PCB contamination in farmed and wild sea bass (*Dicentrarchus labrax*) from a coastal wetland area in central Italy. *Chemosphere* 68, 1630-1635.
- Chen W., Tanand S.K., Tay J.H., 1996. Distribution, fractional composition and release of sediment bound heavy metals in tropical reservoirs. *Water, Air and Soil Pollution* 92, 273-287.
- Ciurczak E.W., 1992. Principles of Near-Infrared Spectroscopy. In: Donald Burns A., Ciurczak E.W. (eds.) *Handbook of Near Infrared Analysis*, Marcell Dekker, Inc., New York, 7-12.
- Clarke J.T.R., Cullen-Dean G., Regelink E., Chan L., Rose V., 1990. Increased incidence of epistaxis in adolescents with familial hypercholesterolemia treated with fish oil. *Journal of Pediatrics* 116, 139-42.
- Connell J.J., 1995. *Control of Fish Quality*. Fishing News Books, Oxford, UK.
- Cozzolino D., Murray I., Scaife J.R., 2002. Near infrared reflectance spectroscopy in the prediction of chemical characteristics of minced raw fish. *Aquaculture Nutrition* 8, 1-6.
- Cozzolino D., Murray I., Chree A., Scaife J.R., 2004. Multivariate determination of free fatty acids and moisture in fish oils by partial least-squares regression and near-infrared spectroscopy. *Swiss Society of Food Science and Technology* 38, 821-828.
- Dalle Zotte A., Berzaghi P., Jansson L., Andrighetto I., 2006. The use of near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS) in the prediction of chemical composition of freeze-dried egg yolk and discrimination between different n-3 PUFA feeding sources. *Animal Feed Science and Technology* 128, 108-121.
- De Francesco M., 2004. Effetti dell'apporto proteico di origine vegetale sulla crescita e la qualità della carne in trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) e in orata (*Sparus aurata*). Tesi di Dottorato. Dottorato di Ricerca in Acquacoltura e Qualità dei Prodotti Ittici. Ciclo XVI. Università degli Studi di Firenze.
- Deshpande A.D., Draxler A.F.J., Zdanowicz V.S., Schrock M.E., Paulson A.J., Finneran T.W., Sharack B.L., Corbo K., Arlen L., Leimburg E.A., Dockum B.W., Pikanowski R.A., May B., Rosman L.B., 2000. Contaminant Levels in Muscle of Four Species of Recreational Fish from the New York Bight Apex: Glossary of Technical Terms, Acronyms, and Units of Measure. U.S. National Oceanic and Atmospheric Administration Technical Memorandum NMFS-NE-157. <http://www.nefsc.noaa.gov/nefsc/publications/tm/tm157/tm157gloss.htm>. Accesso Ottobre 2009.
- DeWitt T.H., Swartz R.C., Hansen D.J., McGovern D., Berry W.J., 1996. Bioavailability and

6. Bibliografia

- chronic toxicity of cadmium in sediment to estuarine amphipod *Leptocheirus plumulosus*. Environ. Toxicol. Chem. 15, 2095-2101.
- Downey G., 1996. Non-invasive and non-destructive percutaneous analysis of farmed salmon flesh by near infrared spectroscopy. Food Chemistry 55, 305-311.
- Downey G., Beauchêne, D., 1997. Discrimination between fresh and frozen-then-thawed beef *m. longissimus dorsi* by combined visible-near infrared reflectance spectroscopy: A feasibility study. Meat Science 45, 353-363.
- DPR 24 maggio 1988, n. 216. Gazzetta Ufficiale n. 143 SO del 20 giugno 1988.
- Dufour E., Frencia J.P., Kane E., 2003. Development of rapid method based on front-face fluorescence spectroscopy for the monitoring of fish freshness. Food Research International 36, 415-423.
- EC, 1976. Regolamento (CE) n. 103/76 della Commissione. Gazzetta Ufficiale n. L 20 del 28/1/76.
- EC, 1976. Direttiva 76/769/CE del Consiglio, del 27 luglio 1976. Gazzetta Ufficiale n. L 262 del 27 settembre 1976, pp. 0201-0203.
- EC, 1985. Direttiva 85/467/CE del Consiglio del 10 ottobre 1985. Gazzetta Ufficiale n. L 269 del 11 ottobre 1985, pp. 0056-0058.
- EC, 1991. Direttiva 91/493/CE del Consiglio del 22 luglio 1991. Gazzetta ufficiale n L 268 del 24.9.1991, pag. 15.
- EC, 1992. D.Lgs. 531/92. Gazzetta Ufficiale n. 7 S.O. dell'11/1/1993. http://www.aries.ts.camcom.it/reposurp/Schede_Pesca_html/decreto%20531.htm. Accesso novembre 2009.
- EC, 1995. Decisione della Commissione 95/149/CE dell'8 marzo 1995. Gazzetta Ufficiale n. L 97 del 29.4.1995.
- EC, 1996. Direttiva 96/59/CE del Consiglio del 16 Settembre 1996. Gazzetta ufficiale n. L 243 del 24 settembre 1996, pp. 0031-0035.
- EC, 1996. Regolamento (CE) 2406/96 del Consiglio del 26 novembre del 1996. Gazzetta Ufficiale n. L 334 del 23/12/1996.
- EC, 1999. Commission Decision No 1999/788 dated 3 December 1999 on protective measures with regard to contamination by dioxins of certain products of porcine and poultry origin intended for human or animal consumption. Official J. Eur. Union 4.12.1999, L310/62.
- EC, 1999. Decisione della Commissione 1999/551/CE del 6 agosto 1999. Gazzetta Ufficiale n. L 209/42 del 07/08/1999.

6. Bibliografia

- EC, 2001. Regolamento (CE) n. 466/2001 della Commissione dell'8 marzo. Gazzetta Ufficiale n. L 77 del 16/3/2001.
- EC, 2005. Regolamento (CE) n. 78/2005 della Commissione del 19 gennaio 2005. Gazzetta Ufficiale n. L 16/43 del 20/1/2005.
- EC, 2006. Commission Recommendation dated 16 November 2006 on the monitoring of background levels of dioxins, dioxin-like PCBs and non-dioxin like PCBs in foodstuffs (notified under document number C(2006) 5425) (1). Official J. Eur. Union 22.11.2006, L322/24-31
- EC, 2006. Regolamento CE n. 199/2006 della Commissione del 3 febbraio 2006. Gazzetta Ufficiale n. L32/34 del 4/2/2006.
- EC, 2006. Regolamento (CE) n. 1881/2006 della Commissione del 19/12/2006. Gazzetta ufficiale n. L 364/5 del 20/12/2006.
- EC, 2008. Regolamento (CE) n. 1022/2008 della Commissione del 17/10/2008. Gazzetta Ufficiale n. L 277/18 del 18/10/2008.
- EC, 2009. L'acquacoltura europea in cifre. http://ec.europa.eu/fisheries/cfp/aquaculture_processing/aquaculture/figures_it.htm. Accesso ottobre 2009.
- Engler R.M., Brannon J.M., Rose J., Bigham G., 1977. Chemistry of marine sediments. Ed. Ann. Arbor. Sci. Publ. 163-171.
- Eurostat, 2005 http://epp.eurostat.ec.europa.eu/portal/page/portal/statistics/search_database. Accesso novembre 2009.
- Eurostat, 2006. http://epp.eurostat.ec.europa.eu/portal/page/portal/statistics/search_database. Accesso novembre 2009.
- FAO, 2006. Fishery and Aquaculture Statistics. <http://www.fao.org/fishery/statistics/programme/publications/all/en>. Accesso novembre 2009.
- FAO, 2008. The state of world fisheries and aquaculture. FAO Fisheries and Aquaculture Department. Rome, 2009. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/i0250e/i0250e.pdf>. Accesso ottobre 2009.
- FAO, 2010. Fishery and Aquaculture Statistics. <http://www.fao.org/fishery/statistics/en>. Accesso gennaio 2010.
- Fasolato L., Manfrin A., Corrain C., Perezani A., Arcangeli G., Rosteghin M., Novelli E., Lopparelli R.M., Balzan S., Mirisola M., Serva L., Segato S., Bianchi E., 2008a.

6. Bibliografia

- Assessment of quality-parameters and authentication in sole (*Solea vulgaris*) by NIRS (Near Infrared Reflectance Spectroscopy). *Industrie Alimentari* 47, 355-361.
- Fasolato L., Mirisola M., Balzan S., Tepedino V., Severino S., Novelli E., Manfrin A., Arcangeli G., Berzaghi P., 2008b. Impiego di una sonda Vis/NIR in riflessione e di uno strumento monocromatore per la discriminazione tra prodotto ittico fresco e congelato. In: 3° Simposio italiano di Spettroscopia nel Vicino Infrarosso - NIR Italia 2008, Lazise (Verona), Italia.
- Ferreira M., Antunes P., Costa J., Amado J., Gil O., Pousão-Ferreira P., Vale C., Reis-Henriques M.A., 2008. Organochlorine bioaccumulation and biomarkers levels in cultured and wild seabream. *Chemosphere* 73, 1669-1674.
- Fjeld E., Rognerud S., Steiness E., 1994. Influence of environmental factors on heavy metal concentration in lake sediments in southern Norway indicated by path analysis. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 51, 1708-1720.
- Folch J.M., Lees M., Sloane-Stanley G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipid from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497-509.
- Frasconi F., Frignani M., Giordani P., Guerzoni S., Ravaioli M., 1984. Sedimentological and geochemical behaviour of heavy metals in the area near the Po River Delta. *Mem. Soc. Geol. It.* 27, 469-481.
- Gardner M., 1999. Dissolved phase speciation of zinc in the humber estuary. *Chemosphere* 38, 2117-2124.
- Garrido A., Pérez Marin M.D., Guerrero Ginel J.E., Gómez Cabrera A., 2003. Avances en la utilización de la tecnología NIRS. Aplicaciones en producción animal. In: Rebollar P.G., De Blas C., Mateos G.G. (eds.) *Avances en Nutrición y Alimentación Animal*. FEDNA, Madrid, Spain.
- Geldmacher-Von Mollinkrodt M., 1991. Acute metal toxicity in humans in: Merian E. (ed.) *Metals and Their Compounds in the Environment: Occurrence, Analysis, and Biological Relevance*. Vch Verlagsgesellschaft MbH, Weinheim, Germany.
- Gjerde B., Martens H., 1987. Predicting carcass composition of rainbow trout by near-infrared reflectance spectroscopy. *J. Anim. Breed. Genet.* 104, 137-148.
- Gil, O., Antunes, P., 2004. Organochlorines in cultivated sea bass and in diet. *Organohalogen Compd.* 66, 1888-1891.
- González-Martín I., González-Pérez C., Hernández-Méndez J., Álvarez-García N., Merino Lázaro S., 2002. Determination of fatty acids in the subcutaneous fat of Iberian breed swine

6. Bibliografia

- by near infrared spectroscopy. A comparative study of the methods for obtaining total lipids: solvents and melting with microwaves. *J. Near Infrared Spectrosc.* 10, 257-267.
- Gram L., Huss H.H., 1996. Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology* 33, 121-137.
- Gram L., Dalgaard P., 2002. Fish spoilage bacteria. Problems and solutions. *Current Opinion in Biotechnology* 13, 262-266.
- Guerzoni S., 1990. Transport of trace metals by sedimentation in the Adriatic: A case study. In: *Transport of Pollutants by Sedimentation. MAP Technical Reports Series No. 45, UNEP, Athens, 161-181.*
- Gupta S.K., Aten C., 1993. Comparison and evaluation of extraction media and their suitability in a simple model to predict the biological relevance of heavy metal concentration in contaminated soils. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 51, 25-46.
- Knowles T.G., Brown S.N., Warriss P.D., Lines J., Tinarwo A., Bravo A., Carvalho H., Gonçalves A. 2007. Effect of electrical stunning at slaughter on the carcass, flesh and eating quality of farmed sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture Research* 38, 1732-1741.
- Hans J., 1990. Effects of metals on domestic animals. In: Merian E. (ed.) *Metals and Their Compounds in the Environment: Occurrence, Analysis, and Biological Relevance.* Vch Verlagsgesellschaft Mbh, Weinheim, Germany.
- Harel M., Koven W., Lein I., Bar Y., Behrens P., Stubblefield J., Zohar Y., Place A.R., 2002. Advanced DHA, EPA and ArA enrichment materials for marine aquaculture using single cells heterotrophs. *Aquaculture* 231, 347-362.
- Ingrao G., Santaroni G., Tomassi G., 1995. Elementi in traccia: ruolo biologico e aspetti nutrizionali per l'uomo. *Ann. Ist. Super. Sanità* 31, 275-281.
- INRAN, 2007. Istituto Nazionale di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione. Banca dati "Composizione degli alimenti". <http://www.inran.it/>. Accesso Ottobre 2009.
- Isaksson T., Togersen G., Iversen A., Hildrum K.I., 1995. Non-destructive determination of fat, moisture and protein in salmon fillets by use of near-infrared diffuse spectroscopy. *J. Sci. Food Agric.* 69, 95-100.
- Istituto Superiore di Sanità, 1999. Linee-guida per interventi analitici mirati al rilevamento di PCB, PCDD, e PCDF in prodotti alimentari. Rif.: ISS-XEN-99-4 - Versione: 1 Luglio 1999.
- Ismea, 2009. Istituto dei Servizi per il Mercato Agricolo ed Alimentare. Pubblicazioni - Pesca e Acquacoltura. <http://www.ismea.it/flex/cm/pages/ServeBLOB.php/L/IT/IDPagina/200>. Accesso novembre 2009.

6. Bibliografia

- Jensen S., Johnels A.G., Olsson M., Otterlind G., 1969. DDT and PCB in marine animals from Swedish waters. *Nature* 224, 247-250.
- Jones B., Turkey A., 1997. Distribution and Speciation of Heavy Metals in Superficial Sediments from the Tees Estuary, North-east England. *Mar. Poll. Bull.* 34, 768-779.
- Lanari D., Poli B.M., Ballestrazzi R., Lupi P., D'Agaro E., Mecatti M., 1999. The effect of dietary fat and NFE levels on growing European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Growth rate, body and fillet composition, carcass traits and nutrient retention efficiency. *Aquaculture* 179, 351-364.
- L.A.R.N., 1996. Livelli di Assunzione Giornalieri Raccomandati di Nutrienti per la popolazione Italiana, Revisione 1996. <http://web.tiscalinet.it/ambupedy/larn.htm>. Accesso novembre 2009.
- Lee M.H., Cavinato A.G., Mayes D.M., Rasco B.A., 1992. Non-invasive short-wavelength near-infrared spectroscopic method to estimate the crude lipid content in the muscle of intact rainbow trout. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 40, 2176-2181.
- Lin M., Cavinato A.G., Huang Y., Rasco B.A., 2003. Predicting sodium chloride content in commercial king (*Oncorhynchus tshawytscha*) and chum (*O. keta*) hot smoked salmon fillet portions by short-wavelength near-infrared (SW-NIR) spectroscopy. *Food Research International* 36, 761-766.
- Lin M., Mousavi M., Al-Holy M., Cavinato G., Rasco B.A., 2006. Rapid Near Infrared Spectroscopic method for the detection of spoilage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillet. *J. Food Sci.* 71, S18-S23.
- Loizeau V., Abarnou A., Cugier P., Jaouen-Madoulet, Le Guellec A.M., Menesguen A., 2001. A Model of PCB Bioaccumulation in the Sea Bass Food Web from the Seine Estuary. *Marine Pollution Bulletin* 43, 242-255.
- Martillotti F., Antongiovanni M., Rizzi L., Santi E., Bittante G., 1987. Metodi di analisi per la valutazione di alimenti di tipo zootecnico. Quaderni metodologici n. 8, C.N.R.-I.P.R.A., Roma.
- Mazzola A., Marino G., 2001. Le specie eurialine. In: Cataudella S., Bronzi P. (eds.) *Acquacoltura Responsabile. Verso le Produzioni Acquatiche del Terzo Millennio*. Unimar-Uniprom, Roma, 547-579.
- Mathias J.A., Williams P.C., Sobering D.C., 1987. The determination of lipid and protein in freshwater fish by using near-infrared reflectance spectroscopy. *Aquaculture* 61, 303-311.
- Meilgaard M., Civile G.V., Carr B.T., 1991. *Sensory evaluation techniques*. Vol. I. CRC Press,

6. Bibliografia

- Boca Raton, FL, USA.
- Mengoli A., 1994. Qualità nutrizionali del muscolo di pesce. *Industrie Alimentari* 33, 1221-1228.
- Mertz W., 1969. Chromium occurrence and function in biological systems. *Physiol. Rev.* 49-163.
- Messina C., Mistretta G., Conte L., Tazzoli M., Santulli A., 2009. Biochemical and nutritional traits of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) from different rearing systems. *Ital. J. Anim. Sci.* 8 (Suppl. 2), 863-865.
- Mohr V., 1987. Control of nutritional and sensory quality of cultured fish. In: Kramer D., Liston J. (eds.) *Seafood Quality Determination*. Elsevier, Amsterdam, The Netherland, 487-496.
- Murray I., Williams P.C., 1987. Chemical principles of Near-infrared technology. In: Williams P.C., Norris K.H. (eds.) *Near Infrared Technology in the Agriculture and Food Industries*. Am. Assoc. Cereal Chem., Inc., St. Paul, MN, USA, 17-31.
- Nakata H., Tanabe S., Tatsukawa R., Amano M., Miyazaki N., Petrov E.A., 1997. Bioaccumulation profiles of polychlorinated biphenyls including coplanar congeners and possible toxicological implications in Baikal seal (*Phoca sibirica*). *Environmental Pollution* 95, 57-65.
- Nanyjo Y., Toshio Y., 2002. Rapid measurement of fish freshness indices by an amperometric flow-injection system with 16-way switching valve and immobilized enzyme reactors. *Analytica Chimica Acta* 470, 175-183.
- Nettleton J.A., 1985. *Seafood nutrition*. Osprey Books, Huntington, New York, USA, p. 280.
- Nilsen B.N., Mevik B.H., Hildrum K.I., Isaksson T., 1999. On-line analysis of whole salmon fillets. In: *Proc. 9th International Conference on Near-Infrared Spectroscopy*, Verona, Italy, 375-377.
- Nilsen H., Esaiassen M., Heia K., Sigernes F., 2002. Visible/near-infrared spectroscopy: a new tool for the evaluation of fish freshness. *J. Food Sci.* 67, 1821-1826.
- Nortvedt R., Eckhoff K., Gribbestad I.S., Jorgensen L., Nilsen H., Sorensen N.K., Thomassen M., Torrissen O.J., Hemre G.I., 1998a. Evaluation of methods applied to monitor the slaughtering quality of Atlantic Salmon. In: *Proc. VIII International Symposium on Nutrition and Feeding of Fish*, Las Palmas De Gran Canaria, Spain, 78.
- Nortvedt R., Torrissen O.J., Tuene S., 1998b. Application of near-infrared transmittance spectroscopy in the determination of fat, protein and dry matter in Atlantic halibut fillet.

6. Bibliografia

- Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems 42, 199-207.
- Orban E., Ricelli A., Di Lena G., Casini I., Caproni R., 1999. Quality differences in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) from intensive and extensive rearing systems. In: Proc. Int. Conf. Aquaculture Europe '99, Trondheim, Norway, 180-181.
- Orban E., Di Lena G., Navigato T., Casini I., Santaroni G., Marzetti A. e Caproni R., 2002. Quality characteristics of sea bass intensively reared and from lagoon as affected by growth conditions and the aquatic environment. J. Food Sci. 67, 542-546.
- Osborne B.G., Fearn T., Hindle P.H., 1993. Practical NIR Spectroscopy with Application in Food and Beverage Analysis. Longman Scientific & Technical, Harlow, UK.
- Pacifico R., 2005. Valutazione e mitigazione della contaminazione da metalli pesanti nelle lagune costiere Flegree. Tesi di Dottorato. XVII ciclo, Università degli studi di Napoli, Federico II.
- Pagano G., Cipollaro M., Corsale G., Esposito A., Ragucci E., Giordano G.G., Trieff N.M., 1996. The sea urchin: bioassay for assessment of damage from environmental contaminants. In: Cairns J.Jr. (ed.) Community Toxicity Testing. Association for Standard Testing and Materials, Philadelphia, USA, 66-92.
- Pastor D., Boix J., Fernández V., Albaigés J., 1996. Bioaccumulation of organochlorinated contaminants in three estuarine fish species (*Mullus barbatus*, *Mugil cephalus* and *Dicentrarchus labrax*). Mar. Pollut. Bull. 32, 257-262.
- Pavlidis M., Papandroulakis N., Divanach P., 2006. A method for the comparison of chromaticity parameters in fish skin: preliminary results for coloration pattern of red skin Sparidae. Aquaculture 258, 211-219.
- Petit M.D., Rucandio M.I., 1999. Sequential extractions for determination of cadmium distribution in coal fly ash, soil and sediment. Anal. Chim. Acta 401, 283-291.
- Pinto B., Garritano S.L., Cristofani R., Ortaggi G., Giuliano A., Amodio-Cocchieri R., Cirillo T., De Giusti M., Boccia A., Reali D., 2008. Monitoring of polychlorinated biphenyl contamination and estrogenic activity in water, commercial feed and farmed seafood. Environ. Monit. Assess. 144, 445-453.
- Pories W.J., Strain W.H., 1966. Zinc and wound healing. In: Prasad A.S. (ed.) Zinc Metabolism. Charles C. Ythomas, Springfield, IL, USA, 378-394.
- Poli B.M., 1999a. La qualità del prodotto ittico: nuove prospettive. Estratto da: Acquacoltura e pesca tra i due millenni. I Georgofili. I Quaderni, Firenze, 119-157.
- Poli B.M., 1999b. Acquacoltura: qualità dell'ambiente e del prodotto. Castiglione della

6. Bibliografia

- Pescaia-Grosseto, 30/9-1/10/1996, Edizioni scientifiche italiane, 135-155.
- Poli B.M., Parisi G., Zampacavallo G., Mecatti M., Lupi P., Gualtieri M., Franci O., 2001. Quality outline of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) reared in Italy: shelf life, edible yield, nutritional and dietetic traits. *Aquaculture* 202, 303-315.
- Pottinger T.G., 2001. Effects of husbandry stress on flesh quality indicators in fish. In: Kestin S.C., Warriss P.D. (eds.) *Farmed Fish Quality*. Fishing News Books, Oxford, UK, 145-160.
- Power E.A., Chapman P.M., 1992. Assessing sediment quality. In: *Sediment Toxicity Assessment*. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, USA, 1-18.
- Rand G.M., Wells P.G., McCarty L.S., 1995. Introduction to aquatic toxicology. In: Rand G.M. (ed.) *Fundamentals of Aquatic Toxicology*, second ed., Taylor & Francis, Washington, DC, USA, 3-67.
- Rasco B.A., Miller C.E., King T.L., 1991. Utilization of NIR spectroscopy to estimate the proximate composition of trout muscle with minimal sample pretreatment. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 39, 67-72.
- Ravagnan G., 1992. *Vallicoltura Integrata*. Edagricole, Bologna, Italia.
- Rocca G., Bracali E., 1997. *Allevamento e Ambiente*. Edagricole, Bologna, Italia.
- Sadok S., Uglow R.F., Haswell S.J., 1996. Determination of trimethylamine in fish by flow-injection analysis. *Analytica Chimica Acta* 321, 69-74.
- Salata G.C., Wade T.L., Sericano J.L., Davis J.W., Brooks Salata J.M., 1995. Analysis of Gulf of Mexico bottlenose dolphins for organochlorine pesticides and PCBs. *Environmental Pollution* 88, 167-175.
- Saito H., Yamashiro R., Alasalvar C., Konno T., 1999. Influence of diet on fatty acids of three subtropical fish, subfamily caesioninae (*Caesio diagramma* and *C. tile*) and family siganidae (*Siganus canaliculatus*). *Lipids* 34, 1073-1082.
- Sargent J.R., Henderson R.J., Tocher D.R., 1989. The lipids. In: Halver E.J. (ed.) *Fish Nutrition*, 2nd Edition. Academic Press, New York, USA, 153-218.
- Sargent J.R., Tocher D.R., Bell J.G., 2002. The lipids. In: Halver J.E., Hardy R.W. (eds.) *Fish Nutrition*, 3rd Edition. Academic Press, San Diego, CA, USA, 181-257.
- Saroglia M., Ingle E., 1992. *Tecniche di acquacoltura*. Edagricole, Bologna, Italia.
- SAS Statistical Analysis System Institute Inc, 1991. *User's Guide, Statistics, Version 9.1.3*, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Schade G., Heinzow B., 1998. Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in human milk of mothers living in Northern Germany: current extent of contamination, time

6. Bibliografia

- trend from 1986 to 1997 and factors that influence the levels of contamination. *Science of the Total Environment* 215, 31-39.
- Scoog D.A., West D.M., 1986. *Principles of Instrumental Analysis*. Holt, Rinehart and Winston, New York, USA.
- Serrano R., Simal-Julian A., Pitarch E., Varò I., Navarro J.C., 2003. Biomagnification study on organochlorine compounds in marine aquaculture: the sea bass (*Dicentrarchus labrax*) as a model. *Environmental Science Technology* 37, 3375-3381.
- Serrini G., Luzzana U., 1994. Le molecole ed i processi implicati nella comparsa e nell'alterazione dell'odore e del sapore del pesce. *Industrie alimentari* 33, 538-544.
- Shearer K.D., 1994. Factor affecting the proximate composition of cultured fishes with emphasis on Salmonids. *Aquaculture* 199, 63-88.
- Shenk J.S., Workman J.J., Westerhaus M.O., 1992. Application of NIR spectroscopy to agriculture products. In: Donald Burns A., Ciurczak E.W. (eds.) *Handbook of Near Infrared Analysis*. Marcell Dekker, Inc., New York, USA, 388-432.
- Silvestroni P., 1992. *Fondamenti di Chimica*. Masson Editoriale Veschi, Milano, Italia.
- Smith A.G., Gangolli S.D., 2002. Organochlorine chemicals in seafood: occurrence and health concerns. *Food and Chemical Toxicology* 40, 767-779.
- Solberg C., 1995. Use of near infrared transmittance in quality analysis of fish. In: Davies A.M.C., Williams P. (eds.) *Proc. 7th International Conference on Near Infrared Spectroscopy*, Montreal, Canada, USA, 591-595.
- 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.
- Sollid H., Solberg C., 1992. Salmon fat content estimation by near infrared transmission spectroscopy. *J. Food Sci.* 57, 792-793.
- Sotgiu M.A., 2008. *Metalli pesanti e sclerosi multipla*. Tesi di Dottorato. XXI ciclo, Università degli Studi di Sassari.
- Steuer J.S., Hall D.W, Fitzgerald S.A., 1999. Distribution and Transport of Polychlorinated Biphenyls and Associated Particulates in the Hayton Millpond, South Branch Manitowoc River, 1993-95. U.S. Geological Survey, Water-Resources Investigations Report, 99-4101.
- Storelli M.M., Barone G., Marcotrigiano G.O., 2007. Residues of polychlorinated biphenyls in edible fish of the Adriatic sea: assessment of human exposure. *J. Food Sci.* 72, C183-C187.
- Torrissen O.J., Sigurgisladottir S., Slinde E., 2001. Texture and technological properties of fish. In: Kestin S.C., Warris P.D. (eds.) *Farmed Fish Quality*. Fishing News Books, Blackwell,

6. Bibliografia

- Oxford, UK, 42-57.
- Trocino A., Xiccato G., Carraro L., Simontacchi C., Poltronieri C., 2005. Effect of pre-slaughter condition in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Ital. J. Anim. Sci. 4 (Suppl. 2), 606-608.
- Trocino A., Majolini D., Xiccato G., 2009. PCBs contamination in farmed European sea bass from different Italian rearing systems. Chemosphere 76, 250-254.
- Troisi G.M., Haraguchi K., Kaydoo D.S., Nyman M., Aguilar A., Borrell A., Siebert U., Mason C.F., 2001. Bioaccumulation of polychlorinated biphenils (PCBs) and dichlorodiphenylethane (DDE) methyl sulfones in tissue of seal and dolphin morbillivirus epizootic victims. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A, 62, 1-8.
- Tsutsumi T., Yanagi T., Nakamura M., Konon Y., Uchibe H., Iida T., Huri T., Nakagawa R., Tubiishi K., Matsuda R., Sasaki K., Toyoda M., 2001. Update of daily intake of PCDDs, PCDFs, and dioxin-like PCBVs from food in Japan. Chemosphere 45, 1129-1137.
- Tulli F., Balenovic I., Messina M., Tibaldi E., 2009. Biometry traits and geometric morphometrics in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) from different farming systems. Ital. J. Anim. Sci. 8 (Suppl. 2), 881-883.
- Uddin M., Okazaki E., Turza S., Yumiko Y., Tanaka M., Fukuda Y., 2005. Non-destructive visible/NIR spectroscopy for differentiation of fresh and frozen-thawed fish. J. Food Sci. 70, C506-C510.
- U.S. Environmental Protection Agency, 1996. PCBs: Cancer dose-response assessment and application to Environmental Mixtures. Report No. EPA/600/P-96/001F September 1996. <http://cfpub.epa.gov/ncea/CFM/recordisplay.cfm?deid=12486>. Accesso novembre 2009.
- U.S. Environmental Protection Agency, 1999. Method 1668, Revision A: Chlorinated Biphenyl Congeners in Water, Soil, Sediment, and Tissue by HRGC/HRMS. EPA No. EPA-821-R-00-002.
- U.S. Environmental Protection Agency, 2009a. Aroclor and Other PCB Mixtures <http://www.epa.gov/osw/hazard/tsd/pcbs/pubs/aroclor.htm>. Accesso marzo 2009.
- U.S. Environmental Protection Agency, 2009b. PCBs and Chemistry. <http://www.epa.gov/hudson/pcbs101.htm>. Accesso ottobre 2009.
- U.S. Environmental Protection Agency, 2009c. Table of PCB Species by Congener Number. <http://www.epa.gov/epawaste/hazard/tsd/pcbs/pubs/congenertable.pdf>. Accesso ottobre 2009.
- Valdes E.V., Atkinson J.L., Hilton J.W., Leeson S., 1989. Near infrared reflectance analysis of

6. Bibliografia

- fat, protein and energy of chicken and rainbow trout carcasses. *J. Anim. Sci.* 69, 1087-1090.
- Van den Berg M., Birnbaum L.S., Denison M., De Vito M., Farland W., Feeley M., Fiedler H., Hakansson H., Hanberg A., Haws L., Rose M., Safe S., Schrenk D., Tohyama C., Tritscher A., Tuomisto J., Tysklind M., Walker N., Peterson R.E., 2006. The 2005 World Health Organization re-evaluation of human and mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. *Toxicol. Sci.* 93, 223-241.
- WHO, 1981. Environmental Health Criteria 18; Arsenic. Ed. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 174.
- WHO, 1996. Trace elements in human nutrition and health. Ed. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- WHO, 2000. Air quality guidelines for Europe, 2nd ed. Copenhagen, World Health Organization Regional Office for Europe, 2000 (WHO Regional Publications, European Series No. 91). http://www.euro.who.int/document/aq/5_10pcbs.pdf. Accesso ottobre 2009.
- Williams P.C., 1987. Variables affecting near-infrared reflectance spectroscopy analysis. In: Williams P.C., Norris K.H. (eds.) *Near Infrared Technology in the Agriculture and Food Industries*. Am. Assoc. Cereal Chem., Inc., St. Paul, MN, USA, 143-167.
- Windham W.R., Barton II F.E., Lyon B.G., Lyon C.E., 1995. Classification of prior temperature history of chilled chicken breasts by near infrared reflectance spectroscopy. In: Proc. 7th International Conference on Near Infrared Spectroscopy, Montreal, Canada, 596-600.
- Xiccato G., Trocino A., Tulli F., Tibaldi E., 2004. Prediction of chemical composition and origin identification of European seabass (*Dicentrarchus labrax* L.) by Near Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS). *Food Chemistry* 86, 275-281.