



UNIVERSITÀ
DI PAVIA

Dipartimento di Biologia e Biotechnologie “L. Spallanzani”

Laurea Magistrale in Biologia Sperimentale e Applicata

Dipartimento di Scienze della Terra e dell’Ambiente

Da problema ecologico ed economico a potenziali biorisorse: il caso studio
dei tunicati della Laguna di Venezia

Relatore:

Prof.ssa Agnese Marchini

Correlatore:

Dott. Salvatore Coco

Tesi Sperimentale di
Lorenzo Lecca

Anno Accademico 2024/25

1. Introduzione	4
<i>1.1 Biorisorse in ambiente acquatico marino</i>	4
<i>1.1.2 Specie aliene marine come biorisorse</i>	6
<i>1.2 Tunicati: tassonomia, morfologia e distribuzione</i>	7
<i>1.2.1 Tunicati e bioinvasione</i>	13
<i>1.2.2 Impatti negativi causati dall'invasione di Tunicati</i>	14
<i>1.3 Tunicati nell'industria</i>	16
<i>1.3.1 Industria alimentare</i>	17
<i>1.3.2 La Tunicina e le sue applicazioni industriali</i>	19
<i>1.3.3 Applicazioni mediche e farmacologiche</i>	21
2. Scopo dello studio	23
3. Materiali e metodi	24
<i>3.1 Area di studio e raccolta dei campioni</i>	24
<i>3.2 Caratteristiche delle specie analizzate</i>	26
<i>3.3 Analisi della composizione centesimale</i>	31
<i>3.4 Determinazione del profilo degli acidi grassi nei tessuti interni</i>	32
<i>3.5 Determinazione degli elementi essenziali e dei metalli pesanti nella tunica e nei tessuti interni</i>	33
<i>3.6 Analisi dei dati</i>	36
4. Risultati	37
<i>4.1 Parametri morfometrici e Composizione centesimale</i>	37
<i>4.2 Contenuto in acidi grassi (FA)</i>	38
<i>4.2.1 Analisi multivariata della composizione degli acidi grassi in cinque ascidie solitarie</i>	41
<i>4.3 Contenuto minerale e metalli pesanti</i>	42
<i>4.3.1 Analisi multivariata della composizione minerale della tunica e del tessuto interno del corpo di ascidie solitarie: un approccio PCA</i>	47
5. Discussione	48

6. Conclusioni	54
7. Bibliografia	56

1. Introduzione

1.1 Biorisorse in ambiente acquatico marino

Il mare rappresenta la risorsa più vasta e inesplorata del pianeta con una copertura di oltre il 70% della superficie terrestre; gli oceani hanno da sempre fornito una grande varietà di risorse di cui l'uomo ha usufruito fin dagli albori della civiltà. È da tempo evidente l'importanza cruciale di questi ecosistemi nella fornitura di servizi ecologici essenziali, come la regolazione del clima, la protezione delle coste e la produzione di ossigeno (Costanza *et al.*, 1997).

Parte integrante degli ecosistemi acquatici, gli organismi marini rappresentano una biorisorsa estremamente diversificata e, in parte, non sfruttata. Sulla base del Registro Mondiale delle Specie Marine (*World Register of Marine Species*, WoRMS), esistono attualmente circa 242.000 specie marine riconosciute che vivono negli oceani di tutto il mondo; inoltre, il biota marino continua ad essere scoperto, caratterizzato e nominato costantemente ad una media attuale di 2.332 nuove specie all'anno (Bouchet *et al.*, 2023).

Negli ultimi anni, la ricerca scientifica si è concentrata sull'esplorazione delle potenzialità del mondo acquatico marino come fonte di nuove risorse; infatti, recenti ricerche hanno approfondito il ruolo delle risorse marine come fonte di biomassa alternativa, ponendo l'accento sulla necessità di un approccio integrato e sostenibile alla gestione degli ecosistemi marini (Pahl-Wostl *et al.*, 2011). In particolare, l'estrazione di materie prime dal mare, come alghe e microorganismi, è stata identificata come un'opzione promettente per lo sviluppo di bio-prodotti sostenibili. Questa nuova frontiera si concentra non solo sulla sostenibilità economica, ma anche sull'urgenza di rispondere alle sfide globali legate al cambiamento climatico e alla sicurezza alimentare, quali quelle proposte dall'Agenda 2030 dell'ONU (2015). In questo contesto di aumento di domanda e, di conseguenza, aumento di produzione di cibo proveniente dal mare è importante inquadrare il ruolo che alcune specie marine ancora scarsamente utilizzate potrebbero avere come biorisorse grazie alle loro caratteristiche bio-ecologiche, comprese le loro proprietà nutraceutiche.

Il termine “nutraceutica” nasce nel 1989, coniato da Stephen De Felice, fondatore della FIM (*Foundation for Innovation in Medicine*), unendo i termini “*nutrizione*” e “*farmaceutica*”. Il termine fa riferimento a cibi non trattati, alimenti fortificati o integratori alimentari, contenenti molecole biologicamente attive, in grado di contribuire in modo benefico alla salute degli esseri umani, apportando benefici che vanno al di là della nutrizione di base. Tra i composti bioattivi si individuano polisaccaridi, peptidi, vitamine, acidi grassi, antiossidanti e probiotici che possono essere formulati in supplementi alimentari o aggiunti a cibi funzionali. Questi composti possono essere estratti da materie prime naturali, mediante sintesi chimica o attraverso l'impiego di biotecnologie (Suleira *et al.*, 2015).

Storicamente, i prodotti di origine naturale hanno da sempre svolto un ruolo chiave nella scoperta e nella produzione di farmaci ed integratori alimentari. A questo proposito l'ambiente marino rappresenta un'importante risorsa di sostanze innovative, dotate di caratteristiche non riscontrabili nei prodotti ottenuti da materie prime di origine terrestre. Gli invertebrati marini possono svolgere un ruolo importante come fonte primaria di biomateriali e prodotti naturali, trovando impiego in applicazioni nel campo della farmaceutica, nutraceutica, cosmesi, nella produzione di antibiotici (Romano *et al.*, 2022). Tra gli invertebrati marini più studiati in questi settori si identificano: spugne, cnidari, tunicati, echinodermi, briozoi e una vasta gamma di microorganismi simbiotici associati alla presenza di questi macroorganismi (Janak *et al.*, 2013). All'interno di organismi acquatici macroscopici sono stati individuati numerosi composti bioattivi o metaboliti secondari, la cui origine in realtà è ascrivibile a microorganismi come funghi, microalghe e batteri, in grado di vivere in simbiosi con i primi. Tali microorganismi potrebbero essere non facilmente coltivabili in assenza del loro organismo ospite: risulta quindi necessario e di particolare interesse l'impiego di organismi macroscopici, come spugne e tunicati, per la ricerca, l'identificazione e la sintesi di nuovi composti utilizzabili in ambito farmaceutico (Faulkner, 2001; Lurgi *et al.*, 2012; Romano *et al.*, 2017). Ad esempio, la fenilaistina ottenuta dal fungo marino *Aspergillus ustus* (Thom e Church, 1926), e il suo analogo sintetico plinabulina, sono in fase 3 di sperimentazione clinica per il trattamento del carcinoma polmonare non a piccole cellule (Raphael *et al.*, 2017) e in fase 2 per la prevenzione della neutropenia (Nalley, 2017).

Derivati originali dell'urea aromatica con promettenti capacità antiossidanti sono stati isolati dal lichene intertidale *Lichina pygmaea* (Lightfoot) C. Agardh, 1817 (Mahajan *et al.*, 2017). Studi sul polichete *Eupolymnia nebulosa* (Montagu, 1819) hanno portato alla scoperta di un'intera famiglia di metaboliti contenenti zolfo (Calabro *et al.*, 2020). Successivamente, analisi chimiche effettuate su spugne subtidali come *Clathria strepsitoxa* (Hope, 1889) e *Spongosorites calcicola* Picton e Goodwin, 2007 hanno portato alla scoperta di alcuni interessanti alcaloidi bioattivi (Firsova *et al.*, 2017; Wolfender *et al.*, 2019). Infine, nell'ambito di un programma dedicato all'esplorazione di un hotspot di bio- e chemiodiversità in acque profonde, a partire dalla spugna *Characella pachastrelloides* (Carter, 1876) è stata identificata una nuova famiglia di glicopeptidi, oltre alla rilevazione della presenza di cianocobalamina (derivato della vitamina B₁₂), di una classe di polichetidi noti per le loro proprietà citotossiche e della betaina 6-metilercinina – un composto con buone proprietà citotossiche contro le cellule cancerose HeLa della cervice uterina - (Afoullouss *et al.*, 2019).

1.1.2 Specie aliene marine come biorisorse

Il fenomeno delle invasioni biologiche viene innescato volontariamente o involontariamente dalle attività antropiche: gli interventi come la creazione di canali di connessione tra corpi d'acqua, la navigazione e l'acquacoltura possono fungere da meccanismi di introduzione, volontari o spesso involontari, di specie oltre il loro areale geografico naturale (Carlton e Ruiz, 2015). Queste specie, definite “*non indigene*” (*Non Indigenous Species*, NIS), hanno la potenzialità di diventare invasive (*Invasive Alien Species*, IAS). Per specie invasive si intendono quelle NIS che hanno popolazioni in grado di sostenere un ricambio generazionale autonomo nel corso dei diversi cicli di vita: producono prole riproduttiva, spesso in numero molto elevato anche al di fuori del loro sito di introduzione e hanno il potenziale per diffondersi su lunghe distanze (Richardson *et al.*, 2000; Pyšek *et al.*, 2004). Le IAS possono essere considerate come un sottoinsieme delle NIS che si sono consolidate e diffuse in un luogo, ma che dimostrano di essere in grado di diffondersi e stabilirsi altrove, causando effetti negativi a livello ambientale, economico o per la salute umana (Katsanevakis *et al.*, 2014; Pyšek *et al.*, 2020).

È importante puntualizzare che le NIS non possiedono la capacità intrinseca di avere un impatto negativo sulla biodiversità, sui servizi ecosistemici e sulla salute umana; di conseguenza, non tutte le NIS sono invasive. Addirittura, molte specie aliene, ormai stabilitesi nel non più nuovo ecosistema, possono avere impatti positivi come fonte di cibo per le specie indigene, come fornitrici di nuovi habitat o come competitori con altre specie aliene potenzialmente dannose evitando possibili esplosioni di popolazione (Simberloff *et al.*, 2013; Tsirintanis *et al.*, 2022).

Molti studi evidenziano gli effetti negativi causati dall'espansione di specie invasive non autoctone, come l'introduzione di parassiti (Boussellaa *et al.*, 2018), danni economici (Ünal *et al.*, 2015) e rischi per la salute (Galil, 2018). Allo stesso tempo, anche se raramente documentato, le specie non autoctone possono anche contribuire all'economia locale diventando potenziali biorisorse per la dimensione umana (Shackleton *et al.*, 2019). Questo è particolarmente evidente nel comparto alieutico, dove diversi studi hanno mostrato come alcune NIS – ad esempio, *Penaeus aztecus* Ives, 1981, *Upeneus moluccensis* (Bleeker, 1855), *Nemipterus randalli* Russell, 1986 - sostengono la piccola pesca artigianale nel bacino del Mediterraneo (Nuñez *et al.*, 2012; Michailidis *et al.*, 2019; Saygu *et al.*, 2020; Van Rijn *et al.*, 2020; El-Zrelli *et al.*, 2021).

Le tre specie di pesci marini invasivi *Lagocephalus sceleratus* (Gmelin, 1789), *Pterois miles* (Bennett, 1828) e *Fistularia commersonii* Rüppell, 1838 sono state analizzate per la presenza di

collagene e acidi grassi di interesse per una varietà di usi commerciali, presentando profili chimici distinti in ogni specie (Pappou *et al.*, 2023). L'alga invasiva nel Mediterraneo *Caulerpa racemosa* (Forsskål) J. Agardh, 1873 ha dimostrato ottime capacità di assorbimento e rimozione da soluzioni acquose del blu di metilene, un composto molto idrofilo che può risultare tossico per le forme di vita (Cengiz e Cavas, 2008).

1.2 Tunicati: tassonomia, morfologia e distribuzione

Il subphylum dei tunicati (Tunicata) o urocordati, appartenente al phylum dei cordati (Chordata) si suddivide in tre classi: Ascidiacea, Thaliacea e Appendicularia, con oltre 2000 specie di ascidie (Holland, 2016). I tunicati mostrano una variegata ecologia, con forme sessili, pelagiche, solitarie e coloniali. La classe delle ascidie (Ascidiacea) è caratterizzata sia da specie solitarie che da specie coloniali. Le ascidie solitarie sono presenti in svariati gruppi e, in generale, il fatto che un'ascidia sia solitaria o coloniale non è indicativo dell'appartenenza a un preciso gruppo. Le ascidie solitarie sono state a lungo considerate parenti stretti dei molluschi a causa delle loro somiglianze morfologiche nella vita adulta, in particolare per la presenza di una massa globulare che circonda una struttura priva di rigidità (Karaïskou *et al.*, 2015; Krasovec *et al.*, 2021). I primi importanti indizi riguardanti la vera natura delle ascidie derivano da osservazioni non sulla vita adulta, bensì su quella larvale. Già nel diciannovesimo secolo sono state descritte le larve di *Ciona intestinalis* (Linnaeus, 1767) e *Phallusia mammillata* (Cuvier, 1815) come simili nell'organizzazione strutturale ai cordati (Figura 1).

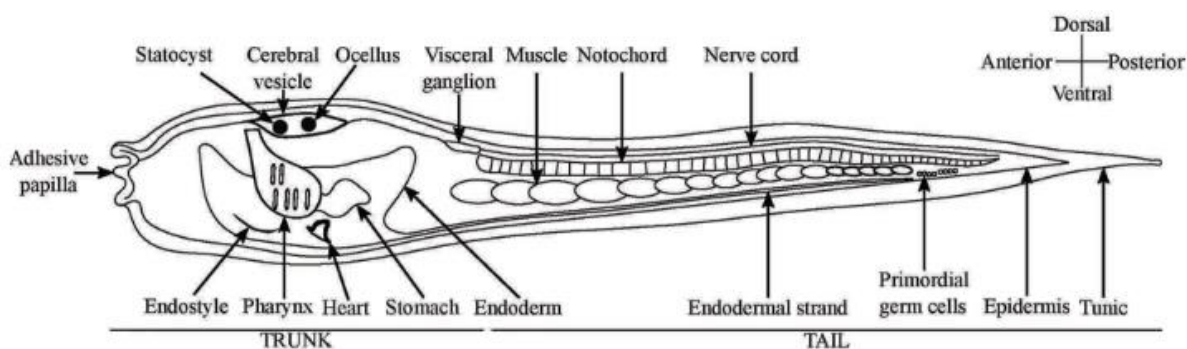


Figura 1. Modello anatomico di larva di ascidia (da Krasovec *et al.*, 2021).

In particolare, la presenza di una notocorda dorsale nelle larve natanti ha portato a considerare i cordati come composti da tre gruppi: tunicati (comprendenti le ascidie solitarie), cefalocordati (come

il genere *Amphioxus*) e vertebrati. Lo sviluppo di tecniche molecolari, del sequenziamento genetico e delle analisi statistiche ha permesso di identificare i tunicati come *sister group* dei vertebrati, definendo questi organismi come gli esseri viventi più imparentati ai vertebrati (Delsuc *et al.*, 2006) (Figura 2). In quanto affini ai vertebrati, il loro studio ha permesso di far luce sulla comprensione dello sviluppo ed evoluzione dei cordati (Lemaire *et al.*, 2008; Noriyuki e Jeffery, 1995). Mentre la posizione filogenetica dei tunicati sembra essere consolidata, esistono ancora dibattiti per quanto riguarda le relazioni all'interno del gruppo; tuttavia è possibile delineare sulla base della letteratura un albero filogenetico con il maggiore consenso (Figura 2). Sulla base dell'attuale filogenesi i tunicati si suddividono in tre classi principali: Appendicularia, Thaliacea e Ascidiacea, di cui quest'ultimo in particolare include gli ordini Phlebobranchia, Aplousobranchia e Stolidobranchia. La classe Appendicularia è caratterizzata da uno stile di vita pelagico e probabilmente si posiziona come *sister group* delle altre classi, che formano un clade monofiletico.

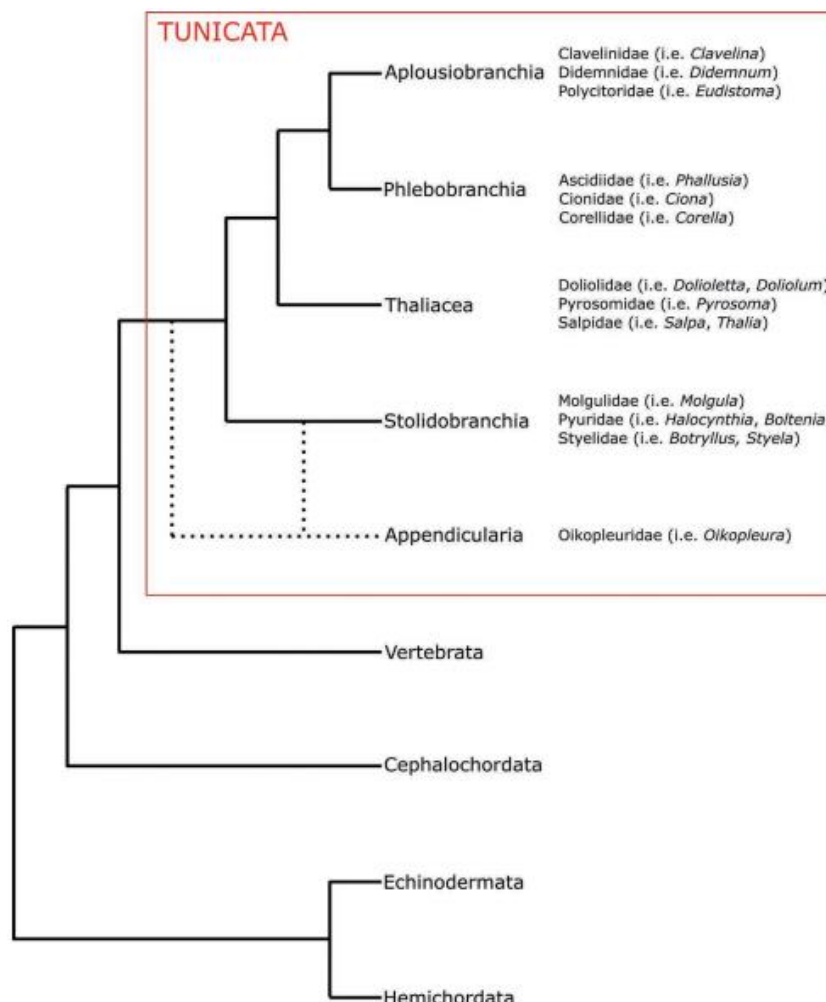


Figura 2. Cluster filogenetico dei tunicati (Krasovec *et al.*, 2021).

I Taliacei, incluse le salpe (famiglia Salpidae), sono esclusivamente pelagici e formano colonie planctoniche di svariati individui. Le ascidie (classe Ascidiacea), nonostante la loro diversità, presentano caratteristiche morfologiche e fisiologiche comuni (Figura 3); generalmente di forma globosa, presentano un sifone inalante all'estremità apicale e uno esalante laterale per garantire la circolazione dell'acqua, una faringe supportata da un endostilo e, infine, un grande cestello branchiale. Negli ordini Stolidobranchia e Phlebobranchia, sono presenti sia specie solitarie che coloniali, mentre nell'ordine degli Aplousobranchia sono incluse forme esclusivamente coloniali, che costituiscono il maggior numero di specie. In questi ultimi tre gruppi gli adulti sono sedentari e vivono adesi a un substrato. L'ordine Stolidobranchia è caratterizzato dalla presenza di un paio di gonadi e di un atrio formato da un'indentazione unica, nonché da un cestello branchiale ripiegato; rappresentanti di questo phylum sono ascidie coloniali come *Botryllus schlosseri* (Pallas, 1766), ma non mancano le specie solitarie.

Phlebobranchia e Aplousobranchia presentano un numero pari di gonadi e l'atrio è formato da due indentazioni. Il cestello branchiale degli Phlebobranchia presenta vascolarizzazioni longitudinali, mentre negli Aplousobranchia presenta un'anatomia più semplificata.

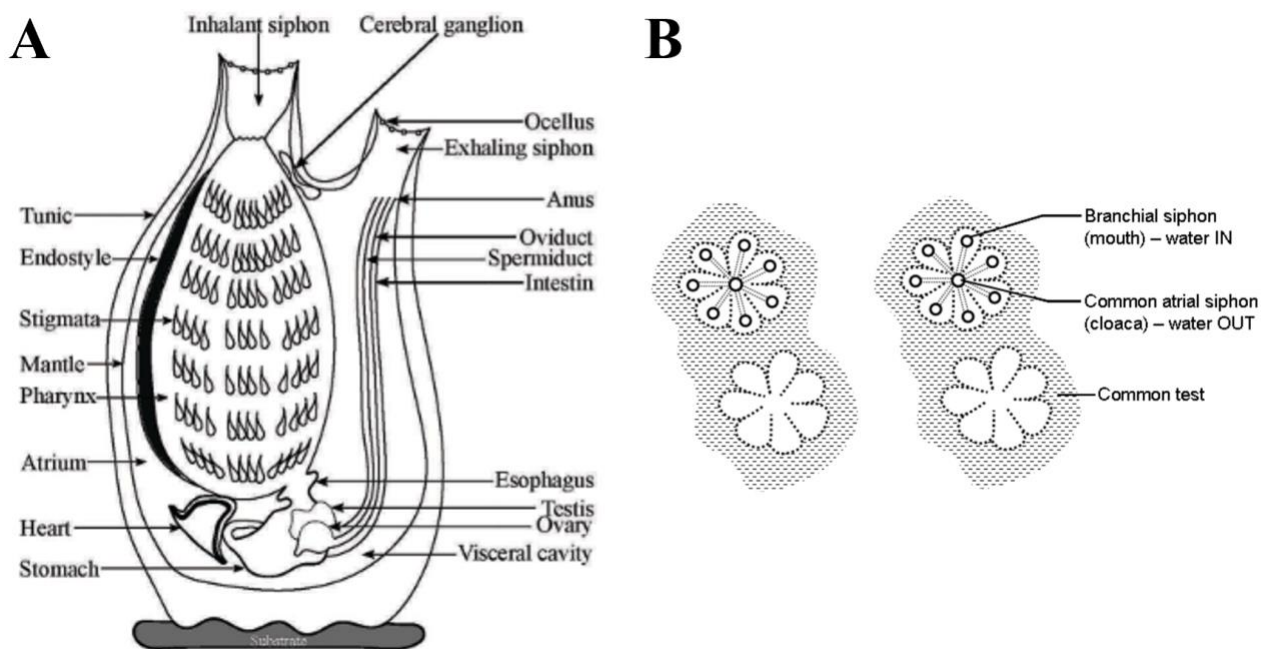


Figura 3. (A) Modello anatomico generico di ascidia solitaria adulta (Krasovec et al., 2021) (B) modello anatomico generico di ascidia coloniale.

In generale, che siano coloniali o solitarie, le ascidie sono organismi filtratori, bentonici e sessili, che popolano varie tipologie di substrato: fondali sabbiosi e rocciosi, nonché altri animali o piante. Sono specie presenti in modo ubiquitario nelle acque di tutto il mondo, dai mari più profondi e freddi come quelli oceanici, ad acque meno profonde come quelle di porti, lagune e località costiere. Questi organismi sono in grado di colonizzare molto rapidamente qualsiasi tipo di substrato solido, sia esso artificiale o naturale, trovando maggiori opportunità di sviluppo negli ecosistemi caratterizzati da una bassa biodiversità, come laghi costieri, lagune, porti e allevamenti di molluschi (Palanisamy *et al.*, 2018). Questi animali possono aderire facilmente a superfici solide di diversa natura, come moli galleggianti e chiglie di navi, resistendo a importanti variazioni nelle condizioni ambientali in cui si trovano, il che facilita la loro diffusione nei mari di tutto il globo (Lambert, 2007). In quanto animali filtratori, la loro alimentazione è costituita principalmente da fitoplancton, zooplancton e particelle organiche sospese nella colonna d'acqua; in questo modo sono in grado di influenzare e controllare la produzione di fitoplancton, assumendo un ruolo importante all'interno della catena alimentare marina (Ramesh *et al.*, 2021). Un'ascidia è in grado di filtrare giornalmente centinaia di litri di acqua e di raccogliere e concentrare nel proprio flusso sanguigno diverse tipologie di elementi e composti presenti in sospensione nella colonna d'acqua, compresi i metalli pesanti (Lebar *et al.*, 2011; Odate e Pawlik, 2007; Roveta *et al.*, 2021; Tzafiriri-Milo *et al.*, 2019). Sono, inoltre, noti per possedere un forte sistema immunitario.

Un'ulteriore caratteristica comune che lega tutte le specie di tunicati (e che dà il nome a questi animali) è la presenza di un rivestimento esterno semirigido, chiamato *tunica*, che ne ricopre l'intero corpo. La tunica, più o meno spessa, liscia o rugosa a seconda della specie, è costituita in parte maggioritaria dalla *tunicina*, un materiale composito formato da una matrice proteica, a cui si legano fibrille di cellulosa caratterizzate da una particolare forma nanocristallina (Kimura e Itoh, 2004). Ad oggi, i tunicati, sono noti per essere gli unici organismi appartenenti al regno animale in grado di produrre cellulosa (Zhao e Li, 2014). La tunica è in grado di svolgere diverse funzioni: attraverso essa l'animale è in grado di ancorarsi a superfici solide ed è l'organo che svolge l'attività di protezione, costituendo una vera e propria barriera fisica che protegge i tessuti interni dagli attacchi di predatori e può, in aggiunta, esercitare attività di fagocitosi e bioluminescenza (Figura 4) (Hirose *et al.*, 2009).

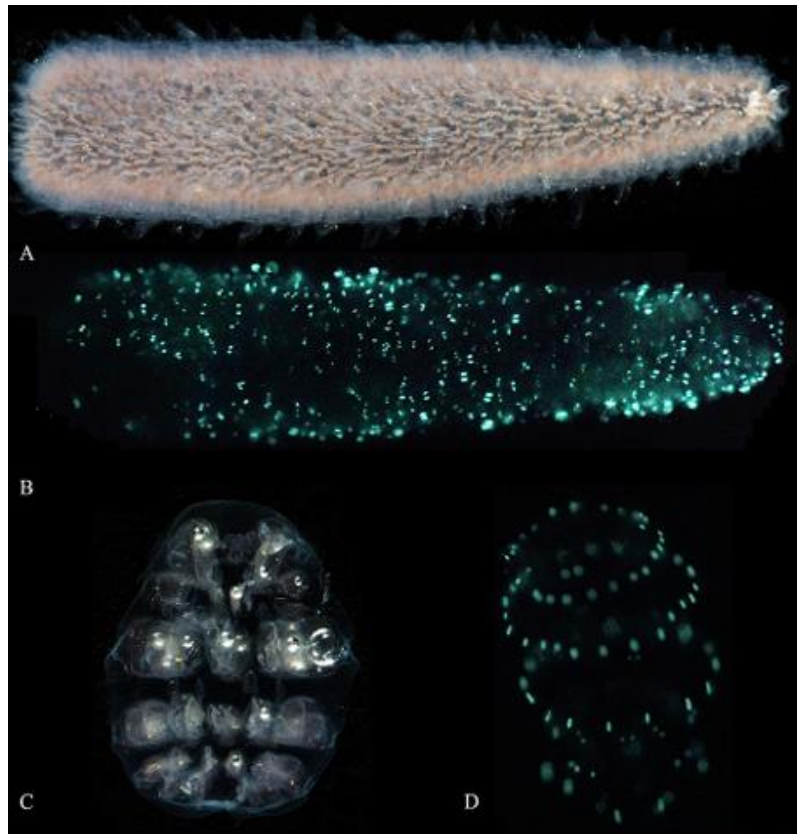


Figura 4. *Pyrosoma atlanticum* Péron, 1804 (A, B) e *Pyrosomella verticillata* Neumann, 1909 (C, D), due taliacei dall'Atlantico brasiliano sudorientale mentre producono bioluminescenza (Tessler et al., 2020).

All'interno della tunica sono racchiusi gli organi interni dell'animale comprendenti: cuore, gonadi, sistema nervoso e tubo digerente (Figura 3). Il tubo digerente presenta alle estremità due aperture, attraverso le quali si genera un flusso unidirezionale di acqua.

Ad un'estremità del tubo digerente si individua un sifone inalante, attraverso il quale l'animale introduce al suo interno l'acqua e i nutrienti di cui necessita; all'estremità opposta si trova il sifone esalante mediante il quale si verifica l'espulsione dell'acqua filtrata, delle feci, degli spermatozoi e delle uova. L'acqua in ingresso al sifone inalante passa attraverso la faringe, una struttura caratterizzata dalla presenza di numerose fessure, dette “*stigma*”. In corrispondenza delle fessure sono presenti particolari cellule ciliate, in grado di secernere il muco che intrappola al suo interno il cibo di cui necessita l'animale. L'acqua filtrata attraversa quindi gli stigma e fuoriesce dal sifone esalante (Krasovec et al., 2021).

Le ascidie sono animali ermafroditi e gli organi responsabili della riproduzione sono separati e contenuti all'interno della tunica; i cicli di riproduzione sono fortemente influenzati da fattori come temperatura e salinità dell'acqua (Burighel e Clony, 1997). L'organismo può riprodursi sia per via

sessuata che asessuata (Figura 5) e genera delle larve dotate di coda e liberamente natanti per poche ore, fino ad un massimo di due giorni. Durante lo stadio larvale, l'individuo ha il solo obiettivo di depositarsi su un substrato determinando l'inizio di un processo di metamorfosi che porterà alla perdita della coda; la metamorfosi terminerà con la formazione dell'individuo adulto. Gli adulti sessili saranno soggetti a variazioni di temperatura e salinità dell'acqua circostante; lo stadio larvale rappresenta quindi un momento chiave nella vita di un tunicato (Shenkar e Swalla, 2011).

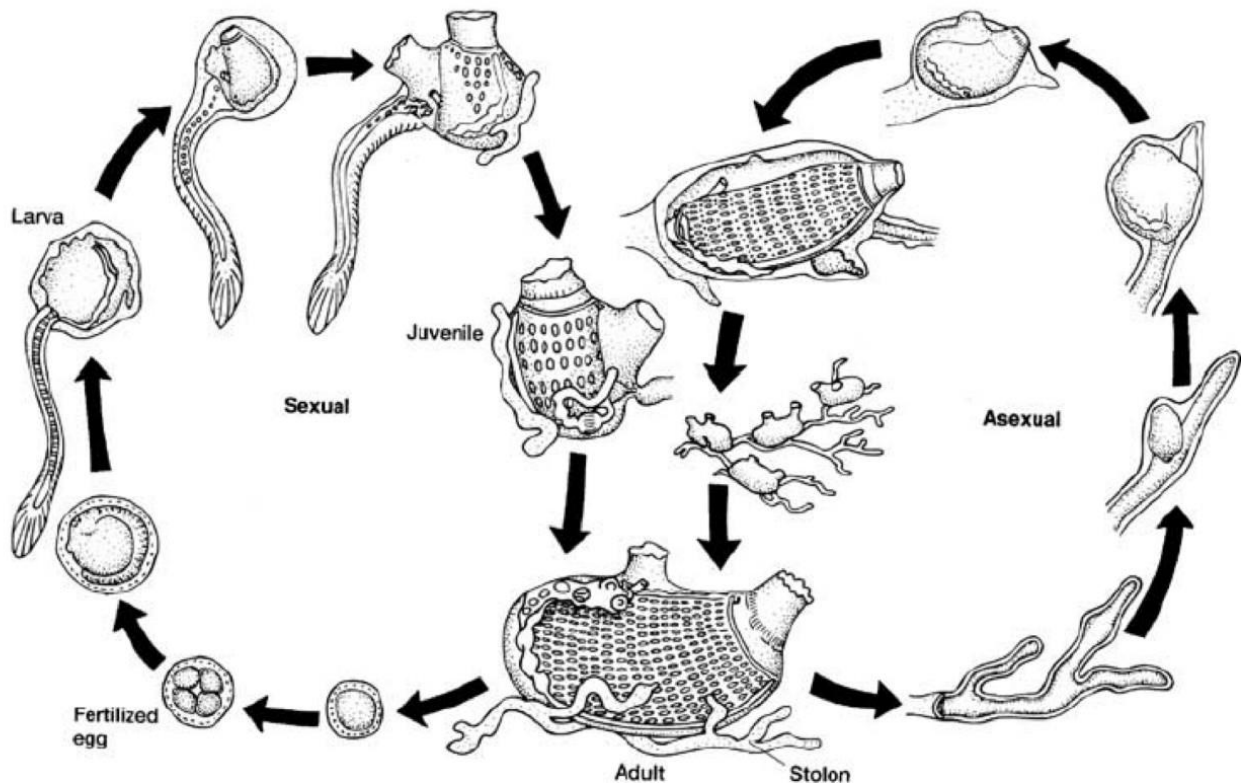


Figura 5. Schema del ciclo riproduttivo di ascidie solitarie (Swalla, 2006).

I tunicati, oltre alla presenza della tunica, non presentano un vero e proprio sistema di difesa fisica verso l'attacco di predatori esterni e parassiti; se minacciati, però, sono in grado di espellere rapidamente un getto d'acqua dai sifoni. Sono inoltre in grado di rilasciare tossine per difendersi dagli attacchi di predatori e di produrre metaboliti secondari e alcaloidi con funzioni antivegetative (Palanisamy *et al.*, 2018; Ramesh *et al.*, 2021). La produzione di metaboliti secondari ha un fondamentale ruolo difensivo verso attacchi di predatori, parassiti, alghe e radiazioni UV. È possibile osservare in natura un cospicuo quantitativo di ascidie caratterizzate da una tunica priva di epibionti, a dimostrazione del fatto che questi organismi sono in grado di sviluppare ed instaurare particolari difese di tipo chimico (Ramesh *et al.*, 2021).

Un secondo meccanismo di protezione proposto è quello basato sull'accumulo di sostanze acide, tossine e metalli pesanti, tra cui il vanadio (molto comune tra le specie appartenenti all'ordine dei Phlebobrancha), sotto forma di composti che rendono l'animale inappetibile, scoraggiando così l'attacco di eventuali predatori (Levert *et al.*, 2021; Lindquist *et al.*, 1992). Proprio in virtù della loro capacità di accumulare metalli pesanti, vengono utilizzati come bioindicatori ambientali (Aydın-Önen, 2016).

1.2.1 Tunicati e bioinvasione

Negli ultimi decenni, le acque marine costiere sono diventate tra gli habitat più invasi a livello globale e le ascidie sono tra gli invasori più noti in questi ecosistemi (Zhan *et al.*, 2015). Le ascidie invasive hanno causato danni ecologici ed economici significativi negli habitat colonizzati (Lambert, 2007; Ramsay *et al.*, 2008; Switzer *et al.*, 2011; Giachetti *et al.*, 2020). A causa della loro diffusione globale, dei frequenti focolai demografici e degli impatti ecologici ed economici negativi associati, le ascidie invasive sono diventate un problema globale (Lambert, 2007; Bullard e Carman, 2009; Mead *et al.*, 2011). Finora, le coste di tutti i continenti risultano essere invase dalle ascidie. Recentemente, persino l'Antartide è segnalato come continente ricevente (McCarthy *et al.*, 2019); inoltre, alcune ascidie invasive derivano dalla provincia biogeografica antartica, come *Corella eumyota* Traustedt, 1882 (Lambert, 2004).

Il Mar Mediterraneo è considerato tra i mari più invasi al mondo, con le ascidie annoverate fra gli invasori più comuni in ambiente portuale o presso impianti di acquacoltura (Tsirintanis *et al.*, 2022). Sono molteplici le NIS presenti nel bacino del Mediterraneo, sia solitarie (ad esempio *Styela plicata* (Lesuer, 1823), *Ciona robusta* Hoshino & Tokioka, 1967, *Microcosmus squamiger* Michaelsen, 1927 e *Microcosmus exasperatus* Heller, 1878) che coloniali (*Botrylloides niger* Herdman, 1886, *B. giganteus* (Pérès, 1949), *Aplidium constellatum* (Verrill, 1871), *Didemnum vexillum* Kott, 2002). Tra le segnalazioni più recenti è possibile citare l'arrivo dell'ascidia solitaria *Styela clava* Herdman, 1881, originaria del Nord-Est dell'Oceano Pacifico, nella laguna di Venezia (Mastrototaro *et al.*, 2022); la sua reale distribuzione rimane, però, ancora sconosciuta, perché spesso identificata erroneamente.

Uno dei motivi dietro a tale distribuzione ubiquitaria e invasività è la capacità delle larve, liberamente natanti, di insediarsi su variegate tipologie di substrato, dai sedimenti più morbidi sino alle rocce, ai coralli o ai bivalvi, nonché su strutture di origine antropica, come accade in zone portuali (Zhan *et*

al., 2015). In particolare, la loro capacità di aderire a strutture antropiche, come gli scafi delle navi, ha portato ad un'espansione geografica forzata (involontariamente) dall'uomo di alcune specie nei porti di tutto il mondo; di conseguenza, considerando la loro elevata adattabilità, risulta difficile in alcuni casi capire se una specie sia indigena, ubiquitaria o importata dall'uomo (Essl *et al.*, 2018; Katsanevakis e Moustakas, 2018).

Inoltre, considerando che le ascidie non si disperdono autonomamente su grandi distanze e che la loro dispersione su larga scala è dunque attribuibile principalmente ai trasferimenti mediati da umani, esse rappresentano un sistema unico per studiare l'influenza della dispersione mediata dall'uomo rispetto a quella naturale nelle specie invasive marine (Teske, 2014). Ricerche recenti hanno chiarito le cause e le conseguenze delle invasioni come le fonti di invasione (Dupont *et al.*, 2010; Rius e Shenkar, 2012), la diffusione post-stabilimento, i vettori associati (Dijkstra *et al.*, 2007) e le modalità di dispersione delle ascidie (Therriault e Herborg Therriault, 2008; Zhan *et al.*, 2012, 2015).

Ecologicamente, le ascidie invasive competono per il substrato riducendo la ricchezza di specie e alterando la biodiversità (Aldred e Clare 2014). Ad esempio, la ricchezza di specie invertebrate nella baia di San Francisco è inversamente correlata con l'abbondanza di *C. intestinalis*, con alcune specie diventate rare nelle comunità dominate da questa ascidia (Blum *et al.*, 2007). Le modifiche agli habitat bentonici possono anche influire sulle proprietà biotiche e abiotiche degli ecosistemi, come nel caso delle dense colonie di *D. vexillum*, che fungono da barriere fisiche influenzando lo scambio di ossigeno disciolto nell'acqua e il ciclo geochimico (Locke *et al.*, 2009). In futuro è prevedibile che i cambiamenti climatici potranno giocare un ruolo fondamentale sull'espansione di areale di invasione delle ascidie su scala globale e che aree come le Americhe, l'Europa e il Pacifico occidentale sono a rischio di nuove invasioni (Zhang *et al.*, 2020).

1.2.2 Impatti negativi causati dall'invasione di Tunicati

Molti studi indicano le ascidie come organismi infestanti e talvolta dannosi per l'ambiente in quanto molte loro specie sono invasive (Dijkstra *et al.*, 2007; Lambert, 2007; Lutz-Collins *et al.*, 2009; Palanisamy *et al.*, 2018). Alcune risultano essere dannose anche dal punto di vista economico in quanto la loro crescita causa problemi a imbarcazioni, strutture sommerse e allevamenti di acquacoltura. Infatti, le ascidie costituiscono uno dei maggiori gruppi di animali bentonici e sono tra

i principali componenti del *biofouling*, ovvero la biocenosi di organismi incrostanti i substrati duri sommersi (come scafi di barche, pilastri e banchine) (Adams *et al.*, 2011; Fletcher *et al.*, 2013).

Attaccandosi agli scafi delle imbarcazioni, le ascidie e più in generale il *biofouling* (Figura 6) è in grado, ad esempio, di ridurre la velocità e aumentare i consumi di carburante (Schultz *et al.*, 2011). Per lo stesso motivo, le ascidie danneggiano fortemente anche l'industria dell'acquacoltura, come nel caso della mitilicoltura, dove provocano danni per decine di milioni di dollari infestando gli allevamenti di mitili (Soliman e Inglis, 2018). Infatti, in quanto filtratori e parassiti bio-incrostanti, le ascidie influenzano negativamente le operazioni di acquacoltura dei molluschi, recando danno sia direttamente ai bivalvi allevati che alle attrezzature da coltivazione con conseguenze socioeconomiche negative (Lambert, 2007; Ramsay *et al.*, 2008; Palanisamy *et al.*, 2018).

Solitamente, le ascidie invasive riducono il raccolto e aumentano i costi di produzione a causa della competizione per le risorse e lo spazio con le specie allevate (Fitridge *et al.*, 2012; Mckindsey *et al.*, 2007; Robinson, 2005). Ad esempio, l'invasione e la crescita della popolazione di *S. clava* nel Canada orientale ha causato una perdita fino al 50% della raccolta di molluschi (Colautti *et al.*, 2006). Una stima per il controllo delle specie incrostanti, tra cui molte ascidie in acquacoltura, varia dal 5 al 10 % dei costi di produzione, equivalenti a 1,5-3 miliardi di dollari all'anno (Fitridge *et al.*, 2012).

A causa di questi effetti, in gran parte negativi, i governi attuano programmi di controllo e/o eradicazione, che comportano ulteriori costi significativi. Ad esempio, il costo associato ai tentativi di eradicazione di *D. vexillum* a Shakespeare Bay, in Nuova Zelanda, è stato di 650.000 dollari, senza arrivare ad eliminare la specie. La stessa specie in Mar Mediterraneo ha avuto un impatto negativo sulla biodiversità locale alterando le comunità bentoniche (Lambert, 2009). Nel 2005 1.000.000 di dollari sono stati stanziati dal governo canadese e dall'industria dell'acquacoltura dell'Isola del Principe Edoardo per la ricerca e il monitoraggio delle ascidie invasive nel Canada atlantico (Coutts e Forrest, 2007). Le specie *M. squamiger* e *M. exasperatus* sono considerate tra le ascidie solitarie più invasive in assoluto: probabilmente di origine australiana, hanno invaso diverse parti del mondo compreso il bacino mediterraneo (Narajo *et al.*, 1996; Mastrototaro e Dappiano, 2008; Gewing *et al.*, 2016). Queste specie possono formare densi agglomerati che contrastano le specie autoctone nelle comunità di acque poco profonde, costituendo una minaccia per le comunità litoranee (Turon *et al.*, 2007). Un *bloom* – ovvero una forte esplosione di popolazione - della specie *Clavelina oblonga* Herdman, 1880 è stato osservato nel 2011 in Spagna, causando la perdita di quasi tutto il novellame di cozze (Ordóñez *et al.*, 2016). Nel Mediterraneo sono presenti anche specie con carattere invasivo di recente ritrovamento (come *Botrylloides violaceus* Oka, 1927, *B. giganteus*, *B. niger* e *B. anceps* (Herdmann, 1891) e *Polyclinum constellatum* Savigny, 1816) ma sono ancora pochi gli studi che

evidenziano il loro eventuale impatto economico e, ancor meno, quello ambientale (Halim e Messeih, 2016; Brunetti e Mastrototaro, 2017; Reem *et al.*, 2017; Montesanto *et al.*, 2022).



Figura 6. Comunità di biofouling su una briccola di legno (Chioggia, Giugno 2023). Crediti: Dr. Salvatore Coco.

1.3 Tunicati nell'industria

Le ascidie, considerate le loro capacità di riproduzione, di crescita e di sopravvivenza superiori rispetto a quelle di altri organismi come spugne, alghe, capesante, cozze e ostriche (Bakker *et al.*, 2011; Switzer *et al.*, 2011; Tyrrell e Byers, 2007), sono una delle specie incrostanti più dominanti in tutto il mondo. Questa caratteristica le rende abbondanti potenziali risorse per la produzione di energia, di materiali e di sostanze chimiche. Inoltre, le ascidie solitarie hanno fornito un grande contributo al progresso scientifico in svariati ambiti: da quello cellulare a quello medico, fino a rappresentare modelli di studio per la biologia marina, come *C. intestinalis*, o modelli per la biologia dello sviluppo, come *Ascidella aspersa* (Müller, 1776).

1.3.1 Industria alimentare

Esistono circa 481 specie di tunicati solitari appartenenti alla famiglia delle Styelidae e delle Pyuridae (Shenkar e Swalla, 2011) (Ordine Stolidobranchia) che vengono considerate edibili e tradizionalmente consumate (ad esempio in Corea, Giappone e Cile) sia essiccati che freschi (Park *et al.*, 1991; Davis, 1995; Oh K-S, 1997; Lambert, 2016). Delle ascidie sono considerati edibili solo i tessuti contenuti all'interno della tunica e, generalmente, vengono raccolte direttamente in natura oppure vengono allevate (Lambert, 2016). Le specie di più comunemente allevate a fini alimentari sono: *Halocynthia aurantium* (Pallas, 1787), *Halocynthia roretzi* (Drasche, 1884), *Microcosmus hartmeyeri* Oka, 1906, *Molgula vulgaris* Forbes, 1848, *Polycarpa pomaria* (Savigny, 1816), *S. clava*, e *S. plicata*.

Il metodo di coltivazione più diffuso è quello delle *long-line*, lunghe corde sommerse sostenute da boe e pesi in acque poco profonde (Figura 7). Storicamente, il primo allevamento di tunicati (*H. roretzi*) nacque nel 1982 in Corea, seguito, nel 2002, dalla nascita di allevamenti di *H. roretzi* e *S. clava* in Giappone (Lambert *et al.* 2016). È tradizione, inoltre, trovare tra i banchi dei mercati locali in Cile esemplari di *Pyura chilensis* Molina, 1782 essiccati (Davis, 1995).



Figura 7. (A) Un sashimi di *Halocynthia roretzi*; (B) un'imbarcazione giapponese durante la raccolta di *H. roretzi* in un impianto di allevamento; (C) *Pyura chilensis* essiccata senza tunica in un mercato cileno.

Nella cultura mediterranea, per quanto l'arte marinara e del consumo di prodotti derivati dal mare sia radicata, non è uso consumare tunicati. Tuttavia, in alcuni paesi (Italia, Francia e Grecia) alcune specie appartenenti al genere *Microcosmus* vengono consumate e vendute con nome generico di "Limone di Mare" (Lambert, 2016; Grano, 2024). Le specie in questione sono *M. sabatieri* Roule, 1885 e *M. vulgaris* Heller, 1877 e vengono comunemente consumate fresche in seguito alla cattura in ambiente naturale (Figura 8) poiché nel Mediterraneo non esistono allevamenti di tunicati a scopo commerciale.

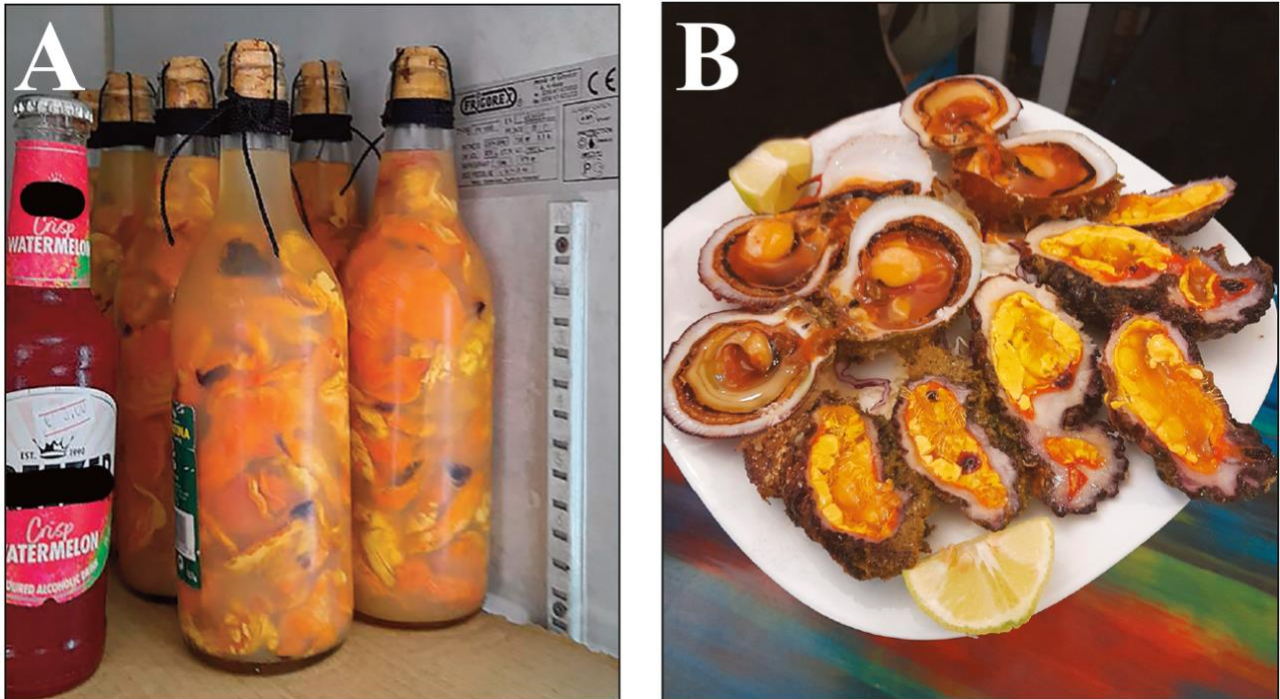


Figura 8. L'immagine mostra due esempi di vendita e consumo della specie *Microcosmus sabatieri*. (A) Bottiglia di vetro in vendita contenente la parte edibile dell'ascidia; (B) mostra un piatto servito in un ristorante a Chorio, Isola di Kalymnos (Grecia) (Grano, 2024).

Diversi studi hanno dimostrato che i tessuti interni delle ascidie sono ricchi di proteine e di aminoacidi essenziali (Zhao e Li, 2016; Palanisamy *et al.*, 2017; Watters, 2018), con un buon contenuto di acidi grassi e un basso contenuto calorico (Lee *et al.*, 1995; Choi *et al.*, 2006; Meenakshi, 2009; Kang *et al.*, 2011). Studi su *Ciona intestinalis*, *Styela plicata* e *Microcosmus exasperatus* hanno dimostrato il loro potenziale ruolo come risorsa biologica per i lipidi ricchi di acidi grassi omega-3 (n-3), con un'eccellente qualità dei valori di acido eicosapentaenoico (EPA) e acido docosaesaenoico (DHA) e un elevato rapporto n-3/n-6 (Hassanza-deh, 2014; Zhao *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2016). Inoltre, i valori nutrizionali di *C. intestinalis* e *H. roretzi* li rendono sfruttabili nella formulazione di mangimi per animali (Gao *et al.*, 2023; Samuelsen *et al.*, 2022).

È stato infatti dimostrato che il profilo degli acidi grassi di queste specie è simile a quello dell'olio di pesce ed è quindi considerato una sua alternativa nella formulazione di mangimi per animali o integratori per il consumo umano (Hassanzadeh, 2014).

1.3.2 La Tunicina e le sue applicazioni industriali

Una peculiarità che contraddistingue tutte le specie di tunicati risiede nella loro abilità di produrre ed accumulare all'interno della loro tunica un materiale composito, la *tunicina*, composto da cellulosa in forma cristallina legata a proteine, lipidi, glicani e mucopolisaccaridi (Lv et al., 2023).

I tunicati sono gli unici organismi animali in grado di sintetizzare, per via enzimatica, cellulosa; questa caratteristica li rende animali unici, suscitando nella comunità scientifica un crescente interesse per lo studio di questi organismi marini (Zhao et al., 2014). La cellulosa è un biopolimero ad alto peso molecolare, costituito dalla ripetizione di unità di D-(+) -glucopiranosio legate tra loro da un legame glicosidico β -1,4 (Figura 9).

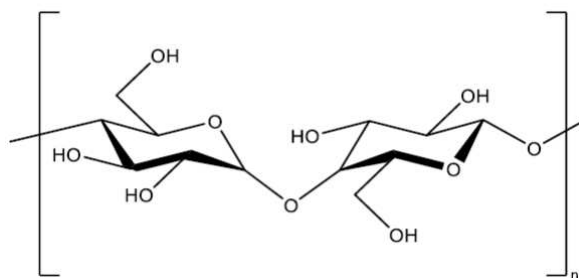


Figura 9. Struttura chimica della cellulosa.

Il numero di unità ripetitive costituenti la catena di cellulosa può arrivare fino a 20.000, portando a catene polimeriche lineari ad elevato peso molecolare. La cellulosa è il biopolimero presente in maggiori quantità sul pianeta Terra ed è facilmente ricavabile da biomasse considerabili sostanzialmente inesauribili. Sebbene i materiali lignocellulosici di origine vegetale siano una fonte primaria ubiquitaria da cui estrarre la cellulosa in grandi quantità, altri organismi possono essere sfruttati per la produzione ed estrazione di questo biopolimero; tra gli esseri viventi in grado di produrre cellulosa si identificano: alghe, batteri e tunicati (Ghasemlou et al., 2021).

La cellulosa individuata all'interno dei tunicati presenta una struttura chimica identica a quella ottenuta da fonti tradizionali come il legno. Il vantaggio dell'utilizzo dei tunicati per l'estrazione di cellulosa risiede nell'assenza di emicellulose e lignina, composti tipicamente presenti in elevate percentuali all'interno di materiali lignocellulosici. La cellulosa derivante da tunicati, proprio a causa dell'assenza di emicellulose e lignina, può essere estratta con un'elevata purezza e grado di cristallinità, impiegando processi di estrazione e purificazione meno drastici e dispendiosi rispetto a quelli impiegati nel trattamento di materiali vegetali. All'interno delle ascidie la cellulosa viene prodotta da enzimi presenti nelle membrane cellulari della tunica attraverso meccanismi non ancora del tutto chiariti (Zhao *et al.*, 2014; Lv *et al.*, 2023).

La cellulosa ottenuta da ascidie si presenta sotto forma di microfibrille che si aggregano mediante l'instaurazione di forti legami a ponte idrogeno inter- ed intracatena per formare fibrille più grandi, con dimensioni e diametro che dipendono e variano fortemente a seconda della specie analizzata (Zhao *et al.*, 2014). Le microfibrille sono caratterizzate dalla presenza di cellulosa con fase cristallina I β , termodinamicamente stabile e prodotta tipicamente da tunicati, da alberi e piante appartenenti al genere *Gossypium* (cotone). L'instaurarsi di interazioni tra microfibrille di cellulosa (di larghezza tra i 3.5 ed i 5 nm), porta alla formazione di fibrille aventi diametro compreso tra i 10 ed i 13 nm e con lunghezze molto variabili e comprese tra i 100 nm fino ad alcuni micrometri (Lin *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2014).

Le fibre di cellulosa possono interagire con proteine strutturali naturalmente presenti all'interno della tunica, instaurando legami con residui amminioacidici tipo serina, treonina ed altri amminioacidi dotati di un gruppo idrossido (-OH) come catena laterale, formando strutture che conferiscono alla tunica integrità e rigidità (Zhao *et al.*, 2014; Hassanzadeh, 2014).

Rispetto al polimero ottenibile da fonti vegetali, la nanocellulosa proveniente dai tunicati presenta un più alto grado di purezza, pesi molecolari più elevati, un indice di polidispersione inferiore (quindi una distribuzione dei pesi molecolari più uniforme), una maggiore trasparenza ottica, oltre a fibre con un'elevata resistenza alla trazione e un elevato modulo elastico, un più elevato grado di cristallinità e un più alto rapporto lunghezza/diametro (Lv *et al.*, 2023).

Inoltre, l'ottenimento di cellulosa da tunicati non richiede lo sfruttamento di foreste e terreni agricoli (Zhao *et al.*, 2014). Grazie a queste caratteristiche la nanocellulosa ottenuta da tunicati può trovare applicazioni in ambito biomedico, per la produzione di film antimicrobici, nella *drug delivery*, nella produzione di film trasparenti, nell'industria della carta, delle fibre e di tessuti innovativi nonché per

la produzione di componenti elettronici, batterie e polimeri elettroattivi (Moon *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2014).

Sono stati riportati alcuni esempi di applicazione della cellulosa nanocristallina in impianti medicali intracorticali per il rilascio di curcumina (Potter *et al.*, 2014), nelle formazioni di film per la produzione di materiali ingegneristici ad alte prestazioni (Moon *et al.*, 2011) e in ambito alimentare nella formazione di film multistrato con controllate proprietà meccaniche (Huang *et al.*, 2021).

Infine, grazie alla struttura della tunica delle ascidie, questa può essere scomposta per ricavarne gli zuccheri necessari alla produzione di bioetanolo (Hrůzová, 2020).

1.3.3 Applicazioni mediche e farmacologiche

Nel ventennio tra il 1994 e il 2014 dalle ascidie sono stati isolati 580 composti differenti, offrendo un'importante opportunità di identificare molecole con proprietà terapeutiche per le malattie umane. Oltretutto, gli embrioni delle ascidie sono stati utilizzati come modello sperimentale per studiare la tossicità di vari composti nello sviluppo neurale (Dumollard *et al.*, 2017; Palanisamy *et al.*, 2017).

È stato dimostrato che le ascidie sono in grado di produrre una grande varietà di metaboliti secondari con potenziali proprietà terapeutiche utilizzabili nella medicina (Ryu & Kim, 2014), grazie alle loro plurime attività biologiche quali citotossicità, attività antibiotica e immunodepressiva, inibizione della topoisomerasi (enzima importante nel metabolismo del DNA come catalizzatore dei suoi cambiamenti topologici) e delle chinasi ciclina-dipendenti (fondamentali per la regolazione del ciclo cellulare) (Durán *et al.*, 1998).

Tra questi composti è importante citare la trabectedina o ecteinascidina, isolata da *Ecteinascidia turbinata* Herdman, 1880 e utilizzata come farmaco antitumorale per trattare alcune forme di sarcoma e tumore ovarico (Gordon *et al.*, 2016). All'interno di una specie di tunicati del Mar Mediterraneo, *Aplidium albicans* (Milne Edwards, 1841), è stato isolato e identificato il composto noto con il nome commerciale di Aplidin® (o plitepsidina o dehydrodidemnin B), un depsipeptide ciclico, appartenente alla famiglia delle didemnine. La molecola esibisce attività antivirali, antitumorali nel trattamento del cancro al seno ed è in grado di indurre l'apoptosi in colture di cellule di carcinoma renale umano (Varona *et al.*, 2021; Ramesh *et al.*, 2021); inoltre, ha fornito risultati incoraggianti nel trattamento del mieloma (Delgado-Calle *et al.*, 2019; Krasovec *et al.*, 2021).

Potenziali e promettenti composti con attività antitumorale, come i composti pro-apoptotici, ricavati da prodotti naturali delle ascidie, sono stati riscontrati anche per le specie del Mediterraneo: in particolare, sono state descritte alcune nuove molecole dotate di attività antiproliferativa o citotossica ricavate sia da ascidie solitarie della famiglia Ascidiidae e Pyuridae (*Ascidia mentula* Müller, 1776, *Microcosmus vulgaris* Heller, 1877, *Halocynthia papillosa* (Linnaeus, 1767)) e specie coloniali della famiglia Polyclinidae (*Sidnyum turbinatum* (Savigny, 1816)) (Menna, 2009).

Si evidenzia inoltre l'isolamento di turbinamide – metabolita che ha mostrato elevata citotossicità specifica contro le cellule del glioma, uno dei tumori più aggressivi - da *S. turbinatum*, una rara ascidia coloniale raccolta nel Golfo di Napoli (Menna, 2009). Questi risultati evidenziano il ruolo altamente significativo che i prodotti naturali derivanti dalle ascidie del Mediterraneo potrebbero svolgere nella scoperta e nel processo di sviluppo di nuovi farmaci antitumorali.

Uno studio condotto da Silva *et al.* (2020) ha evidenziato che il glicosamminoglicano solforato ricavato dalle viscere di *Phallusia nigra* Savigny, 1816 presenta un'attività anticoagulante e antitrombotica molto bassa e un potenziale ipotensivo ridotto, suggerendo la possibilità di produzione di nuovi farmaci anti-metastatici. Oltre alle proprietà antitumorali, sono state evidenziate interessanti potenziali proprietà antibatteriche presenti nei peptidi estraibili dalle ascidie; infatti, peptidi purificati dell'ascidia del genere *Didemnum* hanno dimostrato attività antibatterica contro batteri sia gram-positivi che gram-negativi, come *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa* (Arumugam *et al.*, 2020). In aggiunta, sono state scoperte anche proprietà antimalariche da estratti provenienti da tre differenti ascidie: *Microcosmus goanus* Michaelson, 1918, *Ascidia sydneiensis* Stimpson, 1855 e *P. nigra* (Mendiola *et al.*, 2006).

Le ascidie si sono inoltre dimostrate ricche fonti di composti biologicamente attivi o prodotti naturali (Faulkner, 2001), come tossine (Watters, 2018), sfingomieline (Ito *et al.*, 2009), composti antimicrobici (Cai *et al.*, 2008), peptidi e alcaloidi come possibili anticancerogeni (Donia *et al.*, 2008; Herná Ndez Franco *et al.*, 1417; Jumeri e Kim, 2011; Rashid *et al.*, 2001), GAG solfato come anticoagulante (Rashid *et al.*, 2001) e plasmalogeno per il trattamento del morbo di Alzheimer (Dagorn *et al.*, 2010; Han *et al.*, 2001).

2. Scopo dello studio

Le ascidie sono tra le specie aliene invasive più diffuse globalmente e, di conseguenza, tra le specie incrostanti più abbondanti nelle aree costiere antropizzate come quelle portuali o lagunari del Mar Mediterraneo. Le loro esplosioni di popolazione possono generare grandi quantità di biomasse, con conseguenti impatti sulla biodiversità ed economia locale. Tuttavia, i recenti avanzamenti in termini di esplorazione di nuove risorse marine hanno fatto luce sulla possibilità di sfruttamento delle ascidie come potenziali biorisorse in diversi ambiti industriali (come quello alimentare, chimico, medico e farmaceutico). L'attuale conoscenza sui tunicati è limitata alle sole specie che generalmente vengono consumate o che sono utilizzate a scopi industriali.

Lo scopo di questa tesi, che si inserisce in un più ampio progetto di dottorato (38° ciclo) in Scienze della Terra e dell'Ambiente dell'Università di Pavia finanziato dal MUR e assegnato al dr Salvatore Coco, è ampliare le esistenti conoscenze sulle caratteristiche delle ascidie solitarie del mar Mediterraneo non ancora studiate. In particolare, lo studio si è concentrato sull'analisi dei profili nutrizionali in due ascidie native, *Ascidella aspersa* e *Phallusia mammillata*, e tre specie NIS, *Styela clava*, *Styela plicata* - comunemente sfruttate nei loro paesi d'origine (Korea e Giappone) - e *Ciona robusta*. Inoltre, è stata indagata la presenza di metalli pesanti e di elementi in traccia nella tunica e nei tessuti interni del corpo delle specie analizzate per valutare il rischio di consumo. Questo studio mira ad ampliare le attuali conoscenze sullo sfruttamento delle ascidie per il consumo alimentare umano e animale, nonché ad individuare potenziali micro- e macronutrienti, al fine di supportare possibili microeconomie circolari sostenibili.

Le ricerche sono state condotte al Dipartimento di Scienze della Terra e dell'Ambiente e al Dipartimento di Chimica dell'Università di Pavia e, in parte, al Dipartimento di Bioscienze e Medicina Veterinaria dell'Università di Camerino.

3. Materiali e metodi

3.1 Area di studio e raccolta dei campioni

La Laguna di Venezia è il più grande sistema lagunare d'Italia nonché uno dei più grandi del Mar Mediterraneo (Figura 10). È considerata il più grande ecosistema costiero di transizione del Mediterraneo, caratterizzato da un'elevata produttività; gli habitat di pregio sono caratterizzati da una rete di fiumi e canali artificiali, che tagliano una vasta area di acque poco profonde (profondità media di 1 m), paludi e saline (Barausse *et al.*, 2015; Madricardo *et al.*, 2019). Tre bocche di porto (da nord a sud: Lido, Malamocco e Chioggia) collegano la laguna al Mare Adriatico (Zatta *et al.*, 1992). La laguna circonda la città di Venezia, con ~70.000 abitanti, di Chioggia, con ~50.000 abitanti, e di Mestre, con ~200.000 abitanti e, inoltre, ospita altri ~10.000.000 di visitatori all'anno (Solidoro *et al.*, 2010). Trattandosi di una delle aree industriali più importanti d'Italia, molti fattori di stress agiscono sull'ecosistema lagunare, causando molteplici impatti ambientali. Tra i principali impatti si annoverano le attività terrestri che rilasciano nutrienti (soprattutto dai sistemi agricoli tramite i fiumi, con conseguente rischio di eutrofizzazione), metalli pesanti e altri inquinanti nonché le attività di pesca (in particolare la raccolta di vongole) e acquacoltura; la laguna, inoltre, ospita anche la zona industriale di Porto Marghera (Madricardo *et al.*, 2019).

A livello italiano, la laguna di Venezia è considerata un hotspot di introduzione di specie aliene, a causa della concomitanza di molte attività antropiche che agiscono come vettori di introduzione (Marchini *et al.*, 2015).

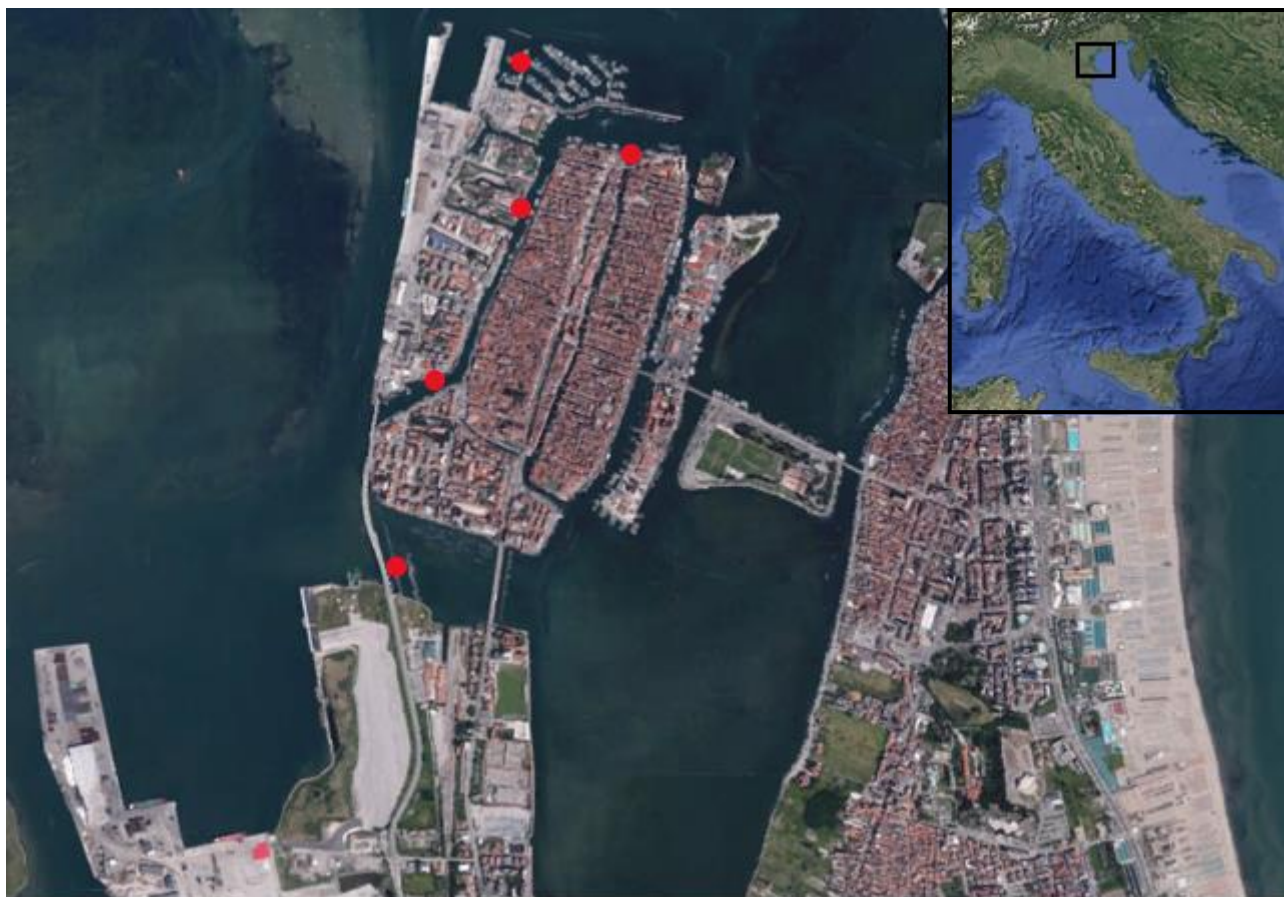


Figura 10. L'immagine mostra l'area urbana della città di Chioggia; i punti rossi mostrano le aree in cui sono stati raccolti gli esemplari di ascidie solitarie. L'immagine satellitare nel riquadro mostra la posizione della laguna di Venezia all'interno del bacino Mediterraneo.

I campionamenti sono stati effettuati durante la primavera e l'estate del 2023 tramite grattaggio di briccole, corde e pontili situati nella porzione a Sud della Laguna di Venezia, per la precisione nella città di Chioggia ($45^{\circ}13'08.08''\text{N}$ $12^{\circ}16'42.74''\text{E}$). Le specie target di questo studio sono due specie autoctone, *Ascidiella aspersa*, *Phallusia mammillata* e tre NIS, *Styela plicata*, *Ciona robusta* e *Styela clava* (Figura 11). Per ogni specie sono stati raccolti 25 individui, ad eccezione di *S. clava* di cui sono stati collezionati solo 14 esemplari. I campioni sono stati trasportati in vivo in laboratorio, misurati e pesati; per ogni individuo è stata separata la tunica dalla sacca contenente i tessuti interni (IBT), ogni tessuto è stato conservato in sacchetti da 100 g, successivamente posti in congelatore a -18°C . Una parte di IBT di ogni specie campionata è stata inviata e trasportata mediante ghiaccio secco ai laboratori di Biochimica del prof. Alberto Felici presso il Dipartimento di Bioscienze e Veterinaria dell'Università di Camerino (UniCam) per l'analisi della composizione centesimale e del profilo degli acidi grassi (FA). I rimanenti IBT e le tuniche sono stati inviati al Dipartimento di Chimica dell'Università di Pavia, presso il laboratorio del Professor Daniele Merli per l'analisi qualitativa e quantitativa della contaminazione da metalli pesanti.

Per queste ultime analisi non è stata considerata la specie *S. clava* poiché la quantità di tessuto non era sufficiente; pertanto, è stata concentrata la quantità per le analisi dei valori nutrizionali.

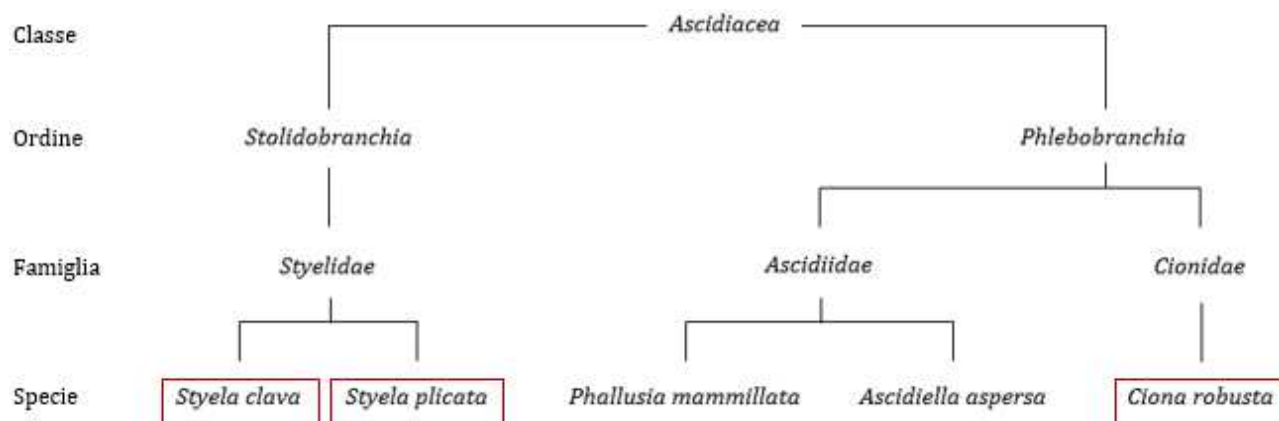


Figura 11. Classificazione tassonomica delle ascidie oggetto di studio. Le specie all'interno dei riquadri rossi sono non indigene (NIS) nel Mar Mediterraneo (modificata da Zhao and Li, 2016).

3.2 Caratteristiche delle specie analizzate

Styela clava

Appartenente all'ordine Stolidobranchia, famiglia Styelidae, *S. clava* è un tunicato solitario originario dei mari di Giappone, Corea e Cina. La sua presenza è stata confermata a livello globale, con la sua diffusione principalmente dovuta ad attività antropiche. In Italia è stata per la prima volta rilevata nel 2021, quando alcuni individui adulti sono stati raccolti su corde e pontili galleggianti a sud-ovest di Chioggia, nella laguna di Venezia (Mare Adriatico, Italia); tuttavia la sua distribuzione effettiva nei mari italiani è ancora sconosciuta, in quanto potrebbe essere stata confusa con la congenerica *S. plicata* (Mastrototaro *et al.*, 2022).

Si tratta di un organismo sessile che vive adeso a substrati solidi, siano essi naturali o artificiali, prediligendo località protette da forti moti ondosi, come porti, baie e zone lagunari. Gli individui di *S. clava* sono prevalentemente diffusi in acque con profondità comprese tra i 10 cm e i 15-25 m. Questa specie viene definita “colonizzatrice secondaria” in quanto in grado di colonizzare solamente substrati ricoperti in precedenza da altre specie infestanti (Artin *et al.*, 2007; Lützen *et al.*, 1999).

Presenta una struttura claviforme (da cui il nome scientifico), con un corpo ovale dotato di un lungo peduncolo affusolato. La tunica è rigida e, nella zona del peduncolo, risulta ripiegata

longitudinalmente; sulle altre parti del corpo la tunica appare ripiegata trasversalmente, talvolta rugosa o scanalata (Figura 12). Esternamente esibisce una colorazione marrone, bruno-giallastra, mentre i tessuti interni sono caratterizzati da un colore tendente al rosso-arancione. Gli individui adulti possono raggiungere dimensioni fino a 150 mm; questo rende *S. clava* la seconda specie di tunicato per dimensioni, tra quelle più diffuse in Europa.



Figura 12. Individui adulti di *Styela clava* (fonte: Ocean University of China, Animal Facility).

Styela plicata

Appartenente all'ordine Stolidobranchia, famiglia Styelidae, *S. plicata* (Figura 13) è un tunicato solitario proveniente dal Pacifico nordorientale. Ad oggi, la sua presenza è stata documentata a livello globale, essendo stata ritrovata sulle coste di diverse nazioni tra cui: Stati Uniti d'America, Messico, Brasile, Senegal, Somalia, India, Giappone, Australia, Nuova Zelanda e altri stati affacciati sul Mar Mediterraneo (Galià-Camps *et al.*, 2024). Vive adesa a diversi tipi di substrati, prediligendo quelli artificiali; è particolarmente diffusa in acque non troppo profonde e prossime alla terraferma, in località in cui importanti flussi di acqua dolce riducono la salinità locale.

Temperature tropicali e oceani caldi e temperati costituiscono le condizioni ideali per il proliferare di questa specie (Locke *et al.*, 2009).

È nota la tendenza di *S. plicata* ad aderire ai gusci di molluschi bivalvi e di competere con queste specie, sottraendo loro nutrienti o addirittura cibandosi delle loro larve (Cowden *et al.*, 1984; Young, 1988). A causa di queste sue caratteristiche questa ascidia è considerata una specie infestante e, pertanto, non desiderata all'interno degli allevamenti di molluschi (Locke *et al.*, 2009).

Gli organismi adulti possono raggiungere dimensioni comprese tra i 40 ed i 90 mm e sono dotati di una tunica spessa, dalla forma bulbosa e dal colore bianco sporco o brunastro (Figura 13); gli organi interni presentano un colore arancione intenso.



Figura 13. Individui adulti di *Styela plicata* (fonte: WoRMS).

Ascidella aspersa

Ascidella aspersa appartiene all'ordine Phlebobranchia, famiglia Ascidiidae (Figura 14), ed è originaria dei mari del nord, individuata inizialmente nel sud della Norvegia, in Danimarca, fino al Canale della Manica. Oggi è diffusa globalmente e la sua presenza è stata confermata nel Mar Adriatico, in Argentina, Inghilterra, Nuova Zelanda, Australia, Sud Africa e Tasmania (Shenkar e Swalla, 2011). Questa ascidia può sopravvivere in un ampio intervallo di temperature, dalle acque fredde tipiche dei mari del Nord a temperature più moderate come quelle del Mar Mediterraneo.

Si tratta di una specie in grado di colonizzare substrati solidi e, di conseguenza, è particolarmente diffusa in zone portuali e golfi.

La tunica è morbida e gelatinosa, dalla forma ovale e dal colore trasparente, tendente ad un colore grigio o bianco avorio. Presenta un sifone inalante in posizione apicale ed un sifone esalante a circa un terzo della lunghezza dell'intero animale. L'adulto può raggiungere dimensioni comprese tra i 20 e i 130 mm. Gli organi interni sono caratterizzati da un colore bruno-trasparente. La tunica risulta spesso ricca di detriti solidi e viene facilmente colonizzata da macro-alghe e da organismi incrostanti come i Briozoi (Tatián *et al.*, 2010).



Figura 14. Individui adulti di *Ascidiella aspersa* (fonte: Nature; credit Paul Sterry).

Phallusia mammillata

Appartenente all'ordine Phlebobranchia, famiglia Ascidiidae (Figura 15), *P. mammillata* è diffusa principalmente nel Mar Mediterraneo, specialmente nel Mar Adriatico, Mar Egeo, sulle coste spagnole e nell'Oceano Nord Atlantico. Può sopravvivere in acque molto profonde, fino a 200 metri, prediligendo ambienti in cui l'acqua è poco mossa. È la specie di ascidia più grande presente nel Mediterraneo, essendo in grado di raggiungere dimensioni fino a 200 mm.

È costituita da una tunica coriacea, molto spessa, dal colore bianco-trasparente e caratterizzata dalla presenza di lobi o protuberanze irregolari e stondate; è contraddistinta da una forma conica e allungata, con un sifone inalante posto in posizione apicale ed un sifone esalante posto ad un terzo della lunghezza dell'intero animale (Figura 15).

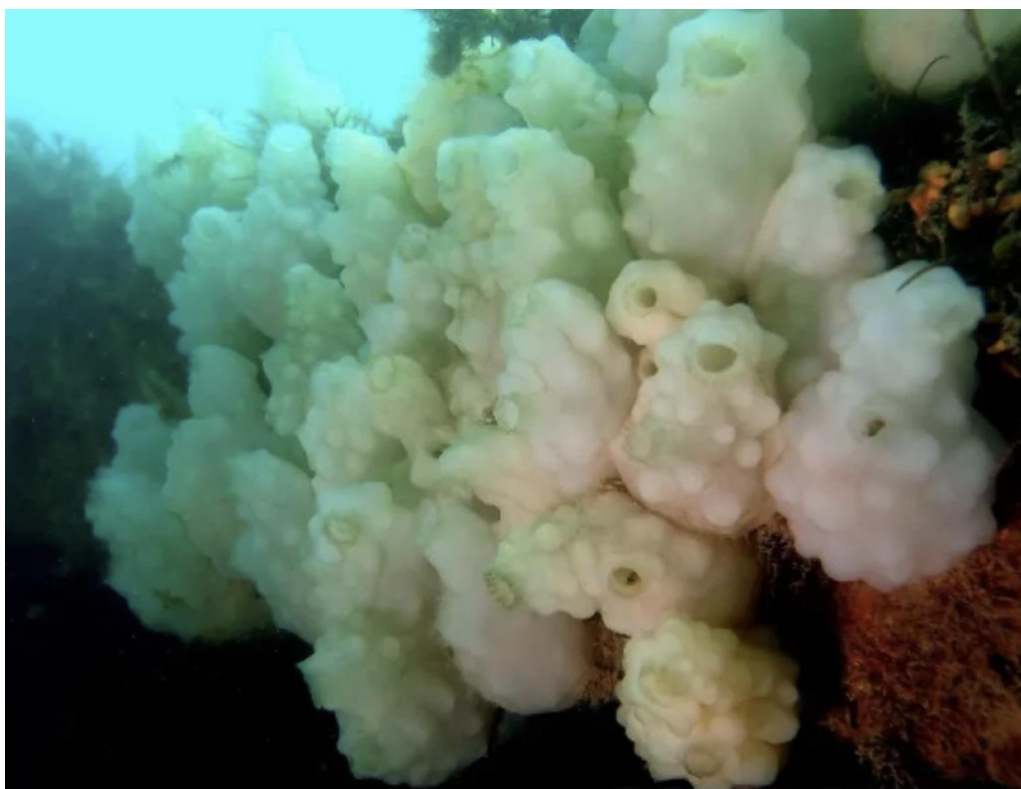


Figura 15. Individui adulti di *Phallusia mammillata* (fonte: WoRMS).

Ciona robusta

Ciona robusta, appartenente all'ordine degli Stolidobranchia, si distingue morfologicamente da *C. intestinalis* per la presenza di tubercoli prominenti sulla tunica e, in particolare, intorno ai sifoni. Ulteriore tratto distintivo è la caratteristica papilla rosso-aranciato lungo il dotto spermatico (Brunetti *et al.*, 2015; Mastrototaro *et al.*, 2017) (Figura 16). *Ciona robusta* può crescere fino ad almeno 15 cm e la sua tunica è traslucida e di colore giallognolo. Le gonadi sono localizzate a ridosso dell'ansa dell'intestino; l'ovario è sacciforme, mentre il testicolo forma ampolle che incrostano la superficie dell'ovario stesso. I gonodotti sono lunghi, paralleli tra loro e ben visibili: l'ovidotto è di colore giallo, lo spermidotto bianco. Il periodo di reclutamento di nuovi individui va da giugno a settembre, con un picco tra agosto e settembre (Brunetti e Menin, 1977). La riproduzione sessuata non avviene quando la temperatura dell'acqua si porta sotto i 10°C (Sabbadin, 1957). Questa specie tende a formare densi aggregati di individui (Figura 16) (Wilson *et al.*, 2022).

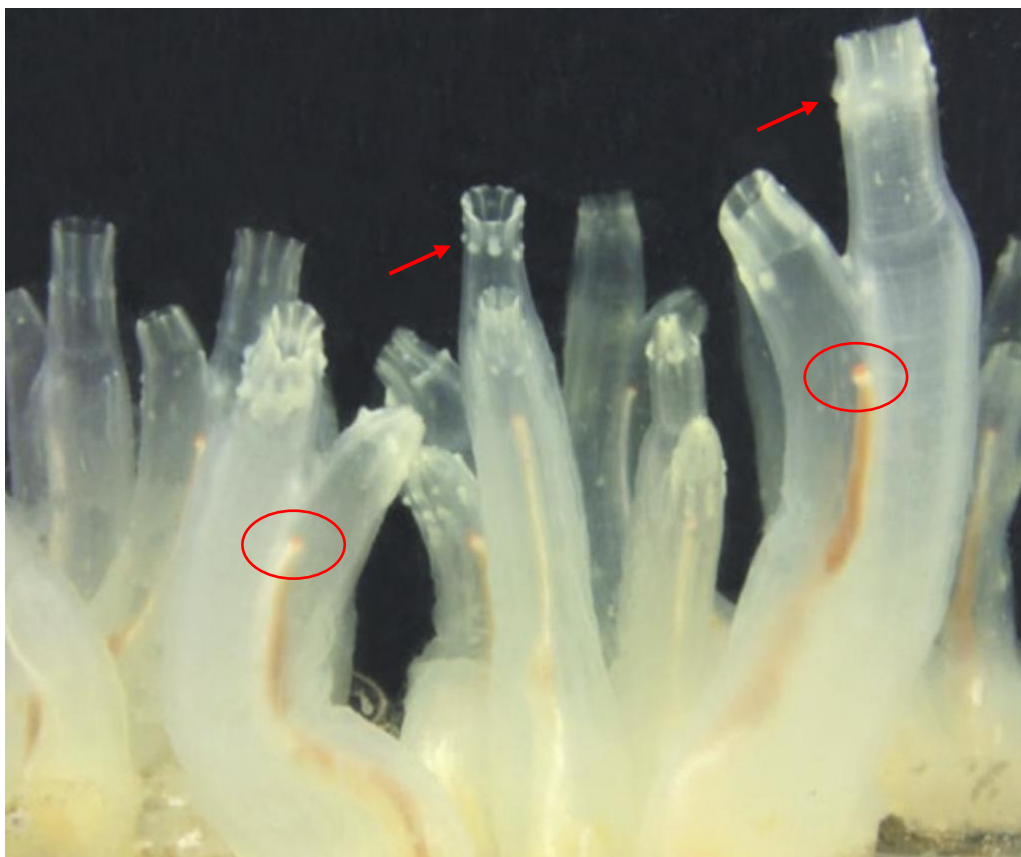


Figura 16. Individui di *Ciona robusta*. Le frecce indicano le protuberanze nei sifoni tipiche della specie, mentre i cerchi evidenziano la presenza della papilla rosso-aranciato del dotto spermatico (fonte: Ocean University of China, Animal Facility).

3.3 Analisi della composizione centesimale

Per le cinque specie oggetto di studio è stata analizzata la composizione centesimale, che indica la percentuale in cui sono presenti i nutrienti in 100 grammi di prodotto (Umidità, Ceneri, Grassi, Proteine, Carboidrati) seguendo il protocollo utilizzato da Felici *et al.* (2020) e Coco *et al.* (2022). La componente umida e le ceneri sono state analizzate seguendo le procedure standard riportate dell'*Association Official Analytical Chemists* (AOAC), un'associazione indipendente il cui scopo è quello di certificare i metodi analitici per gli alimenti (Cunniff e Washington, 1997). La componente umida è stata ricavata col metodo AOAC 930.15, che prevede l'essiccazione del campione in forno a temperatura controllata (solitamente 100-105 °C) fino a peso costante; mentre per le ceneri si è utilizzato il metodo AOAC 942.05 in cui il campione viene incenerito in una muffola ad alta temperatura (circa 550 °C) per rimuovere la materia organica.

Il contenuto lipidico totale è stato misurato utilizzando una modifica della procedura cloroformio:metanolo descritta da Folch *et al.* (1957) adattata per campioni di piccole dimensioni. La procedura prevede l'omogenizzazione del campione in una miscela di cloroformio e metanolo dove viene aggiunta acqua per separare la miscela in due fasi: una fase organica contenente i lipidi e una fase acquosa contenente le altre molecole. Infine, la fase organica viene raccolta e il solvente viene evaporato, lasciando un residuo lipidico. Le proteine sono state determinate utilizzando il metodo standard Kjeldahl (metodo AOAC 975.06). Questo metodo prevede diverse fasi: (i) *digestione*, il campione viene riscaldato in acido solforico concentrato con un catalizzatore per accelerare la reazione; (ii) *distillazione*, la soluzione digerita viene alcalinizzata e l'ammoniaca liberata viene distillata in una soluzione acida; (iii) *titolazione*, la quantità di ammoniaca raccolta viene determinata mediante titolazione con una soluzione acida standard; (iv) *calcolo*, la quantità di azoto nel campione originale viene calcolata in base alla quantità di ammoniaca titolata. Infine, i carboidrati vengono calcolati per differenza:

$\% \text{ carboidrati} = 100\% - (\% \text{ umidità} + \% \text{ ceneri} + \% \text{ proteine} + \% \text{ grassi}).$

3.4 Determinazione del profilo degli acidi grassi nei tessuti interni

Nel pool del peso totale di ogni specie campionata, è stata prelevata un'aliquota di 100 g. Dopo aver determinato il contenuto lipidico totale, gli acidi grassi sono stati convertiti in esteri metilici secondo il metodo descritto da Christopherson e Glass (1969). Per la separazione degli esteri metilici degli acidi grassi è stato utilizzato un sistema gascromatografia/spettrometria di massa GC/MS (6890N)/MSD (5973inert) di Agilent Technologies (Agilent, Palo Alto, CA, USA) dotato di una colonna db5 (60 mt, 0,25 mm) e calibrato.

Il sistema GC/MS è ad oggi il metodo analitico più importante per quanto riguarda l'analisi chimica di sostanze organiche in matrici complesse. Il gascromatografo separa i composti presenti nel campione mentre lo spettrometro di massa funziona da rivelatore. Il GC è costituito da un piccolo forno termostatabile, in cui viene alloggiata la colonna cromatografica. Essa è formata da un avvolgimento costituito da un sottile tubo capillare in vetro, lungo alcuni metri, sulle cui pareti interne è depositato un sottile strato della fase fissa (sostanza sufficientemente stabile per cui la miscela da analizzare mostri un certo grado di affinità).

Il campione viene introdotto con un flusso di gas inerte (in questo studio è stato utilizzato l'elio: He) ad una sua estremità, dopodiché i componenti separati fuoriescono col flusso di gas dall'estremità opposta in funzione della diversa affinità di ogni sostanza della miscela con le fasi. Lo spettrometro di massa come metodo di detenzione fornisce dati significativi, derivanti dalla determinazione diretta delle molecole della sostanza o da suoi frammenti (Hübschmann, 2015).

Le condizioni di funzionamento del gascromatografo erano le seguenti: la temperatura del forno è stata mantenuta a 170 °C per 15 minuti, aumentata a 190 °C alla velocità di 1 °C/min, quindi aumentata a 220 °C alla velocità di 5 °C/min e mantenuta a questa temperatura per 17 minuti. La temperatura dell'iniettore era di 280 °C. L'elio (He) è stato utilizzato come gas di trasporto a un flusso costante di 1,0 mL/min. L'identificazione dei singoli acidi grassi è stata ottenuta confrontando i tempi di ritenzione osservati con gli esteri metilici grassi di miscele standard (37 FAME Mix, Supelco) e NIST MASS SPECTRAL DATABASE (NIST MS SEARCH 2.3) per lo spettro di massa.

3.5 Determinazione degli elementi essenziali e dei metalli pesanti nella tunica e nei tessuti interni

Per indagare la presenza e l'entità dei metalli pesanti nei campioni analizzati, è stato utilizzato uno spettrometro di massa con plasma accoppiato induttivamente (ICP-MS). Il plasma accoppiato induttivamente è una sorgente di atomizzazione, ovvero un dispositivo che permette di trasformare un campione in un gas monoatomico, composto quindi da atomi isolati.

Lo spettrometro di massa è uno strumento analitico che separa gli ioni aventi la stessa carica e massa diversa, o più in generale aventi rapporto di massa su carica diverso (Thomas, 2004).

I reagenti utilizzati per l'analisi consistono in: acqua tridistillata, acido nitrico HNO₃ 65% Suprapur Merck, perossido di idrogeno H₂O₂ soluzione 30% Merck, acido fluoridrico HF 40% Merck, Soluzione multielemento "Certipur" ICP multi element standard VI Merck e una soluzione standard di mercurio Hg Merck. La strumentazione utilizzata (escluso il già citato spettrometro di massa per l'analisi effettiva) consiste in: filtri da 0.22 µm, una bilancia analitica (± 0.1 mg), micropipette da 10-100 µL e 100-1000 µL, provette in polipropilene, un forno microonde Mars Xpress CEM, Vessel Xpress PTFE (55 mL), MicroVap XpressVap. Il sistema ICP-MS iCAP RQ Thermo Fisher Scientific è dotato di una camera di nebulizzazione ciclonica raffreddata mediante effetto Peltier (3 °C). Lo strumento è dotato di torcia al quarzo con iniettore rimovibile con diametro interno di 2.5 mm; esso è stato adoperato in modalità KED (*Kinetic Energy Discrimination*) ricorrendo all'elio come gas di collisione nella cella di collisione/reazione CRC con un flusso pari a 4.5 mL·min⁻¹.

Lo strumento è munito di autocampionatore Elemental Scientific SC-2 DX. La potenza di radiofrequenza è stata mantenuta a 1500 W. I flussi del gas di nebulizzazione, del gas di raffreddamento e del gas ausiliario sono stati rispettivamente di 0.9 L·min⁻¹, 14.0 L·min⁻¹ e 0.8 L·min⁻¹. Come software di gestione dello strumento è stato utilizzato Thermo Scientific™ Qtegra™ Intelligent Scientific Data Solution™. Per la determinazione di ogni elemento sono stati selezionati gli isotopi più importanti, riassunti in Tabella 1.

Tabella 1. Isotopi degli elementi analizzati mediante ICP-MS.

Elemento	Isotopo
Al	²⁷ Al
Cr	⁵² Cr
As	⁷⁵ As
Cd	¹¹¹ Cd
Cu	⁶³ Cu
Ni	⁶⁰ Ni
Pb	²⁰⁸ Pb
Se	⁷⁸ Se
Mn	⁵⁵ Mn
Zn	⁶⁶ Zn
Fe	⁵⁶ Fe
Hg	²⁰² Hg
V	⁵¹ V
Co	⁵⁹ Co
Sb	¹²¹ Sb

I campioni di *S. plicata*, *P. mammillata*, *A. aspersa* e di *C. robusta* sono stati liofilizzati in modo da ottenere materiale organico secco per facilitare l'analisi. Per ciascuna specie, sono stati liofilizzati circa 100 g di tunica e altrettanti grammi di organi interni. Il programma di liofilizzazione è stato impostato a 48 h.

Per ciascuna specie e per ciascuna delle due componenti dell'animale (tunica e organi interni), circa 150 mg di campione liofilizzato, opportunamente sminuzzati, sono stati esattamente pesati, posti in contenitori di teflon (vessel Xpress) e addizionati di 5 ml di HNO₃ e 2 ml di H₂O₂ per l'attacco acido mediante digestione a microonde. In Tabella 2 è riportato il programma termico utilizzato per la digestione a microonde.

Tabella 2. Programma termico per la digestione in microonde dei campioni.

Potenza	800 W (per 8 contenitori)
Temperatura	200°C
Pressione	100 psi
Tempo di riscaldamento	15 minuti
Tempo di mantenimento	15 minuti
Tempo di raffreddamento	15 minuti

Successivamente, i campioni sono stati svaporati in microonde mediante MicroVap XpressVap fino a un volume di 0.5-1 mL, seguendo il programma di riscaldamento (potenza/tempo) riportato in Tabella 3.

Tabella 3. Programma di riscaldamento potenza/tempo per la riduzione della soluzione.

Potenza	800 W (per 8 contenitori)
Tempo di riscaldamento	14 minuti
Tempo di raffreddamento	15 minuti

Infine il contenuto residuo è stato travasato in provette di polipropilene e portato a un volume finale di 10 mL con acqua tridistillata. Prima di effettuare la misura mediante ICP-MS, tutti i campioni sono stati filtrati su filtro a siringa da 0.22 µm.

3.6 Analisi dei dati

I risultati sono stati calcolati facendo la media di tre valutazioni e sono espressi come media $\pm$ deviazione standard. Le differenze nel contenuto percentuale dei diversi acidi grassi e dei metalli nelle cinque specie sono state analizzate utilizzando ANOVA a una via, seguite da test di Duncan a intervalli multipli (DMRT) come *post-hoc* per confrontare le singole specie, con una significatività statistica fissata a $p < 0,05$. Le analisi degli oligoelementi e dei metalli pesanti sono state effettuate sia nella tunica che nei tessuti interni del corpo di quattro ascidie. I profili complessivi degli acidi grassi e del contenuto minerale delle cinque specie selezionate sono stati esplorati utilizzando l'analisi delle componenti principali (PCA). L'analisi statistica è stata condotta utilizzando R versione 4.3.2, pacchetto “*agricolae*” (Mendiburu e Yaseen, 2020) mentre la PCA è stata condotta con PAleontological STatistics (PAST) versione 4.09 (Natural History Museum, Università di Oslo, Norvegia).

4. Risultati

4.1 Parametri morfometrici e Composizione centesimale

Tutte le specie analizzate in questo studio risultano essere individui adulti con diverse dimensioni (Tabella 4); l'individuo più grande appartiene alla specie *P. mammillata* (9,5 cm; 62,18 g) mentre il più piccolo ad *A. aspersa* (4,64 cm; 10,23 g). Gli esemplari con la maggiore quantità di tunica rispetto al peso totale appartengono a *S. plicata* ($1,40 \pm 0,14$), mentre quelli con la quantità proporzionalmente maggiore di tessuti interni appartengono ad *A. aspersa* ($0,96 \pm 0,07$). I tessuti interni delle ascidie analizzate sono approssimativamente composti da proteine (2,9 - 3,9%), carboidrati (1,01 - 2,65%) e da una piccola frazione di lipidi (0,82 - 0,96%) (Tabella 5).

Tabella 4. Caratteristiche morfometriche degli esemplari di ascidia analizzati (media $\pm$ SD). CR = Ciona robusta; PM = Phallusia mammillata; SC = Styela clava; SP = Styela plicata; AA = Ascidiella aspersa.

		CR	PM	SC	SP	AA
Intero corpo	Lunghezza (cm)	8,3 $\pm$ 2,2	9,5 $\pm$ 2	8,72 $\pm$ 2,3	5,65 $\pm$ 1,4	4,64 $\pm$ 1,3
	Peso (g)	13,9 $\pm$ 4,2	62,18 $\pm$ 3,43	17,39 $\pm$ 2,9	18,3 $\pm$ 3,65	10,23 $\pm$ 2,53
	Ratio Tunica/Tessuti interni (g/g)	1,1 $\pm$ 0,06	1,48 $\pm$ 0,10	1,36 $\pm$ 0,13	1,40 $\pm$ 0,14	0,96 $\pm$ 2,53
Tunica (100g)	Parte umida (%)	95,11 $\pm$ 0,04	91,5 $\pm$ 0,03	ND	85,65 $\pm$ 0,05	91,27 $\pm$ 0,03
	Tunica secca (%)	4,89 $\pm$ 0,06	8,5 $\pm$ 0,03	ND	14,35 $\pm$ 0,03	8,73 $\pm$ 0,05
Tessuti interni (100g)	Parte umida (%)	90,84 $\pm$ 0,03	90,29 $\pm$ 0,03	94,03 $\pm$ 0,04	94,34 $\pm$ 0,03	92,98 $\pm$ 0,04
	Tessuti interni secchi (%)	9,16 $\pm$ 0,04	9,71 $\pm$ 0,05	5,97 $\pm$ 0,04	5,66 $\pm$ 0,02	7,02 $\pm$ 0,03

Tabella 5. Composizione centesimale nei tessuti interni delle specie in gr/100g di prodotto espressa in percentuale (%).

	CR	PM	SC	SP	AA
Sostanza secca	9,16 $\pm$ 0,04	9,41 $\pm$ 0,03	5,99 $\pm$ 0,04	5,66 $\pm$ 0,02	6,79 $\pm$ 0,03
Proteine	3,9 $\pm$ 0,04	3,3 $\pm$ 0,3	2,8 $\pm$ 0,3	2,4 $\pm$ 0,3	2,9 $\pm$ 0,3
Lipidi	0,86 $\pm$ 0,01	0,96 $\pm$ 0,01	0,88 $\pm$ 0,01	0,90 $\pm$ 0,02	0,79 $\pm$ 0,02
Carboidrati	2,45 $\pm$ 0,03	2,55 $\pm$ 0,03	1,01 $\pm$ 0,02	1,16 $\pm$ 0,04	1,4 $\pm$ 0,03
Ceneri	1,9 $\pm$ 0,02	2,6 $\pm$ 0,02	1,3 $\pm$ 0,02	1,2 $\pm$ 0,03	1,7 $\pm$ 0,03

4.2 Contenuto in acidi grassi (FA)

I profili degli acidi grassi degli esemplari di ascidie analizzate in questo studio (Tabella 6, Figura 17 e Figura 18) evidenziano differenze altamente significative ($p < 0,001$) nella composizione degli acidi grassi tra le diverse specie. L'analisi del test di Duncan ha dimostrato che il contenuto totale di acidi grassi saturi (Σ FSA) in *A. aspersa* è significativamente superiore ($39,01 \pm 0,03\%$) rispetto a *S. plicata* ($34,22 \pm 0,07\%$), *S. clava* ($31,80 \pm 0,09\%$), *P. mammillata* ($31,27 \pm 0,07\%$) e *C. robusta* ($32,55 \pm 0,06\%$). Tra gli acidi grassi saturi, l'acido palmitico (C16:0) è presente con la concentrazione maggiore nelle specie esaminate, raggiungendo il valore più elevato in *C. robusta* ($24,31 \pm 0,04\%$) e il valore minimo in *P. mammillata* ($16,62 \pm 0,04\%$). L'acido stearico (C18:0) raggiunge il valore massimo in *A. aspersa* ($12,86 \pm 0,06\%$) e il minimo in *C. robusta* ($5,93 \pm 0,03\%$). L'acido miristico (C14:0) presenta il valore più alto in *S. plicata* ($5,56 \pm 0,05\%$) e il più basso in *C. robusta* ($2,38 \pm 0,06\%$). *Ascidella aspersa* ha mostrato un contenuto significativamente maggiore ($22,08 \pm 0,03\%$) di acidi grassi monoinsaturi (Σ MUFA) rispetto alle altre specie studiate. Tra i MUFA, gli acidi grassi oleico (C18:1; $7,17-17,36\%$) e palmitoleico (C16:1; $3,22-10,54\%$) sono i più abbondanti, mentre l'acido cis-11 eicosenoico è stato identificato solo in *C. robusta* ($0,87 \pm 0,04\%$) e *P. mammillata* ($2,84 \pm 0,05\%$). *Ciona robusta* e *S. clava* presentano i valori di acidi polinsaturi (Σ PUFA) più elevati, rispettivamente ($55,16 \pm 0,09\%$) e ($51,62 \pm 0,31\%$), mentre *P. mammillata* e *S. plicata* mostrano un contenuto simile (da $46,91$ a $49,71\%$) e *A. aspersa* mostra il valore più basso ($39,09 \pm 0,09\%$). L'acido eicosapentaenoico (EPA; n-3) è l'acido polinsaturo presente in concentrazione maggiore nella maggior parte delle specie analizzate ($19,16-24,94\%$), ad eccezione di *S. clava*, che ha una concentrazione più alta di acido docosapentaenoico (DPA) (C22:5; n-3) ($20,14 \pm 0,02\%$). Anche l'acido docosaesaenoico (DHA) (C22:6; n-3) è ampiamente rappresentato, con valori massimi in *C. robusta*, *S. clava* e *S. plicata* ($17,92 \pm 0,05\%$; $17,48 \pm 0,02\%$; $14,18 \pm 0,04\%$, rispettivamente), mentre *P. mammillata* e *A. aspersa* hanno i valori più bassi. Il contenuto di $\Sigma \omega 3$ maggiore è presente in *C. robusta* ($53,33 \pm 0,07\%$) e *P. mammillata* ($47,19 \pm 0,02\%$) rispetto a *S. clava* ($46,20 \pm 0,08\%$) e *S. plicata* ($41,97 \pm 0,05\%$), mentre *A. aspersa* mostra il valore più basso ($29,69 \pm 0,02\%$). Il $\Sigma \omega 6$, dato dalla somma degli unici due acidi grassi n-6 presenti, acido linoleico (C18:2) e acido arachidonico (C20:4), risulta più elevato in *A. aspersa* ($10,12 \pm 0,05\%$) e più basso in *S. plicata* ($4,98 \pm 0,04\%$). I risultati indicano che il rapporto $\omega 6/\omega 3$ è più alto in *A. aspersa* ($0,34 \pm 0,01\%$) rispetto a *P. mammillata* ($0,15 \pm 0,01\%$), *C. robusta* ($0,14 \pm 0,01\%$), *S. plicata* ($0,12 \pm 0,01\%$) e *S. clava* ($0,11 \pm 0,01\%$).

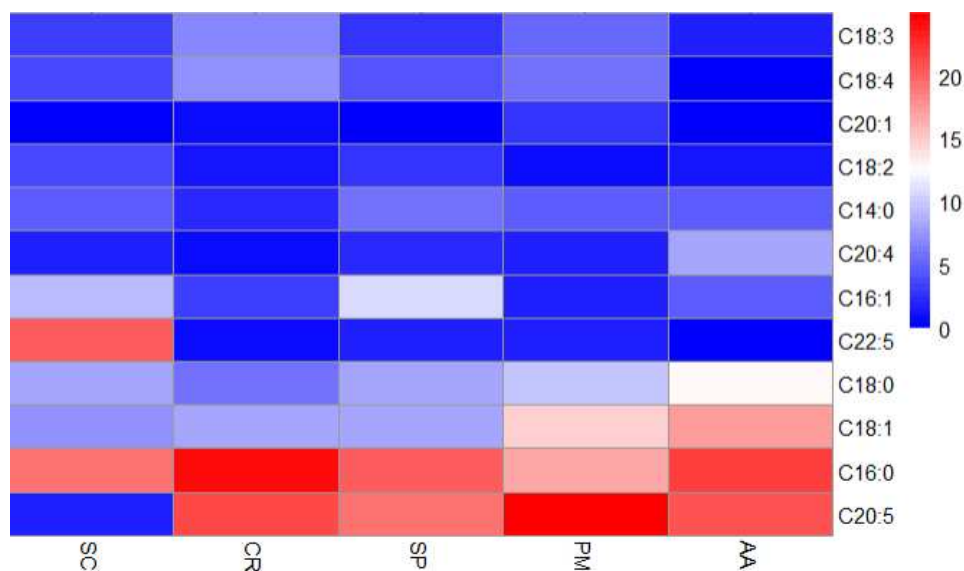


Figura 17. Gradiente di abbondanza in g/100g di tutti gli acidi grassi (FA). Il colore blu indica i valori più bassi, il bianco indica i valori intermedi e il rosso indica i valori più alti. SC = Styela clava; CR = Ciona robusta; SP = Styela plicata; PM = Phallusia mammillata; AA = Ascidella aspersa.

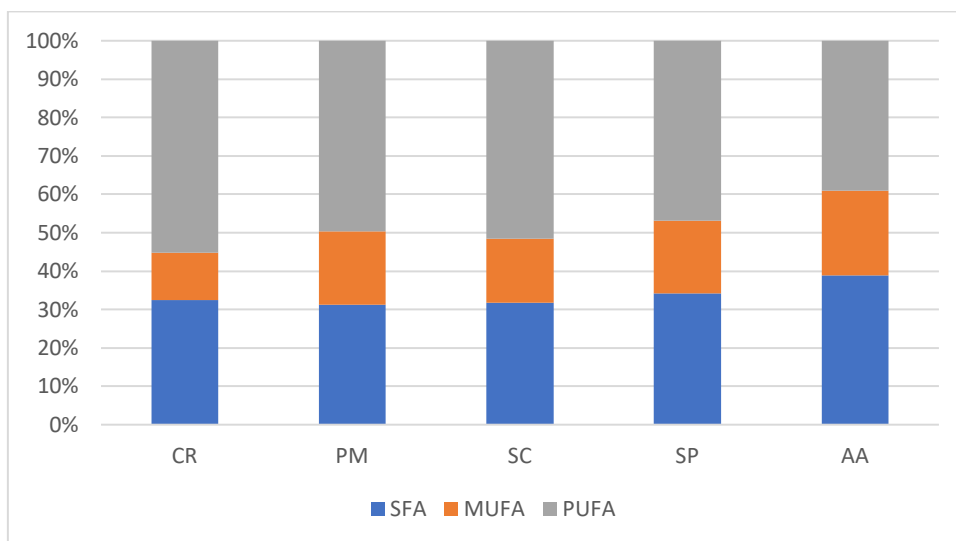


Figura 18. Distribuzione percentuale degli acidi grassi saturi (SFA), monoinsaturi (MUFA) e poliinsaturi (PUFA) nei tessuti interni (IBT) delle cinque specie analizzate. SC = Styela clava; CR = Ciona robusta; SP = Styela plicata; PM = Phallusia mammillata; AA = Ascidella aspersa.

Tabella 6. Composizione degli acidi grassi e componente sterolica di cinque specie di ascidie (media $\pm$ deviazione standard; $n=3$). Tutti i valori sono espressi come % di biomassa sul peso totale (mg g^{-1}). I valori seguiti dalle stesse lettere (a-e) non presentano una differenza significativa secondo il Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ($p < 0,05$). ND = non rilevato.

	AA	PM	CR	SP	SC
Steroli	10,15 $\pm$ 0,04 ^a	6,84 $\pm$ 0,05 ^c	5,27 $\pm$ 0,04 ^d	10,23 $\pm$ 0,05 ^a	7,93 $\pm$ 0,05 ^b
Colesterolo	3,76 $\pm$ 0,04 ^b	2,64 $\pm$ 0,05 ^d	1,53 $\pm$ 0,05 ^e	4,14 $\pm$ 0,04 ^a	3,23 $\pm$ 0,05 ^c
Acido miristico (C14:0)	4,58 $\pm$ 0,09 ^c	4,79 $\pm$ 0,01 ^b	2,34 $\pm$ 0,06 ^d	5,56 $\pm$ 0,05 ^a	4,52 $\pm$ 0,03 ^c
Acido palmitico (C16:0)	21,47 $\pm$ 0,3 ^b	16,62 $\pm$ 0,04 ^e	24,27 $\pm$ 0,03 ^a	20,32 $\pm$ 0,06 ^c	19,13 $\pm$ 0,02 ^d
Acido stearico (C18:0)	12,86 $\pm$ 0,05 ^a	9,85 $\pm$ 0,04 ^b	5,93 $\pm$ 0,03 ^e	8,34 $\pm$ 0,05 ^c	8,16 $\pm$ 0,03 ^d
ΣSFA	38,91 $\pm$ 0,01 ^a	31,27 $\pm$ 0,06 ^e	32,55 $\pm$ 0,05 ^c	34,22 $\pm$ 0,07 ^b	31,81 $\pm$ 0,09 ^d
Acido palmitoleico (C16:1)	4,72 $\pm$ 0,04 ^c	1,55 $\pm$ 0,06 ^e	3,22 $\pm$ 0,04 ^d	10,54 $\pm$ 0,05 ^a	9,47 $\pm$ 0,05 ^b
Acido oleico (C18:1)	17,36 $\pm$ 0,04 ^a	14,66 $\pm$ 0,04 ^b	8,23 $\pm$ 0,04 ^c	8,29 $\pm$ 0,03 ^c	7,17 $\pm$ 0,04 ^d
Acido eicosenoico (C20:1)	ND	2,84 $\pm$ 0,05 ^a	0,87 $\pm$ 0,04 ^b	ND	ND
ΣMUFA	22,08 $\pm$ 0,03 ^a	19,05 $\pm$ 0,09 ^b	12,32 $\pm$ 0,12 ^e	18,83 $\pm$ 0,06 ^c	16,64 $\pm$ 0,05 ^d
Acido linoleico (C18:2)	1,23 $\pm$ 0,03 ^c	0,84 $\pm$ 0,03 ^e	1,06 $\pm$ 0,04 ^d	2,65 $\pm$ 0,2 ^b	3,68 $\pm$ 0,03 ^a
Acido linolenico (C18:3)	1,93 $\pm$ 0,02 ^e	5,25 $\pm$ 0,04 ^b	6,76 $\pm$ 0,04 ^a	2,74 $\pm$ 0,04 ^d	3,27 $\pm$ 0,15 ^c
Acido stearidonico (C18:4)	0,06 $\pm$ 0,03 ^e	5,88 $\pm$ 0,04 ^b	7,06 $\pm$ 0,03 ^a	4,36 $\pm$ 0,04 ^c	3,60 $\pm$ 0,43 ^d
Acido arachidonico (C20:4)	8,19 $\pm$ 0,03 ^a	1,69 $\pm$ 0,06 ^d	0,75 $\pm$ 0,03 ^e	2,24 $\pm$ 0,04 ^b	1,79 $\pm$ 0,02 ^c
Acido eicosapentaenoico (C20:5)	20,62 $\pm$ 0,03 ^c	24,94 $\pm$ 0,05 ^a	21,06 $\pm$ 0,03 ^b	19,16 $\pm$ 0,03 ^d	1,66 $\pm$ 0,04 ^e
Acido docosapentaenoico (C22:5)	ND	1,86 $\pm$ 0,02 ^b	0,54 $\pm$ 0,03 ^d	1,58 $\pm$ 0,01 ^c	20,14 $\pm$ 0,01 ^a
Acido docosaesaenoico (C22:6)	7,06 $\pm$ 0,03 ^c	9,27 $\pm$ 0,04 ^d	17,92 $\pm$ 0,05 ^a	14,18 $\pm$ 0,04 ^c	17,49 $\pm$ 0,02 ^b
ΣPUFA	39,09 $\pm$ 0,09 ^c	49,71 $\pm$ 0,09 ^c	55,16 $\pm$ 0,09 ^a	46,91 $\pm$ 0,07 ^d	51,62 $\pm$ 0,31 ^b
ΣPUFA/ΣFSA	1,00 $\pm$ 0,002 ^c	1,59 $\pm$ 0,002 ^c	1,69 $\pm$ 0 ^a	1,37 $\pm$ 0,005 ^d	1,62 $\pm$ 0,014 ^b
$\Sigma\omega3$	29,70 $\pm$ 0,03 ^c	47,19 $\pm$ 0,03 ^b	53,33 $\pm$ 0,09 ^a	41,97 $\pm$ 0,07 ^d	46,20 $\pm$ 0,1 ^c
$\Sigma\omega6$	9,42 $\pm$ 0,06 ^a	2,53 $\pm$ 0,03 ^d	1,81 $\pm$ 0,03 ^e	4,90 $\pm$ 0,02 ^c	5,47 $\pm$ 0,05 ^b
$\Sigma\omega6/\Sigma\omega3$	0,32 $\pm$ 0,002 ^a	0,05 $\pm$ 0,001 ^c	0,03 $\pm$ 0 ^d	0,12 $\pm$ 0,001 ^b	0,12 $\pm$ 0,001 ^b

4.2.1 Analisi multivariata della composizione degli acidi grassi in cinque ascidie solitarie

I primi due assi della PCA basata sulla composizione degli acidi grassi nei campioni di ascidie della laguna di Venezia spiegano cumulativamente quasi il 74,4% della variabilità (Figura 19) e sono dunque altamente rappresentativi dei profili nutrizionali delle cinque specie. Le specie *P. mammillata* (PM), *A. aspersa* (AA), *C. robusta* (CR), *S. plicata* (SP) e gli acidi grassi oleico, arachidonico, stearico, miristico, linoleico, palmitoleico (C18:1, C20:4, C18:0, C14:0, C18:2, C16:1) sono quelli che caratterizzano il primo asse della PCA, mentre il secondo asse (17,64%) è caratterizzato da *S. clava* (SC) e dagli acidi grassi docosapentaenoico e docosaesaenoico (C22:5 e C22:6).

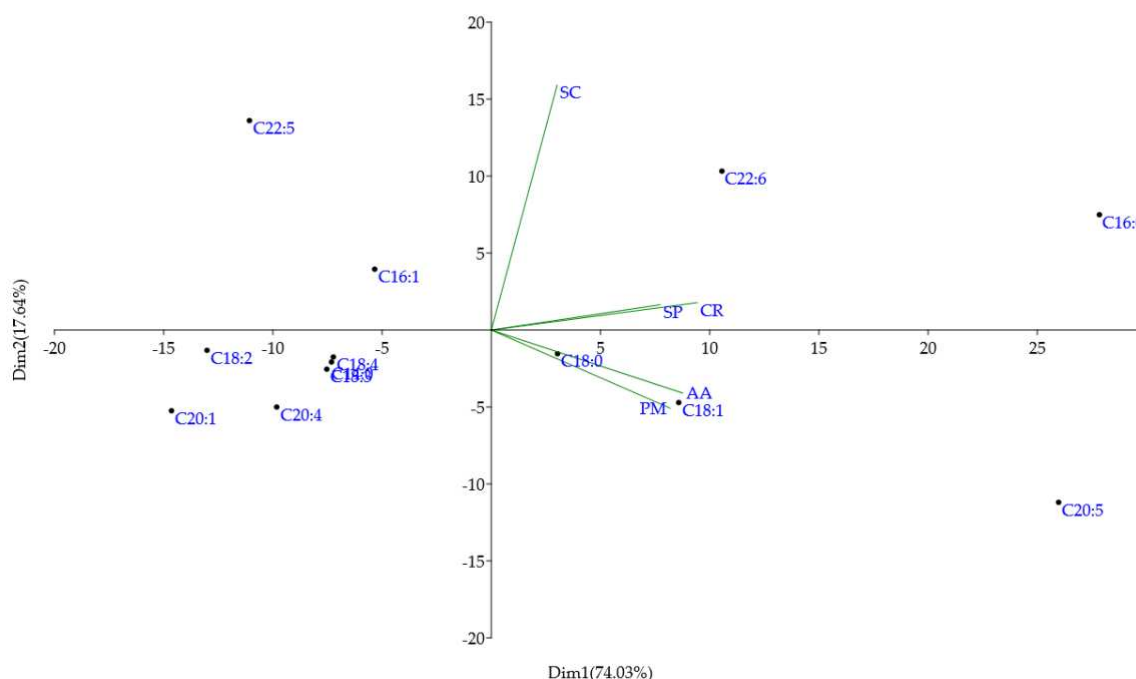


Figura 19. Il biplot PCA mostra le cinque specie di ascidie e la loro composizione in acidi grassi. CR = Ciona robusta; PM = Phallusia mammillata; SC = Styela clava; SP = Styela plicata; AA = Ascidella aspersa.

4.3 Contenuto minerale e metalli pesanti

L'analisi del contenuto di minerali e metalli pesanti (espresso come media $\pm$ SD in mg/kg e illustrato in Tabella 7, Figura 20 e Figura 21) rivela notevoli differenze tra le specie e i tessuti esaminati. La tunica di *A. aspersa* si distingue per un contenuto di ferro (Fe) significativamente superiore (3065 ± 660 mg/kg) rispetto alle altre, in contrasto con il valore minimo osservato in *P. mammillata* ($67 \pm 2,5$ mg/kg). Nei tessuti interni, è *C. robusta* a presentare una concentrazione di Fe marcatamente più alta (10675 ± 97 mg/kg). Un andamento simile si osserva per il manganese (Mn) nella tunica, dove *A. aspersa* mostra il valore più elevato (372 ± 229 mg/kg) e *P. mammillata* il più basso ($4,1 \pm 2,9$ mg/kg); per il contenuto di manganese nei tessuti interni, *C. robusta* detiene il primato ($184,5 \pm 0,9$ mg/kg). Per quanto riguarda lo zinco (Zn), si registra un'alta variabilità nella tunica, con un massimo in *A. aspersa* ($283,4 \pm 25$ mg/kg) e un minimo in *C. robusta* ($27,1 \pm 5,9$ mg/kg), mentre nei tessuti interni *S. plicata* supera le altre ($101 \pm 3,8$ mg/kg), con *A. aspersa* che presenta nuovamente il valore inferiore ($25,4 \pm 3$ mg/kg). Il selenio (Se), assente nelle tuniche, è stato rilevato nei tessuti interni, dove *S. plicata* mostra la concentrazione maggiore ($3,4 \pm 0,2$ mg/kg) e *A. aspersa* la minore ($1,1 \pm 0,1$ mg/kg).

Il vanadio (V) si accumula in modo significativamente superiore sia nella tunica ($82,8 \pm 4,4$ mg/kg) che nei tessuti interni di *P. mammillata* ($1142,6 \pm 91$ mg/kg), seguita da *A. aspersa* ($229,5 \pm 81,8$ mg/kg) e *C. robusta* ($149,4 \pm 9,2$ mg/kg). L'analisi degli elementi tossici (arsenico, piombo, alluminio e nichel) ha rivelato la loro presenza in entrambe le matrici in quasi tutte le specie, con alcune eccezioni per il piombo (assente nella tunica di *P. mammillata* e nei tessuti interni di *A. aspersa*) e il nichel (non rilevato nella tunica di *P. mammillata*). Cadmio, mercurio e antimonio non sono stati riscontrati nei campioni analizzati.

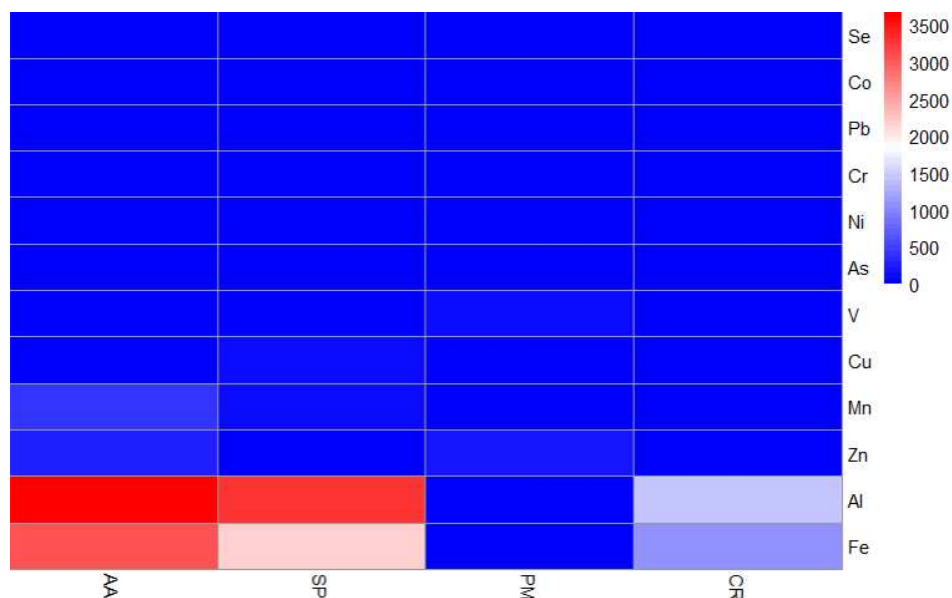


Figura 20. Gradiente di abbondanza in mg/Kg di tutti gli elementi analizzati nelle tuniche (T) delle quattro specie. Il colore blu indica i valori più bassi, il bianco indica i valori intermedi e il rosso indica i valori più alti. SC = *Styela clava*; CR = *Ciona robusta*; SP = *Styela plicata*; PM = *Phallusia mammillata*; AA = *Ascidella aspersa*.

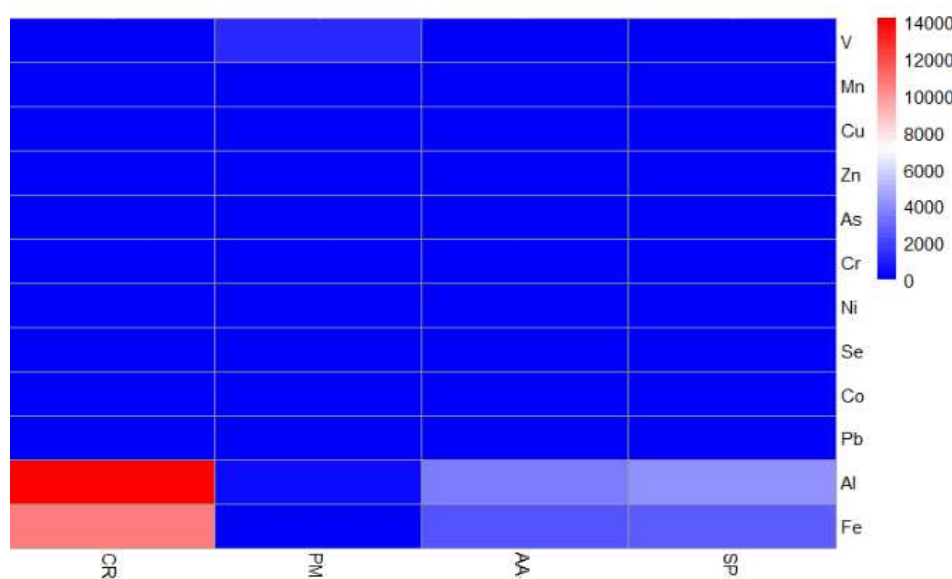


Figura 21. Gradiente di abbondanza in mg/Kg di tutti gli elementi analizzati nei tessuti interni (IBT) delle quattro specie. Il colore blu indica i valori più bassi, il bianco indica i valori intermedi e il rosso indica i valori più alti. SC = *Styela clava*; CR = *Ciona robusta*; SP = *Styela plicata*; PM = *Phallusia mammillata*; AA = *Ascidella aspersa*.

Tabella 7. Composizione degli elementi metallici delle quattro diverse specie di ascidie (media $\pm$ deviazione standard; $n = 3$). I valori seguiti dalle stesse lettere (a-e) non presentano una differenza significativa secondo il Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ($p < 0,05$). <MQL = limite di quantificazione del metodo. CR = Ciona robusta; PM = Phallusia mammillata; SC = Styela clava; SP = Styela plicata; AA = Ascidiella aspersa.

		Tunica				Tessuti interni			
(mg/Kg)		CR	PM	SP	AA	CR	PM	SP	AA
Minerali	Zn	27,1 $\pm$ 5,9 ^a	181 $\pm$ 4,7 ^a	62 $\pm$ 22 ^a	283,4 $\pm$ 256 ^a	71,3 $\pm$ 1,7 ^b	70,7 $\pm$ 3,5 ^b	101 $\pm$ 3,8 ^a	25,4 $\pm$ 3 ^c
	Mn	40,2 $\pm$ 13,4 ^b	4,1 $\pm$ 2,9 ^b	113,3 $\pm$ 42 ^b	372 $\pm$ 229 ^a	184,5 $\pm$ 0,9 ^a	23,9 $\pm$ 1,5 ^b	180 $\pm$ 3 ^a	33,5 $\pm$ 12 ^b
	Co	0,8 $\pm$ 0,2 ^b	<MQL	1,5 $\pm$ 0,6 ^b	3,5 $\pm$ 2,5 ^a	4,4 $\pm$ 0,1 ^a	<MQL	2,7 $\pm$ 0,2 ^b	<MQL
	V	9 $\pm$ 2,9 ^c	82,8 $\pm$ 4,4 ^a	14,3 $\pm$ 5 ^c	50 $\pm$ 15 ^b	149,4 $\pm$ 9,2 ^b	1142,6 $\pm$ 91 ^a	20,4 $\pm$ 1,8 ^c	229,5 $\pm$ 81,8 ^b
	Cr	4,6 $\pm$ 2,7 ^a	<MQL	6,6 $\pm$ 3,7 ^a	8,6 $\pm$ 2 ^a	26,8 $\pm$ 1 ^a	<MQL	8 $\pm$ 0,2 ^b	6,2 $\pm$ 1,8 ^b
	Cu	58,5 $\pm$ 3,1 ^a ^b	56,4 $\pm$ 6,1 ^{ab}	93 $\pm$ 6,9 ^a	43,8 $\pm$ 39,8 ^b	67,7 $\pm$ 4 ^b	58,5 $\pm$ 4 ^c	85 $\pm$ 2 ^a	14,2 $\pm$ 5 ^d
	Se	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	3 $\pm$ 0,1 ^b	2,8 $\pm$ 0,1 ^b	3,4 $\pm$ 0,2 ^a	1,1 $\pm$ 0,1 ^c
	Fe	1069 $\pm$ 321 ^{bc}	67 $\pm$ 2,5 ^c	2178 $\pm$ 1035 ^{ab}	3065 $\pm$ 660 ^a	10675 $\pm$ 97 ^a	218,4 $\pm$ 27,3 ^c	2811 $\pm$ 233 ^b	2368 $\pm$ 579 ^b
Tossici	As	1,9 $\pm$ 0,2 ^b	2,4 $\pm$ 0,1 ^{ab}	3,3 $\pm$ 0,4 ^{ab}	6,58 $\pm$ 4 ^a	11,6 $\pm$ 0,2 ^d	28,2 $\pm$ 0,2 ^a	12,9 $\pm$ 0,8 ^c	15,7 $\pm$ 1,2 ^b
	Pb	1,1 $\pm$ 0,1 ^b	<MQL	4,4 $\pm$ 1,7 ^a	1,6 $\pm$ 0,27 ^b	5,6 $\pm$ 0,2 ^a	0,4 $\pm$ 0,01 ^c	4,3 $\pm$ 0,4 ^b	<MQL
	Cd	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
	Sb	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
	Hg	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
	Al	1405,9 $\pm$ 363 ^b	28,6 $\pm$ 4,7 ^b	3303,3 $\pm$ 1484 ^a	3687 $\pm$ 814 ^a	14209,6 $\pm$ 544 ^a	337,7 $\pm$ 47,8 ^c	4006 $\pm$ 137 ^b	3424,8 $\pm$ 1007,7 ^b
	Ni	1,9 $\pm$ 0,6 ^b	<MQL	5,4 $\pm$ 2 ^a	5,8 $\pm$ 1,7 ^a	14 $\pm$ 1 ^a	1,3 $\pm$ 0,2 ^d	6,6 $\pm$ 0,5 ^b	3,2 $\pm$ 0,4 ^c

Per quanto riguarda il confronto delle tuniche, gli elementi selenio (Se), cadmio (Cd), antimonio (Sb) e mercurio (Hg) non hanno fatto parte dell'analisi in quanto i valori erano < MQL. Le quattro specie non hanno mostrato differenze significative nell'accumulo di zinco (Zn); rame (Cu) e arsenico (As) hanno mostrato solo leggere differenze (Tabella 5). Inoltre, ad esclusione di *P. mammillata* che ha riportato valori < MQL, le restanti tre specie non hanno mostrato differenze significative nell'accumulo di cromo (Cr) (AA 9 ± 2 ; CR $4,8 \pm 2,7$; SP 7 ± 4). Il ferro (Fe) è risultato essere l'elemento più diversamente accumulato nella tunica delle quattro specie, costituendo quattro raggruppamenti in seguito al test di Duncan: AA 3065 ± 660^a , SP 2178 ± 1036^{ab} , CR 1069 ± 321^{bc} , PM 67 ± 3^c . In questo ultimo caso si può affermare che, per quanto riguarda l'accumulo di ferro nella tunica, *A. aspersa* presenta differenze con *C. robusta* e *P. mammillata*, ma non è significativamente differente da *S. plicata* e viceversa; *S. plicata* presenta differenze significative con *P. mammillata* ma

non con *C. robusta*; infine, *C. robusta* e *P. mammillata* non presentano tra di loro differenze significative.

Per quanto riguarda il confronto nell'accumulo di metalli pesanti (HM) tra i tessuti interni delle quattro specie, cadmio (Cd), antimonio (Sb) e mercurio (Hg) non hanno fatto parte dell'analisi in quanto presentavano valori < MQL. Ad esclusione di questi ultimi, le medie di accumulo di tutti gli elementi sono significativamente diverse in almeno due delle quattro specie (Tabella 7). Gli elementi nichel (Ni) e arsenico (As) sono risultati significativamente differenti, nel loro accumulo, tra le quattro specie, formando di conseguenza quattro gruppi distinti nel test di Duncan.

L'analisi sulle differenze di contenuto di metalli pesanti tra i due tessuti (tunica e IBT) all'interno della stessa specie ha mostrato differenze significative non per tutti gli elementi (Tabella 8). Ad esclusione degli elementi mancanti, *C. robusta* ha mostrato differenze significative nell'accumulo di tutti gli elementi tra i due tessuti analizzati, i quali si sono accumulati prevalentemente nei tessuti interni. *Phallusia mammillata* ha mostrato differenze significative tra i due tessuti, ad esclusione del rame (Cu), il quale si è distribuito quasi equamente tra le due matrici. Anche qui, gli elementi si sono distribuiti maggiormente nei IBT della specie, ad esclusione dello zinco (Zn) che ha riportato valori significativamente maggiori nella tunica di *P. mammillata*. La specie *S. plicata* ha riportato differenze significative nell'accumulo di zinco (Zn), cobalto (Co) e arsenico (As), presentando valori significativamente superiori nei IBT. Il resto degli elementi, sempre ad esclusione dei valori mancanti (< MQL), non ha riportato differenze significative. Infine, *A. aspersa* ha riportato differenze significative, sempre con i valori maggiori nei IBT, per i soli vanadio (V) e arsenico (As).

Tabella 8. Differenza di contenuto nella quantità degli elementi metallici tra tunica (-t) e tessuti interni (-b) all'interno di ogni specie analizzata (media $\pm$ deviazione standard; $n = 3$). I valori seguiti dalle stesse lettere (a-e) non presentano una differenza significativa secondo il Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ($p < 0,05$). < MQL = limite di quantificazione del metodo. CR = Ciona robusta; PM = Phallusia mammillata; SC = Styela clava; SP = Styela plicata; AA = Ascidella aspersa.

(mg/Kg)		CR-b	CR-t	PM-b	PM-t	SP-b	SP-t	AA-b	AA-t
Minerali	Zn	71,3 $\pm$ 2 ^a	27,1 $\pm$ 5,9 ^b	70,7 $\pm$ 3,5 ^b	181 $\pm$ 4,7 ^a	101 $\pm$ 3,8 ^a	62 $\pm$ 22 ^b	25,4 $\pm$ 3 ^a	283,4 $\pm$ 256 ^a
	Mn	184,5 $\pm$ 0,9 ^a	40,2 $\pm$ 13,4 ^b	23,9 $\pm$ 1,5 ^a	4,1 $\pm$ 2,9 ^b	180 $\pm$ 3 ^a	113,3 $\pm$ 42 ^a	33,5 $\pm$ 12 ^a	372 $\pm$ 229 ^a
	Co	4,4 $\pm$ 0,1 ^a	0,8 $\pm$ 0,2 ^b	<MQL	<MQL	2,7 $\pm$ 0,2 ^a	1,5 $\pm$ 0,6 ^b	<MQL	3,5 $\pm$ 2,5
	V	149,4 $\pm$ 9,2 ^a	9 $\pm$ 2,9 ^b	1142,6 $\pm$ 91 ^a	82,8 $\pm$ 4,4 ^b	20,4 $\pm$ 1,8 ^a	14,3 $\pm$ 5 ^a	229,5 $\pm$ 81,8 ^a	50 $\pm$ 15 ^b
	Cr	26,8 $\pm$ 1 ^a	4,6 $\pm$ 2,7 ^b	<MQL	<MQL	8 $\pm$ 0,2 ^a	6,6 $\pm$ 3,7 ^a	6,2 $\pm$ 1,8 ^a	8,6 $\pm$ 2 ^a
	Cu	67,7 $\pm$ 4 ^a	58,5 $\pm$ 3,1 ^b	58,5 $\pm$ 4 ^a	56,4 $\pm$ 6,1 ^a	85 $\pm$ 2 ^a	93 $\pm$ 6,9 ^a	14,2 $\pm$ 5 ^a	43,8 $\pm$ 39,8 ^a
	Se	3,0 $\pm$ 0,1	<MQL	2,8 $\pm$ 0,1	<MQL	3,4 $\pm$ 0,2	<MQL	1,1 $\pm$ 0,1	<MQL
	Fe	10675 $\pm$ 97 ^a	1069 $\pm$ 321 ^b	218,4 $\pm$ 27,3 ^a	67 $\pm$ 2,5 ^b	2811 $\pm$ 233 ^a	2178 $\pm$ 1035 ^a	2368 $\pm$ 579 ^a	3065 $\pm$ 660 ^a
Tossici	As	11,6 $\pm$ 0,2 ^a	1,9 $\pm$ 0,2 ^b	28,2 $\pm$ 0,2 ^a	2,5 $\pm$ 0,1 ^b	12,9 $\pm$ 0,8 ^a	3,3 $\pm$ 0,4 ^b	15,7 $\pm$ 1,2 ^a	6,58 $\pm$ 4 ^b
	Pb	5,6 $\pm$ 0,2 ^a	1,1 $\pm$ 0,1 ^b	<MQL	<MQL	4,3 $\pm$ 0,4 ^a	4,4 $\pm$ 1,7 ^a	<MQL	1,6 $\pm$ 0,27
	Cd	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
	Sb	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
	Hg	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
	Al	14209,6 $\pm$ 544 ^a	1405,9 $\pm$ 363 ^b	337,7 $\pm$ 47,8 ^a	28,6 $\pm$ 4,7 ^b	4006 $\pm$ 137 ^a	3303,3 $\pm$ 1484 ^a	3424,8 $\pm$ 1007,7 ^a	3687 $\pm$ 814 ^a
	Ni	14 $\pm$ 1 ^a	1,9 $\pm$ 0,6 ^b	1,3 $\pm$ 0,2	<MQL	6,6 $\pm$ 0,5 ^a	5,4 $\pm$ 2 ^a	3,2 $\pm$ 0,4 ^a	5,8 $\pm$ 1,7 ^a

4.3.1 Analisi multivariata della composizione minerale della tunica e del tessuto interno del corpo di ascidie solitarie: un approccio PCA

I primi due assi della PCA basati sulle composizioni minerali della tunica (*P. mammillata* = PM-T; *C. robusta* = CR-T; *A. aspersa* = AA-T; *S. plicata* = SP-T) e dei tessuti interni del corpo delle ascidie (*P. mammillata* = PM-B; *C. robusta* = CR-B; *A. aspersa* = AA-B; *S. plicata* = ST-B) della laguna di Venezia spiegano cumulativamente quasi il 99,42% della variabilità (Figura 22) e sono dunque altamente rappresentativi del profilo del contenuto minerale delle quattro specie. Il secondo asse (0,44%) spiega la correlazione positiva tra il vanadio (V) e PM-B.

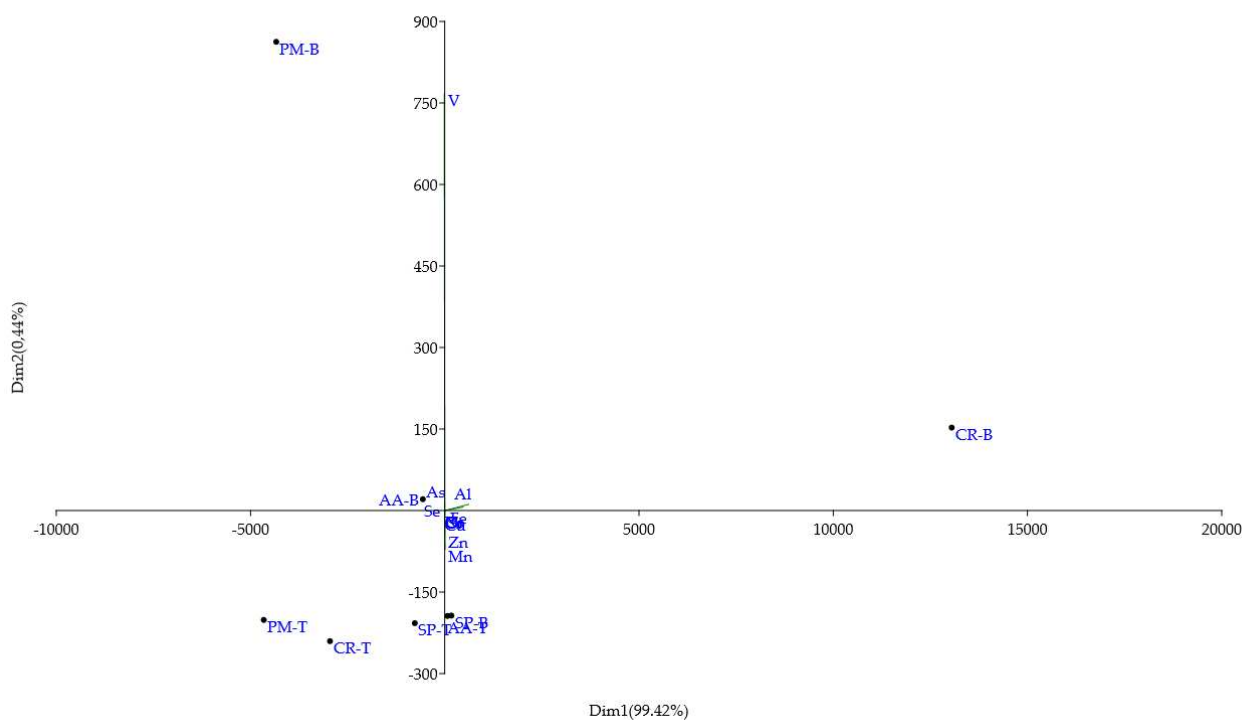


Figura 22. Il punteggio PCA e il biplot hanno incorporato le quattro specie di ascidia insieme alla loro composizione minerale della tunica (*P. mammillata* = PM-T; *C. robusta* = CR-T; *A. aspersa* = AA-T; *S. plicata* = SP-T) e del tessuto interno del corpo (*P. mammillata* = PM-B; *C. robusta* = CR-B; *A. aspersa* = AA-B; *S. plicata* = ST-B).

5. Discussione

In questo studio sono stati analizzati i profili nutrizionali e la contaminazione da metalli pesanti in cinque ascidie solitarie della laguna di Venezia. I risultati hanno evidenziato differenze significative sia per quanto riguarda la componente acidica, sia per quanto riguarda la componente minerale delle specie campionate. Le specie appartenenti all'ordine Phlebobranchia, considerate non edibili, hanno mostrato valori nutrizionali al pari delle specie tradizionalmente consumate. I profili nutrizionali di *S. clava* e *S. plicata* campionate nella laguna di Venezia presentano discrepanze parziali rispetto a quanto osservato da Loda *et al.* (2006) in Corea del Sud e da Zhao e Li (2016) in Corea del Nord, ma concordano con i dati di Gao *et al.* (2023). In particolare, in Corea del Nord *S. clava* evidenziava percentuali inferiori di acido palmitico (10,3-13,2%) e stearico (3,6-4%), mentre i livelli di acido miristico (3,7-6,6%) risultavano simili a quelli rilevati in questo studio. Analogamente, in Corea del Sud *S. plicata* mostrava un contenuto maggiore di acido palmitico (24,33%) e stearico (15,66%) e un valore inferiore di acido miristico (1,73%). Al contrario, per *P. mammillata*, i valori di acido miristico e palmitico sono in linea con quelli riscontrati da Slantchev *et al.* (2002) nel genere *Phallusia sp.* in Turchia. *Styela clava* esibisce valori di acido palmitoleico e oleico coerenti con Zhao e Li (2016), mentre *S. plicata* si discosta dai dati di Loda *et al.* (2006), che riportano un valore più alto di acido oleico (19,17%) e più basso di acido palmitoleico (5,2%). Per quanto riguarda il Σ PUFA, *A. aspersa* non presenta i valori osservati in *S. clava*, ma è in accordo con i valori riportati da Loda *et al.* (2006), mentre *S. plicata* è in contrasto con Zhao e Li (2016), che indicano un valore inferiore (22,7%). Infine, *S. clava* mostra valori discordanti di EPA ma coerenti di DPA rispetto a Loda *et al.* (2006), mentre *S. plicata* presenta valori di entrambi gli acidi grassi in linea con Zhao e Li (2016) e Gao *et al.* (2023).

L'acido palmitico in particolare contribuisce per più del 50% del totale di acidi grassi saturi (SFA), suggerendo che le ascidie potrebbero selettivamente accumulare C16:0 nei loro tessuti interni (IBT). Tuttavia, questo risultato non sorprende in quanto l'acido palmitico risulta essere, tra gli SFA, il più diffuso nel regno animale essendo il precursore di svariati acidi grassi (FA) a catena più lunga (Carta *et al.*, 2017). L'EPA e il DHA, due acidi grassi polinsaturi (PUFA), sono entrambi categorizzati come ω 3 (n-3). Gli n-3, in generale, sono stati correlati a una buona qualità dell'invecchiamento e, dunque, ad una buona qualità della vita. Tuttavia, il corpo umano non produce in maniera efficiente gli n-3, rendendo necessaria una loro introduzione nella dieta tramite l'assunzione di prodotti di derivazione marina (come pesci e olii). Diversi studi hanno dimostrato che EPA e DHA sono importanti per un corretto sviluppo fetale, compresa la funzione neuronale, retinica e immunitaria. L'EPA e il DHA possono influenzare molti aspetti della funzione cardiovascolare, tra cui l'infiammazione, l'arteriopatia periferica, gli eventi coronarici maggiori e l'anticoagulazione, nonché sono promettenti

nella prevenzione di varie patologie, nella gestione del peso e nella funzione cognitiva in individui affetti da forme lievi del morbo di Alzheimer (Swanson *et al.*, 2012). Inoltre, gli ω -3 mostrano effetti positivi come anti-tumoriali in linee cellulari ematologiche (Moloudizargari *et al.*, 2018).

Tra le cinque specie esaminate, quella che ha presentato il valore medio più elevato di EPA è *P. mammillata*, mentre quella con il valore medio più elevato di DHA è *C. robusta* (CR), seguita subito da *S. clava*, con valori di $21,06 \pm 0,03$ g/100g, $17,92 \pm 0,05$ g/100g e $17,49 \pm 0,02$ g/100g, rispettivamente. I valori del presente studio sono in linea con i valori di EPA (intervallo di valori da 6.82 g/100g a 30.82 g/100g) e DHA (intervallo di valori da 2.59 g/100g a 23.08 g/100g) riscontrati in Zhao e Li (2016).

Nel presente studio *S. plicata* ha riportato un valore del rapporto PUFA/SFA pari a $1,37 \pm 0,005$ contro il valore di 0.45 riportato da Zhao e Li per esemplari campionati in Corea. Per quanto riguarda la ratio n-6/n-3 il valore di *S. plicata* in questo studio è di $0,12 \pm 0,001$ mentre Zhao e Li riportano 0.16. Gao et al., (2016) per esemplari di *S. plicata* campionati in Cina, riportano valori delle ratio PUFA/SFA e n-6/n-3 di 0.92 e 0.11, rispettivamente. Nel presente studio i valori superiori del rapporto PUFA/SFA e i valori generalmente inferiori del rapporto n-6/n-3 di *S. plicata* e *S. clava* NIS, confrontati con i medesimi valori delle due specie native, spiccano in positivo ed evidenziano il potenziale di sfruttamento offerto dalle prime. Confrontando le ratio di interesse, ovvero Σ PUFA/ Σ SFA e Σ n-6/ Σ n-3, i risultati statistici hanno mostrato differenze significative tra ciascuna specie e differenze significative tra le due Styelidae e il resto delle specie analizzate (che hanno a loro volta mostrato differenze significative) rispettivamente. Risulta essere particolarmente interessante come il rapporto PUFA/SFA di *C. robusta* e *P. mammillata* (Phlebobranchia) sia quello più alto tra tutte le specie e sia, di conseguenza, maggiore di quello delle due specie edibili dell'ordine Stolidobranchia. Considerando la Σ n-6/ Σ n-3 le due Styelidae presentano valori significativamente superiori rispetto a quelli presentati da *P. mammillata* e *C. robusta* (Phlebobranchia), mentre la specie con i valori significativamente più alti è *A. aspersa* (Phlebobranchia). L'indice PUFA/SFA viene normalmente utilizzato per determinare l'impatto della dieta sul sistema cardiovascolare. La logica alla base dell'indice è che i PUFA nella dieta sono in grado di abbassare i livelli di colesterolo LDL (*Low Density Lipoproteins*) e portano a bassi livelli di colesterolo sierico, mentre gli SFA contribuiscono ad elevati valori di colesterolo nel sangue con effetti negativi sulla salute. Di conseguenza, più alto è il valore del rapporto PUFA/SFA, più è considerabile positivo l'effetto di un particolare alimento (Chen e Liu, 2020). Tra le specie analizzate *C. robusta* presenta la ratio Σ PUFA/ Σ SFA maggiore, con un valore di 1.69; contrariamente, *A. aspersa* presenta i valori più bassi Σ PUFA/ Σ SFA (1.00 ± 0.002), con differenze significative tra tutte le specie. In ogni caso, tutte le

cinque specie riportano valori ≥ 1 . Questi valori sono paragonabili, se non in alcuni casi maggiori, a quelli di numerosi pesci, pesci azzurri e bivalvi consumati e/o allevati (Fernandes *et al.*, 2014; Hosseini *et al.*, 2014; Rincón-Cervera *et al.*, 2020; Rombenso *et al.*, 2016; Skalecki *et al.*, 2020; Tonial *et al.*, 2014).

Gli acidi grassi n-3 presentano numerosi effetti benefici e, come il rapporto PUFA/SFA, anche il rapporto n-6/n-3 è un ottimo indicatore della qualità di un prodotto alimentare. Una quantità elevata di n-6 e una quantità carente di n-3 risulta essere una proporzione probabilmente dannosa per l'uomo: un elevato rapporto n-6/n-3 è problematico in quanto eccessive quantità di acido arachidonico (C20:4), un FA n-6, favoriscono l'infiammazione, costituendo un aggravante nelle malattie cardiache e in altre malattie (Young, 2009). Esperimenti condotti su cavia hanno dimostrato che un basso rapporto n-6/n-3 (1:1 e 5:1) ha un effetto benefico sui fattori di rischio cardiovascolare, avendo effetti antinfiammatori e anti-stress ossidativo e migliorando la funzione endoteliale. Un elevato rapporto n-6/n-3 (20:1) ha indotto effetti avversi su cavia da laboratorio (Yang *et al.*, 2016).

Tra i metalli analizzati, 8 risultano essere minerali fisiologici essenziali negli organismi, mentre 7 appartengono alla categoria dei metalli pesanti; questi ultimi sono caratterizzati da un'alta densità e in elevate quantità risultano essere tossici per gli organismi viventi.

In particolare, i campioni analizzati in questo studio si sono distinti per la presenza di minerali essenziali come ferro (Fe) e manganese (Mn). *Ascidella aspersa* ha mostrato i valori più elevati per entrambi gli elementi, entrambi nella tunica (Fe: 3065 ± 660 mg/Kg; Mn: 372 ± 229 mg/Kg); *Ciona robusta* presentava le concentrazioni maggiori nei tessuti interni (Fe: 10675 ± 97 mg/Kg; Mn: 10675 ± 97 mg/Kg), risultati che rafforzano precedenti osservazioni in popolazioni asiatiche (Lee *et al.*, 1998; Zhao e Li, 2016) e greche (Tzafriri-Milo *et al.*, 2019). Al contrario, *P. mammillata* ha evidenziato concentrazioni di ferro e manganese nella tunica inferiori rispetto alle altre specie analizzate e rispetto a quanto riscontrato in *Phallusia nigra* sulla costa israeliana (Tzafriri-Milo *et al.*, 2019). Il ferro e il manganese sono elementi essenziali per gli esseri umani. Il primo è un minerale di elevata importanza in quanto elemento fondamentale nel processo di respirazione (permettendo il legame dell'ossigeno all'emoglobina), nella produzione di energia e nella regolazione del sistema immunitario. Inoltre, nei neonati, favorisce lo sviluppo cerebrale e contrasta l'anemia, mentre nelle donne può agevolare il recupero post-parto e migliorare la qualità del latte materno. Il secondo, cruciale per gli adulti, è vitale per il metabolismo di lipidi, aminoacidi e carboidrati, oltre a contribuire alla difesa antiossidante (Farag *et al.*, 2023).

I valori di zinco (Zn) in *S. plicata*, sia nella tunica che nei tessuti interni, sono coerenti con quanto riportato in Asia (Zhao & Li, 2016). Lo zinco è un minerale essenziale per sostenere la crescita e la funzione cerebrale nella prima infanzia; contribuisce inoltre al benessere postnatale delle madri che allattano e a garantire un adeguato apporto di latte materno. Negli adulti ha un ruolo essenziale nella funzione di difesa, nella guarigione delle ferite e nella sintesi del DNA (Shankar e Prasad, 1998).

Il selenio (Se) non è stato rilevato nella tunica di nessuna specie, ma era presente nei tessuti interni, con *S. plicata* che mostrava la concentrazione più alta ($3,4 \pm 0,2$ mg/kg). Il valore rilevato nei IBT di *S. plicata* risulta tuttavia inferiore a quanto osservato da Zhao e Li (2016) in Corea, dove era presente anche nella tunica. Il selenio è un nutriente essenziale per l'eliminazione dei radicali liberi, la difesa delle cellule dal danno ossidativo e la protezione dalle patologie cardiovascolari. La dose giornaliera consigliata di selenio in un adulto è di 55 µg; il contenuto rilevato in *S. plicata* soddisfa dunque il fabbisogno giornaliero. Il deficit di selenio può causare malattie legate all'aumento dei radicali liberi, come l'invecchiamento precoce, le malattie infiammatorie croniche e le malattie degenerative (EFSA, 2014). Tra le quattro specie analizzate per la presenza di metalli, *C. robusta* e *P. mammillata* hanno quasi sempre mostrato differenze significative nell'accumulo di minerali e metalli pesanti tra la tunica (T) e i tessuti interni (IBT), con l'eccezione del rame (Cu) in *P. mammillata*. In *S. plicata*, solo lo zinco (Zn), il cobalto (Co), e l'arsenico (As) riportano valori significativamente differenti tra T e IBT. In *A. aspersa* solamente il vanadio (V) e l'arsenico (As) presentano differenze significative nel loro accumulo tra T e IBT.

Per quanto riguarda gli elementi tossici, il cadmio (Cd), l'antimonio (Sb) e il mercurio (Hg) non sono stati riscontrati in quantità significanti nelle quattro specie (< MQL); mentre l'alluminio (Al) risulta essere di gran lunga l'elemento maggiormente accumulato in tutte le specie, venendo maggiormente accumulato nei tessuti interni di *C. robusta* e *P. mammillata* e non mostrando significative differenze nel suo accumulo tra tunica e tessuti interni di *S. plicata* e *A. aspersa*. I tessuti interni di *C. robusta* presentano il valore di alluminio più elevato, che risulta essere anche il valore più alto riscontrato in questa analisi (14209 ± 544 mg/Kg). Questa ultima osservazione è in linea con i risultati ottenuti da Zhao e Li (2016) e Roni T-M *et al.* (2019), in cui l'alluminio risulta essere l'elemento tossico maggiormente rappresentato (soprattutto in IBT) nonostante le specie di ascidie analizzate nei due studi citati siano in gran parte differenti da quelle analizzate in questo studio. I dati suggeriscono dunque che le ascidie tendono ad accumulare alluminio in elevate quantità; tuttavia, gli elevati valori di alluminio riscontrati in questa analisi potrebbero essere almeno in parte dovuti a una contaminazione dei campioni in quanto le piastre Petri contenenti i campioni di T e IBT da analizzare, durante il processo di liofilizzazione e il trasporto nel laboratorio di chimica per le analisi, erano

ricoperte da porzioni di rotolo di alluminio. Si può inoltre affermare che, a parità di sostanza analizzata, i tessuti interni presentano generalmente quantità maggiori di metalli rispetto alla tunica, sia che si tratti di minerali fisiologici che di elementi tossici; questo risulta particolarmente evidente per il vanadio (V) e il ferro (Fe) in *C. robusta* e *P. mammillata*.

Il contenuto di vanadio (V) mostra valori elevati sia nella tunica ($82,8 \pm 4,4$ mg/Kg) che nei tessuti interni del corpo di *P. mammillata* ($1142,6 \pm 91$ mg/Kg), seguita da *A. aspersa* ($229,5 \pm 81,8$ mg/Kg) e *C. robusta* ($149,4 \pm 9,2$ mg/Kg). È noto che le ascidie accumulano vanadio nelle cellule del sangue e nei tessuti corporei in misura maggiore rispetto ad altri invertebrati acquatici (Azumi *et al.*, 2007; Odate e Pawlik, 2007; Michibata e Ueki, 2012); questo meccanismo è più evidente nei Phlebobranchia che negli Stolidobranchia (Michibata e Ueki, 2012). Il vanadio, in generale, risulta essere spesso presente e in elevate quantità nei tessuti interni (ma anche nella tunica) di varie specie di tunicati solitari in diversi studi. Infatti, i risultati trovati in questa analisi sono in linea con quelli di Zhao e Li (2016) e di Roni *et al.* (2019): i primi hanno riscontrato elevati valori di vanadio nei tessuti interni di *Ascidia. sp* e moderati valori in *C. intestinalis*; mentre i secondi hanno riscontrato elevati valori di vanadio (insieme a ferro ed alluminio) in *P. nigra* e *M. exasperatus*. Per quanto riguarda i IBT di *S. plicata*, Zhao e Li (2016) riportano un valore di vanadio di 22,38 mg/Kg, in linea con i $20,4 \pm 1,8$ mg/Kg riportati nel presente studio. La ragione del ruolo del vanadio nei tunicati non è ancora nota, anche se si suppone che fornisca difese antipredatorie e antivegetative (Odate e Pawlik, 2007; Lambert *et al.*, 2016), pur rimanendo a livelli non tossici per l'animale stesso (Odate e Pawlik, 2007). L'ascidia solitaria *P. nigra* è stata studiata per la presenza e la localizzazione del vanadio nei suoi tessuti e per valutare le proprietà difensive dei composti contenenti questo elemento (Odate e Pawlik, 2007). Tessuti interni e sangue contenevano le più alte concentrazioni di vanadio, seguite dalla porzione superficiale della tunica. I risultati dei test di alimentazione in laboratorio con il pesce labro testa blu, *Thalassoma bifasciatum* (Bloch, 1791), hanno individuato il vanadil solfato ($\text{VOSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e il vanadato di sodio (Na_3VO_4) come composti sgradevoli per i pesci. In particolare i complessi acidi di acqua-vanadio risultano sgradevoli per *T. bifasciatum*, mostrando anche attività antimicrobica contro quattro batteri noti come patogeni di invertebrati marini. Considerate le elevate quantità di vanadio riscontrate in questo studio, in linea con altri studi simili, e considerati i citati studi che indagano le sue funzioni, si può suggerire il ruolo chiave di questo elemento nei meccanismi anti-predatori e anti-parassitari.

In generale, il contenuto di metalli pesanti trovato nelle ascidie della laguna di Venezia è coerente con gli studi di Zhao e Li (2016), Ydin-Önen (2016) e Tzafiriri-Milo *et al.* (2019) nelle ascidie tradizionalmente consumate. Inoltre, le concentrazioni sono paragonabili a quelle del mollusco

commestibile *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819, ampiamente allevato nella Laguna di Venezia e in gran parte del Mare Adriatico (Giusti e Zhang, 2002; Orescanin *et al.*, 2006; Vernocchi *et al.*, 2007). Inoltre, i contenuti di arsenico (As), piombo (Pb) e rame (Cu) nei campioni analizzati in questo studio (tunica e tessuti interni) sono simili ai valori misurati nelle popolazioni di *M. galloprovincialis* dell'Adriatico centrale e settentrionale (Orescanin *et al.*, 2006; Vernocchi *et al.*, 2007). I valori di piombo e arsenico rilevati nelle specie analizzate in questo studio sono coerenti con le concentrazioni riscontrate nelle popolazioni di *M. galloprovincialis* campionate nella laguna di Venezia da Giusti e Zhang (2002), mentre i contenuti di rame (Cu) e nichel (Ni) sono più elevati. Inoltre, il presente studio riporta valori di piombo (Pb) decisamente inferiori a quelli riportati da Widdows *et al.* (1997) in *M. galloprovincialis*. Tuttavia, bisogna specificare che i valori riportati da Widdows *et al.* cambiano notevolmente in base al sito di campionamento, variando da un minimo di 6,18 mg/Kg a Chioggia (che rimane comunque superiore al valore massimo riscontrato per le ascidie di questo studio, pari a $5,6 \pm 0,2$ mg/Kg negli IBT di *C. robusta*) a un massimo di 80,26 mg/Kg. Il Cadmio (Cd) e il mercurio (Hg) nel presente studio non sono stati riscontrati ($< \text{MQL}$), a differenza dei, seppur bassi, valori trovati da Widdows *et al.* (1997) (valore massimo di cadmio equivalente a 4,54 mg/Kg). Il nichel (Ni) in *M. galloprovincialis* è stato rilevato con un valore massimo di 24,48 mg/Kg contro un massimo, nel presente studio, di 14 mg/Kg di *C. robusta*. Tuttavia, gli altri valori di nichel riportati da Widdows *et al.* risultano inferiori (valore massimo di 1,62 mg/Kg) di quelli del presente studio, ad esclusione della tunica di *P. mammillata*.

Inoltre, in un recente studio condotto nella porzione centrale del Mare Adriatico, Malva *et al.* (2024) hanno analizzato il profilo acidico FA di *Mytilus galloprovincialis*. I risultati ottenuti da Malva *et al.* sono paragonabili a quelli del presente studio: i primi riportano un intervallo di valori nella quantità di SFA totali da 23,17 g/100g a 27,23 g/100g e un intervallo di valori nella quantità di PUFA totali da 53,28 g/100g a 57,73 g/100g; il secondo riporta un intervallo di valori delle cinque specie che oscilla tra $31,27 \pm 0,06$ g/100g e $38,91 \pm 0,01$ g/100g per quanto riguarda SFA e tra $39,09 \pm 0,09$ g/100g e $55,16 \pm 0,09$ g/100g per i PUFA.

6. Conclusioni

Il presente studio ha permesso di ampliare l'attuale conoscenza sulle caratteristiche biochimiche delle ascidie solitarie native del Mediterraneo, in un'ottica di sfruttamento delle stesse a fini commerciali, di ricerca biomedica e, soprattutto, alimentari. I risultati ottenuti evidenziano che specie appartenenti all'ordine Phlebobranchia, possono avere alte qualità nutrizionali al pari di quelle tradizionalmente consumate (ordine Stolidobranchia). Questo conferma il ruolo dei tunicati come ottima fonte di approvvigionamento di acidi grassi come DHA, EPA e, in generale, $\omega 3$ e di minerali essenziali come ferro, selenio e zinco. I rapporti $\omega 6/\omega 3$ (n-6/n-3) e PUFA/SFA delle specie analizzate sono paragonabili, se non migliori in alcuni casi, ai valori riscontrati in diversi studi su pesci regolarmente consumati. Le specie analizzate in questo studio risultano essere nutrizionalmente simili al bivalve *Mytilus galloprovincialis* (cozza del Mediterraneo), ampiamente allevato a scopo di consumo umano nel Mar Adriatico che, in aggiunta, ha presentato valori di metalli pesanti ritenuti dannosi per la salute in quantità superiore rispetto alle ascidie analizzate nella laguna di Venezia. Nonostante queste similitudini con una specie ampiamente commercializzata, il consumo o lo sfruttamento dei tunicati evidenzia un problema di biosicurezza legato all'accumulo di inquinanti nei tessuti edibili. L'Unione Europea definisce i limiti massimi di biotossine per la commercializzazione dei tunicati, come indicato nel Regolamento (CE) n. 853/2004, con particolare attenzione alle tossine paralitiche (PTX, limite massimo consentito 800 μg di equivalente tossina paralitica per Kg di prodotto) e alle tossine di memoria (YTX, limite massimo consentito 1 mg di equivalente tossina di memoria per Kg di prodotto). Tuttavia, nel Mediterraneo, l'approvvigionamento è sostenuto da esemplari raccolti in natura in assenza di controlli. In questo contesto, il consumo di ascidie di allevamento piuttosto che di ascidie selvatiche potrebbe ridurre il rischio di superamento dei limiti imposti, ma attualmente poche normative ne consentono l'allevamento, rendendo l'approvvigionamento in natura la principale possibilità di sfruttamento e commercializzazione. Ad oggi il mercato e il consumo di ascidie in Europa è del tutto limitato e legato a questioni culturali e ad una scarsa conoscenza dell'argomento. Tuttavia, esistono realtà innovative per l'utilizzo commerciale in ambito alimentare: recentemente, l'azienda norvegese Pronofa, nata con l'obiettivo di cercare e produrre proteine alternative sostenibili, ha prodotto una tipologia di hamburger utilizzando carne a base di *Ciona intestinalis*, definendola “la carne più rispettosa del clima al mondo” (<https://pronofa.no/>). Questo apre nuovi scenari per la disponibilità e la promozione di alimenti e nutrienti alternativi e convenienti provenienti da fonti non convenzionali. *Phallusia mammillata* e *Ciona robusta*, tradizionalmente considerate non commestibili, presentano un profilo di acidi grassi di buona qualità che le rende interessanti per la formulazione di nuovi mangimi alternativi o integratori per la salute umana. Indipendentemente dal carattere invasivo dei tunicati, quindi, il loro valore commerciale

andrebbe riconosciuto: l'opportunità di sfruttamento che ne deriva potrebbe promuovere benefici ecologici attraverso la rimozione delle ascidie dall'ambiente, mitigandone l'invasione. La creazione di microeconomie circolari potrebbe dunque suggerire soluzioni sostenibili per gestire le problematiche delle ascidie non-indigene.

7. Bibliografia

- Afoullouss S *et al.* Treasures from the Deep: Characellides as Anti-Inflammatory Lipoglycotriptides from the Sponge *Characella pachastrelloides*. *Organic Letters* 2019;21:246–251.
- Aldred N e Clare A S. Mini-review: Impact and dynamics of surface fouling by solitary and compound ascidians. *Biofouling* 2014;30:259–270.
- Arsenault G *et al.* Temporal and spatial development of an infestation of *Styela clava* on mussel farms in Malpeque Bay, Prince Edward Island, Canada. *Aquatic Invasions* 2009;4:189–194.
- Artin M *et al.* The spread of *Styela clava* Herdman, 1882 (Tunicata, Ascidiacea) in European waters. *Aquatic Invasions* 2007;2:378-390.
- Arumugam V *et al.* Purification, Characterization and Antibacterial Properties of Peptide from Marine Ascidian *Didemnum* sp. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* 2020;26:201–208.
- Aydın-Önen S. *Styela plicata*: a new promising bioindicator of heavy metal pollution for eastern Aegean Sea coastal waters. *Environmental Science and Pollution Research* 2016;23:21536-21553.
- Ayre D J *et al.* Genetic evidence for contrasting patterns of dispersal in solitary and colonial ascidians. *Marine Biology* 1997;130:51-61.
- Azumi K *et al.* cDNA microarray analyses reveal candidate marker genes for the detection of ascidian disease in Korea. *Zool. Sci.* 2007;24:1231–1240.
- Bakker J A *et al.* The use of food grade oil in the prevention of vase tunicate fouling on mussel aquaculture gear. *Management of Biological Invasions* 2011;2:15–25.
- Barausse A *et al.* An integrated approach to prevent the erosion of salt marshes in the lagoon of Venice. *EQA-International Journal of Environmental Quality* 2015;18:43-54.
- Blum J C *et al.* The non-native solitary ascidian *Ciona intestinalis* (L.) depresses species richness. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 2007;342:5–14.

- Bock D G *et al.* Multilocus genetic analyses differentiate between widespread and spatially restricted cryptic species in a model ascidian. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 2012;279:2377–2385.
- Bouchet P *et al.* Marine biodiversity discovery: the metrics of new species descriptions. *Frontiers in Marine Science* 2023;10:929-989.
- Bourque D *et al.* Reproduction and early life history of an invasive ascidian *Styela clava* Herdman in Prince Edward Island, Canada. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 2007;342:78–84.
- Boussellaa W *et al.* Lessepsian migration and parasitism: richness, prevalence and intensity of parasites in the invasive fish *Sphyraena chrysotaenia* compared to its native congener *Sphyraena sphyraena* in Tunisian coastal waters. *PeerJ*, 2018;6:e5558.
- Brunetti R e Menin F. Ascidiaceans of the Laguna Veneta: Distribution and Ecological Observations. *Italian Journal of Zoology* 1977;44:337-352.
- Brunetti R *et al.* Morphological evidence that the molecularly determined *Ciona intestinalis* type A and type B are different species: *Ciona robusta* and *Ciona intestinalis*. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 2015;53:186–193.
- Brunetti R, Mastrototaro F. *Ascidiacea of the European waters*. 51. Milano: Calderini/Edagricole, 2017.
- Bullard *et al.* Current trends in invasive ascidian research. *Invasive species: detection, impact and control*. Nova Science Publishers 2009:57-79.
- Burighel P e Cloney R A. 1997. Urochordata: Ascidiacea. In: *Microscopical anatomy of invertebrates* (Wiley-Liss) New York: Cnii Research, 221-347.
- Cai M *et al.* The crosslinking and antimicrobial properties of tunichrome. *Comparative Biochemistry and Physiology. Biochemistry and Molecular Biology* 2008;151:110–117.
- Calabro K *et al.* Nebulosins: Trisubstituted Thiolane Natural Products from the Northeastern Atlantic Annelid *Eupolymnia nebulosa*. *Journal of Organic Chemistry* 2020;85:14026–14041.
- Carlton J T e Ruiz G M. 2005. Vector science and integrated vector management in bioinvasion ecology: conceptual frameworks. In: *Invasive alien species: a new synthesis* (H A Mooney, R N Mack, J A McNeely, L E Neville, P J Schei, J K Waage). 58. Washington: Island Press.

- Carta G *et al.* Palmitic acid: Physiological role, metabolism and nutritional implications. In *Frontiers in Physiology* 2017;8:902.
- Castilla *et al.* Marine ecosystem engineering by the alien ascidian *Pyura praeputialis* on a mid-intertidal rocky shore. *Marine Ecology Progress Series* 2004;268:119-130.
- Cengiz S e Cavas L. Removal of methylene blue by invasive marine seaweed: *Caulerpa racemosa* var. *cylindracea*. *Bioresource Technology* 2008;99:2357–2363.
- Chen J e Liu H. Nutritional indices for assessing fatty acids: A mini-review. *International Journal of Molecular Sciences* 2020;21:1–24.
- Choi D L *et al.* First report on histology and ultrastructure of an intrahemocytic paramyxean parasite (IPP) from tunicate *Halocynthia roretzi* in Korea. *Dis. Aquat. Organ.* 2006;72:65–69.
- Christopherson S W e Glass R L. Preparation of Milk Fat Methyl Esters by Alcoholysis in an Essentially Nonalcoholic Solution. *Journal of Dairy Science* 1969;52:1289–1290.
- Coco S *et al.* Meridionalization as a Possible Resource for Fisheries: The Case Study of *Caranx rhonchus* Geoffroy Saint-Hilaire, 1817, in Southern Italian Waters. *Journal of Marine Science and Engineering* 2022;10:274.
- Cohen A N *et al.* Rapid Assessment Survey for exotic organisms in southern California bays and harbors, and abundance in port and non-port areas. *Biological Invasions* 2005;7:995–1002.
- Colautti R I *et al.* Characterised and projected costs of nonindigenous species in Canada. *Biological Invasions* 2006;8:45–59.
- Costanza R *et al.* The value of ecosystem services: putting the issues in perspective. *Ecological economics* 1998;25:67-72.
- Coutts A D M e Forrest B M. Development and application of tools for incursion response: Lessons learned from the management of the fouling pest *Didemnum vexillum*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 2007;342:154–162.
- Cowden C *et al.* Differential predation on marine invertebrate larvae by two benthic predators. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 1984;14:145–149.
- Cunniff P e Washington D. Official methods of analysis of AOAC International. *J. AOAC Int* 1997;80:127.

- Dagorn F *et al.* Phospholipid distribution and phospholipid fatty acids of the tropical tunicates *Eudistoma sp.* and *Leptoclinides uniorbis*. *Lipids* 2010;45:253–261.
- Davis A R. Over-exploitation of *Pyura chilensis* (Ascidacea) in southern Chile: the urgent need to establish marine reserves. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 1995;68:107–116.
- De Mendiburu F *et al.* Statistical procedures for agricultural research, version 1.2-4. 2020.
- Delgado-Calle J *et al.* Aplidin (plitidepsin) is a novel anti-myeloma agent with potent anti-resorptive activity mediated by direct effects on osteoclasts. *Oncotarget* 2019;10:2709.
- Delsuc F *et al.* Tunicates and not cephalochordates are the closest living relatives of vertebrates. *Nature* 2006;439:965–968.
- Dijkstra J *et al.* Distribution and long-term temporal patterns of four invasive colonial ascidians in the Gulf of Maine. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 2007;342:61–68.
- Donia M S *et al.* Mollamides B and C, cyclic hexapeptides from the Indonesian tunicate *Didemnum molle*. *Journal of Natural Products* 2008;71:941–945.
- Dumollard R *et al.* Ascidians: An Emerging Marine Model for Drug Discovery and Screening. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2017;17:2056-2066.
- Dupont L *et al.* Pathways of spread of the introduced ascidian *Styela clava* (Tunicata) in Northern Europe, as revealed by microsatellite markers. *Biological Invasions* 2010;12:2707–2721.
- Duràn R *et al.* Phallusides, New Glucosphingolipids from the Ascidian *Phallusia fumigata* I. *Tetrahedron* 1998;54:14597-14602.
- Dybern B I. The distribution and salinity tolerance of *Ciona intestinalis* (L.) F. typica with special reference to the waters around Southern Scandinavia. *Ophelia* 1967;4:207–226.
- EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Scientific opinion on dietary reference values for selenium. *EFSA Journal* 2014;12:3846.
- El-Zrelli R *et al.* Rapid spread of the northern brown shrimp *Penaeus aztecus* Ives, 1891 in the Gulf of Gabes (south-eastern Tunisia): an additional fishery resource with potential impact on local species. *Cahiers de Biologie Marine* 2021;62:121-128.
- Essl F *et al.* Which taxa are alien? criteria, applications, and uncertainties. *BioScience* 2018;68:496–509.

- Farag M A *et al.* Dietary macrominerals: updated review of their role and orchestration in human nutrition throughout the life cycle with sex differences. *Curr. Res. Food Sci.* 2023;6:100450.
- Faulkner D J. Marine natural products. *Natural Product Reports* 2001;18:1–49.
- Felici A *et al.* Evaluation of Long Sea Snail *Hinia reticulata* (Gastropod) from the Middle Adriatic Sea as a Possible Alternative for Human Consumption. *Foods* 2020;9:905.
- Fernandes C E *et al.* Nutritional and lipid profiles in marine fish species from Brazil. *Food Chemistry* 2014;160:67–71.
- Firsova D *et al.* Isoguanosine derivatives from the Northeastern Atlantic sponge *Clathria (Microciona) strepsitoxa*. *Tetrahedron Letters* 2017;58:4652–4654.
- Fishery and Aquaculture Statistics – Yearbook 2021. Fishery and Aquaculture Statistics 2024.
- Fitridge I *et al.* The impact and control of biofouling in marine aquaculture: A review. *Biofouling* 2012;28:649–669.
- Folch J *et al.* A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. 1957;226:497-509.
- Galià-Camps C. The past, the recent, and the ongoing evolutionary processes of the worldwide invasive ascidian *Styela plicata*. *Molecular Ecology* 2024;33:17502.
- Galil B *et al.* Poisonous and venomous: Marine alien species in the Mediterranean Sea and human health. *Invasive Species Hum. Health* 2018;3:1–15.
- Gao P *et al.* Tunicates as Sources of High-Quality Nutrients and Bioactive Compounds for Food/Feed and Pharmaceutical Applications: A Review. In *Foods* 2023;12:3684.
- Gewing M T *et al.* First record of the non-indigenous ascidian *Microcosmus exasperatus*, Heller 1878, in Cyprus. *Mar Biodivers.* 2016;46:937–41.
- Ghasemlou M. Surface modifications of nanocellulose: From synthesis to high-performance nanocomposites. *Pol. Sci.* 2021;119:1-52.
- Giachetti C B *et al.* Invasive ascidians: How predators reduce their dominance in artificial structures in cold temperate areas. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 2020;533:151459.

Giusti L e Zhang H. Heavy metals and arsenic in sediments, mussels and marine water from Murano (Venice, Italy). *Environmental geochemistry and Health* 2002;24:47-65.

Gordon E M *et al.* Trabectedin for Soft Tissue Sarcoma: Current Status and Future Perspectives. *Advances in Therapy* 2016;33:1055–1071.

Grano M. *Microcosmus sabatieri* (Roule, 1885) (Tunicata Ascidiacea), an unusual human food in Kalymnos (Greece, Dodeca-nese Archipelago). *Medicine papers* 2024;10:3–9.

Grant RM. *Contemporary strategy analysis*. 7th ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2010.

Halim Y e Messeih M A. Aliens in Egyptian waters. A checklist of ascidians of the Suez Canal and the adjacent Mediterranean waters. *Egypt J Aquat. Res.* 2016;42:449–57.

Han X *et al.* Plasmalogen deficiency in early Alzheimer’s disease subjects and in animal models: Molecular characterization using electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Neurochemistry* 2001;77:1168–1180.

Hasan M R. Fish as feed inputs for aquaculture: practices, sustainability and implications. Food and Agriculture Organization of the United Nations 2019.

Hassanzadeh M. Unique marine organism: identification of some methods for biomaterial production. *Chem. Engin. Trans.* 2014;37:385–390.

He X *et al.* Facile preparation of tunicate-inspired chitosan hydrogel adhesive with self-healing and antibacterial properties. *Polymers* 2021;13:4322.

L Hernández *et al.* Indole alkaloids from the tunicate *Aplidium meridianum*. *Journal of Natural Products* 1998;61:1130-1132.

Hiebert L S *et al.* Colonial ascidians strongly preyed upon, yet dominate the substrate in a subtropical fouling community. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 2019;286:20190396.

Hino Y e Ejima H. Tissue Adhesive Properties of Functionalized Chitosan: A Comparative Study of Phenol, Catechol and Gallol. 2020;33:123-127.

Hirose E *et al.* Morphological characterization of the tunic in the edible ascidian, *Halocynthia roretzi* (Drasche), with remarks on “soft tunic syndrome” in aquaculture. *Journal of Fish Diseases* 2009;32:433–445.

Holland LZ. 2016. Tunicates. In: *Current Biology*. 26th ed. 146-152.

- Hosseini H *et al.* Effect of different cooking methods on minerals, vitamins and nutritional quality indices of kutum roach (*Rutilus frisii kutum*). Food Chemistry 2014;148:86–91.
- Hrůzová K *et al.* Valorization of outer tunic of the marine filter feeder *Ciona intestinalis* towards the production of second-generation biofuel and prebiotic oligosaccharides. Biotechnology for Biofuels 2021;14:1-8.
- Hrůzová K. Second-generation biofuel production from the marine filter feeder *Ciona intestinalis*. ACS Sustain. Chem. Eng. 2020;8:8373–8380.
- Huang D *et al.* Top-down fabrication of biodegradable multilayer tunicate cellulose films with controlled mechanical properties. Cellulose 2021;28:10415–10424.
- Hübschmann H. *Handbook of GC-MS: Fundamentals and Applications*. 4th ed. Wiley, 2015.
- Izquierdo-Muñoz A *et al.* Recent non-indigenous ascidians in the Mediterranean Sea. Aquatic Invasions 2009;4:59–64.
- Janak K V *et al.* Biological and Biomedical Application of Marine Nutraceuticals. Mar. Nutraceuticals 2013;345-392.
- Jens Kjerulf Petersen. Ascidian suspension feeding, Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 2007;342:127-137.
- Jumeri e Kim S M. Antioxidant and anticancer activities of enzymatic hydrolysates of solitary tunicate (*Styela clava*). Food Science and Biotechnology 2011;20:1075–1085.
- Kang S J *et al.* Flavor Modification of Mideoduck (*Styela clava*) Drips by Maillard Reaction. J. of Life Sci. 2010;20:1829-1837.
- Katsanevakis S e Moustakas A. Uncertainty in marine invasion science. Frontiers in Marine Science 2018;5:38.
- Katsanevakis S *et al.* Impacts of invasive alien marine species on ecosystem services and biodiversity: A pan-European review. Aquatic Invasions 2014;9:391–423.
- Kimura S e Itoh T. Cellulose synthesizing terminal complexes in the ascidians. Cellulose 2004;11:377-383.
- Kimura S *et al.* Cellulose in the house of the appendicularian *Oikopleura rufescens*. Protoplasma 2001;216:71-74.

- Krasovec G *et al.* Solitary ascidians. Handbook of Marine Model Organisms in Experimental Biology: Established and Emerging 2021:357–384.
- Lambert G *et al.* Wild and cultured edible tunicates: A review. Management of Biological Invasions 2016;7:59–66.
- Lambert G. Adventures of a sea squirt sleuth: Unravelling the identity of *Didemnum vexillum*, a global ascidian invader. Aquat. Invasions 2009;4:5–28.
- Lambert G. Ecology and natural history of the protochordates. Canadian Journal of Zoology 2005;83:34–50.
- Lambert G. Invasive sea squirts: A growing global problem. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 2007;342:3–4.
- Lambert G. Nonindigenous Ascidians in Tropical Waters. Pacific Science 2002;56:291–298.
- Lambert G. The south temperate and Antarctic ascidian *Corella eumyota* reported in two harbours in north-western France. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 2004;84:239–241.
- Lebar M D *et al.* Accumulation of vanadium, manganese, and nickel in Antarctic tunicates. Polar Biology 2011;34:587–590.
- Lee K H *et al.* Seasonal variations of taste components in warty sea squirt (*Styela clava*). J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 1995;24:274–279.
- Lee S Y *et al.* Tunicate-inspired polyallylamine-based hydrogels for wet adhesion: A comparative study of catechol- and gallol-functionalities. Journal of Colloid and Interface Science 2021;601:143–155.
- Lemaire P *et al.* Ascidians and the Plasticity of the Chordate Developmental Program. Current Biology 2008;18:620–631.
- Lever A *et al.* Antifouling Activity of Meroterpenes Isolated from the Ascidian *Aplidium aff. densum*. Marine Biotechnology 2021;23:51–61.
- Lin N e Dufresne A. Nanocellulose in biomedicine: Current status and future prospect. Eu. Pol. J. 2014;59:302–325.

- Lindquist N *et al.* Defense of Ascidians and Their Conspicuous Larvae: Adult vs. Larval Chemical Defenses 1992;62:547-568.
- Locke A *et al.* Human-mediated global dispersion of *Styela plicata* (Tunicata, Ascidiacea). Aquatic Invasions 2009;4:45-57.
- Locke A *et al.* Potential effects of the invasive colonial ascidian (*Didemnum vexillum* Kott, 2002) on pebble-cobble bottom habitats in Long Island Sound, USA. Aquatic Invasions 2009;4:133-142.
- Lurgi M *et al.* Novel communities from climate change. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 2012;367:2913-2922.
- Lutz-Collins V *et al.* Invasive tunicates fouling mussel lines: Evidence of their impact on native tunicates and other epifaunal invertebrates. Aquatic Invasions 2009;4:213–220.
- Lutzen J *et al.* *Styela clava* Herdman (Urochordata, Ascidiacea), a successful immigrant to North-West Europe: ecology, propagation and chronology of spread. Hel. Meer. 1999;52:383-391.
- Lv X *et al.* Overview of preparation, modification, and application of tunicate-derived nanocellulose. In Chemical Engineering Journal 2023;452:139439.
- M. Ito *et al.* Sphingomielins in Four Ascidians, *Ciona intestinalis*, *Halocynthia roretzi*, *Halocynthia aurantium*, and *Styela clava*. 2009;58:473-480.
- Madricardo F *et al.* Assessing the human footprint on the sea-floor of coastal systems: the case of the Venice Lagoon, Italy. Scientific reports 2019;9:6615.
- Mahajan N *et al.* Isolation and synthesis of pygmanilines, phenylurea derivatives from the Northeastern Atlantic lichen *Lichina pygmaea*. Tetrahedron Letters 2017;58:1237–1239.
- Marchini A *et al.* Current status and trends of biological invasions in the Lagoon of Venice, a hotspot of marine NIS introductions in the Mediterranean Sea. Biological invasions 2015;17:2943-2962.
- Marques L *et al.* Potential of Ascidians as Extractive Species and Their Added Value in Marine Integrated Multitrophic Aquaculture Systems–From Pests to Valuable Blue Bioresources. Frontiers in Marine Science 2022;9:849-870.
- Mastrototaro F e Dappiano M. New record of the non-indigenous species *Microcosmus squamiger* (Ascidiacea: Stolidobranchia) in the harbour of Salerno (Thyrrhenian Sea, Italy). Marine Biodiversity Rec. 2008;1:12.

- Mastrototaro F *et al.* The clubbed tunicate *Styela clava* has arrived in the Lagoon of Venice. The European Zoological Journal 2022;89:502-509.
- McCarthy AH *et al.* Antarctica: The final frontier for marine biological invasions. Glob Change Biol. 2019;25:2221–2241.
- Mckindsey C. W *et al.* Bivalve aquaculture and exotic species: a review of ecological considerations and management issues. 2007;26:281-294.
- Mead A *et al.* Introduced and cryptogenic marine and estuarine species of South Africa. Journal of Natural History 2011;45:2463–2524.
- Meenakshi V K. A report on the nutritive value of ascidians. Enrich 2009;1:58–68.
- Mendiola J *et al.* Antimalarial activity from three ascidians: an exploration of different marine invertebrate phyla. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 2006;100:909–916.
- Menna M. Antitumor potential of natural products from Mediterranean ascidians. Phytochemistry Reviews 2009;8:461–472.
- Michailidis N *et al.* Modelling the role of alien species and fisheries in an Eastern Mediterranean insular shelf ecosystem. Ocean and Coastal Management 2019;175:152–171.
- Mohanty B P *et al.* DHA and EPA content and fatty acid profile of 39 food fishes from India. BioMed Research International 2016;2016:4027437.
- Moloudizargari M *et al.* Effects of the polyunsaturated fatty acids, EPA and DHA, on hematological malignancies: a systematic review. Oncotarget 2018;9:11858.
- Monniot F e Monniot C. Ascidians Collected in Tanzania. Journal of East African Natural History 1997;86:1–35.
- Montesanto F *et al.* *Polyclinum constellatum* (Tunicata, Ascidiacea), an emerging non-indigenous species of the Mediterranean Sea: integrated taxonomy and the importance of reliable DNA barcode data. Mediterr. Mar. Sci. 2022;23:69–83.
- Mooney H A. *Invasive alien species: a new synthesis*. Island Press, 2005.
- Moreno T R *et al.* Biogeography of Atlantic and Mediterranean ascidians. Marine Biology 2014;161:2023–2033.

- Nalley C. Plinabulin Accepted for the Prevention of Neutropenia. *Oncology Times* 2017;39:25.
- Naranjo S A *et al.* Effects of environmental stress on ascidian populations in Algeciras Bay (southern Spain). Possible marine bioindicators? *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 1996;144:119–31.
- Naylor R e Burke M. Aquaculture and ocean resources: Raising tigers of the sea. *Annual Review of Environment and Resources* 2005;30:185–218.
- Nazioni Unite. (2015). Trasformare il nostro mondo: l'Agenda 2030 per lo sviluppo sostenibile.
- Noriyuki S e Jeffery WR. Chasing tails in ascidians: developmental insights into the origin and evolution of chordates. *Trends in Genetics* 1995;11:354-359.
- Nuñez M A *et al.* Invasive species: to eat or not to eat, that is the question. *Conservation Letters* 2012;5:334-341.
- Odate S e Pawlik J R. The role of vanadium in the chemical defense of the solitary tunicate, *Phallusia nigra*. *Journal of Chemical Ecology* 2007;33:643–654.
- Oh K-S *et al.* Food Constituents of Edible Ascidians *Halocynthia roretzi* and *Pyura michaelseni*. *Korean J Food Sci Technol.* 1997;29:955-962.
- Ordóñez V *et al.* When invasion biology meets taxonomy: *Clavelina oblonga* (Ascidacea) is an old invader in the Mediterranean Sea. *Biol Invasions* 2016;18:1203-15.
- Orescanin V *et al.* Biomonitoring of heavy metals and arsenic on the east coast of the Middle Adriatic Sea using *Mytilus galloprovincialis*. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 2006;245:495-500.
- Pahl-Wostl, C *et al.* Maturing the New Water Management Paradigm: Progressing from Aspiration to Practice. *Water Resources Management* 2011;25:837–856.
- Palanisamy S K *et al.* Bio-invasive ascidians in Ireland: A threat for the shellfish industry but also a source of high added value products. *Bioengineered* 2018;9:55–60.
- Palanisamy S K *et al.* Natural Products Diversity of Marine Ascidians (Tunicates; Ascidacea) and Successful Drugs in Clinical Development. *Nat. prod. bioprospect* 2017;7:1–111.
- Palanisamy S. K *et al.* Metabolite profiling of ascidian *Styela plicata* using LC–MS with multivariate statistical analysis and their antitumor activity. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 2017;32:614–623.

- Pappou S *et al.* Extraction and characterization of collagen and fatty acids from marine invasive species *Lagocephalus sceleratus*, *Pterois miles* and *Fistularia commersonii*. 2023.
- Park C-K *et al.* Extractive Nitrogenous Constituents of Two Species of Edible Ascidians. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1991;57:731-735.
- Petersen J K. Ascidian suspension feeding. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 2007;342:127–137.
- Potter K A *et al.* Curcumin-releasing mechanically adaptive intracortical im-plants improve the proximal neuronal density and blood–brain barrier stability. *Acta Biomaterialia* 2014;10:2209–2222.
- Primo C e Vázquez E. Antarctic ascidians: An isolated and homogeneous fauna. *Polar Research* 2009;28:403–414.
- Pyšek P *et al.* Alien plants in checklists and floras: Towards better communication between taxonomists and ecologists. *Taxon* 2004;53:131–143.
- Pyšek P *et al.* Scientists’ warning on invasive alien species. *Biological Reviews* 2020;95:1511–1534.
- Raj S K e Syriac E K. Invasive alien weeds as bio-resource: A review. *Agricultural Reviews* 2016;37.
- Ramesh C *et al.* Marine natural products from tunicates and their associated microbes. *Marine Drugs* 2021;19:308.
- Ramsay A *et al.* Process of invasiveness among exotic tunicates in Prince Edward Island, Canada. *Biological Invasions* 2008;10:1311–1316.
- Raphael J *et al.* Antiangiogenic Therapy in Advanced Non–small-cell Lung Cancer: A Meta-analysis of Phase III Randomized Trials. *Clinical Lung Cancer* 2017;18:345-353.
- Rashid M A *et al.* New Cytotoxic N-Methylated-Carboline Alkaloids from the Marine Ascidian *Eudistoma gilboverde*. *J. Nat. Prod.* 2001;64:1454–1456.
- Ravera O. The Lagoon of Venice: the result of both natural factors and human influence. *J. Limnol* 2000;59:19-30.
- Reem E *et al.* Ambiguities in the taxonomic assignment and species delineation of botryllid ascidians from the israeli mediterranean and other coastlines. *Mitochondrial DNA Part A* 2018;29:1073–80.

- Richard A C. Ascidian Larvae and the Events of Metamorphosis. *American Zoologist* 1967;22:817–826.
- Richardson D M *et al.* Naturalization and invasion of alien plants: Concepts and definitions. *Diversity and Distributions* 2000;6:93–107.
- Rincón-Cervera M Á *et al.* Quantification and distribution of omega-3 fatty acids in South Pacific fish and shellfish species. *Foods* 2020;9:233.
- Rius M e Shenkar N. Ascidian introductions through the Suez Canal: The case study of an Indo-Pacific species. *Marine Pollution Bulletin* 2012;64:2060–2068.
- Rius M *et al.* Long-term coexistence of non-indigenous species in aquaculture facilities. *Marine Pollution Bulletin* 2011;62:2395–2403.
- Rius M *et al.* Population dynamics and life cycle of the introduced ascidian *Microcosmus squamiger* in the Mediterranean Sea. 2009;11:2181-2194.
- Romano G *et al.* Biomaterials and Bioactive Natural Products from Marine Invertebrates: From Basic Research to Innovative Applications. *Marine Drugs* 2022;20:219.
- Romano G *et al.* Marine microorganisms as a promising and sustainable source of bioactive molecules. *Marine Environmental Research* 2017;128:58–69.
- Rombenso A N *et al.* Fish oil replacement in feeds for juvenile Florida Pompano: Composition of alternative lipid influences degree of tissue fatty acid profile distortion. *Aquaculture* 2016;458:177–186.
- Roveta C *et al.* Biomonitoring of heavy metals: The unexplored role of marine sessile taxa. *Applied Sciences (Switzerland)* 2021;11:1–16.
- Ruiz, Gregory M.; Carlton, James T. Invasion vectors: a conceptual framework for management. *Island Press* 2003:459-504.
- Ryu B e Kim S K. Functional properties of ascidians by-products: Nutritional and medicinal value. In *Seafood Processing By-Products: Trends and Applications* 2013:565–578.
- Sabbadin A. Il ciclo biologico di *Ciona intestinalis* (L.), *Molgula manhattensis* (De Kay) e *Styela plicata* (Lesueur) nella Laguna Veneta. *Arch. Ocean. Limnol.* 1957;11:1-28.

- Samuelsen T A *et al.* The use of tunicate (*Ciona intestinalis*) as a sustainable protein source in fish feed – Effects on the extrusion process, physical pellet quality and microstructure. *Animal Feed Science and Technology* 2022;284:115193.
- Sanamyan K E e Sanamyan N P. Deep-water ascidians (Tunicata: Ascidiacea) from the northern and western Pacific. *Journal of Natural History* 2006;40:307–344.
- Sanandiya N D *et al.* Tunichrome-inspired pyrogallol functionalized chitosan for tissue adhesion and hemostasis. *Carbohydrate Polymers* 2019;208:77–85.
- Saygu İ *et al.* The importance of alien species to the food web and bottom trawl fisheries of the Northeastern Mediterranean, a modelling approach. *Journal of Marine Systems* 2020;202:103253.
- Shackleton R T *et al.* The human and social dimensions of invasion science and management. *J. Environ. Manag.* 2019;229:1–9.
- Shenkar N e Swalla B J. Global diversity of Ascidiacea. *Plos one* 2011;6:20657.
- Silva C F *et al.* Non-anticoagulant heparan sulfate from the ascidian *Phallusia nigra* prevents colon carcinoma metastasis in mice by disrupting platelet-tumor cell interaction. *Cancers* 2020;12:1353.
- Simberloff D *et al.* Impacts of biological invasions: What’s what and the way forward. *Trends in Ecology and Evolution* 2013;28:58–66.
- Skalecki P *et al.* Fatty acid composition and oxidative stability of the lipid fraction of skin-on and skinless fillets of prussian carp (*Carassius gibelio*). *Animals* 2020;10:778.
- Solidoro C *et al.* 9 Response of the Venice Lagoon Ecosystem to Natural and Anthropogenic Pressures over the Last 50 Years. *Coastal lagoons: Critical habitats of environmental change* 2010;8:483-511.
- Sørensen M. A review of the effects of ingredient composition and processing conditions on the physical qualities of extruded high-energy fish feed as measured by prevailing methods. *Aquaculture Nutrition* 2012;18:233–248.
- Suleira H A R *et al.* Marine-Based Nutraceuticals: An Innovative Trend in the Food and Supplement Industries. *Mar. Drugs* 2015;13:6336-6351.
- Swalla B J. Building divergent body plans with similar genetic pathways. *Heredity* 2006;97:235-243.

Swanson D *et al.* Omega-3 fatty acids EPA and DHA: Health benefits throughout life. *Advances in Nutrition* 2012;3:1–7).

Switzer S E *et al.* Assessing potential control options for the invasive tunicate *Didemnum vexillum* in shellfish aquaculture. *Aquaculture* 2011, 318:145–153.

Tacon A G J e Metian M. Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. *Aquaculture* 2008;285:146–158.

Tacon A G J *et al.* *Demand and supply of feed ingredients for farmed fish and crustaceans Trends and prospects*. 564. 1st ed. Food and agriculture organization of the United Nations, 2011.

Tatián M *et al.* Colonization of Patagonian harbours (SW Atlantic) by an invasive sea squirt (Chordata, Ascidiacea). *Spixiana* 2010;33:111-117.

TB Robinson C G C M e M R. Marine alien species of South Africa - status and impacts. *African Journal of Marine Science* 2005;27:297-306.

Teske P R. Connectivity in solitary ascidians: Is a 24-h propagule duration sufficient to maintain large-scale genetic homogeneity? *Marine Biology* 2014;161:2681–2687.

Tessler M *et al.* A putative chordate luciferase from a cosmopolitan tunicate indicates convergent bioluminescence evolution across phyla. *Sci Rep* 2020;10:17724.

Therriault T W e Herborg Therriault L-M. Predicting the potential distribution of the vase tunicate *Ciona intestinalis* in Canadian waters: informing a risk assessment. *ICES Journal of Marine Science* 2008;65:788-794.

Thomas, Robert. *Practical guide to ICP-MS*. Gaithersburg: Scientific Solutions, 2004.

Tonial I B *et al.* Quantification of Essential Fatty Acids and Assessment of the Nutritional Quality Indexes of Lipids in Tilapia Alevins and Juvenile Tilapia Fish (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Food Research* 2014;3:105.

Trasformare il nostro mondo: Agenda 2030 per lo Sviluppo Sostenibile Dipartimento per la Pubblica Informazione Nazioni Unite. 2015.

Tsirintanis K *et al.* Bioinvasion impacts on biodiversity, ecosystem services, and human health in the Mediterranean Sea. *Aquatic Invasions* 2022;17:308–352.

Turon X *et al.* Spread of *Microcosmus squamiger* (Ascidacea: Pyuridae) in the Mediterranean Sea and adjacent waters. J Exp Mar Biol Ecol. 2007;342:185–8.

Tyrrell M C e Byers J E. Do artificial substrates favor nonindigenous fouling species over native species? Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 2007;342:54–60.

Tzafriri-Milo R *et al.* The Potential Use of Invasive Ascidians for Biomonitoring Heavy Metal Pollution. Frontiers in Marine Science 2019;6:611.

Ünal V *et al.* Silver-cheeked toadfish, *Lagocephalus sceleratus* (Actinopterygii: Tetraodontiformes: Tetraodontidae), causes a substantial economic losses in the Turkish Mediterranean coast: A call for decision makers. Acta Ichthyol. Piscat. 2015;15:231–237.

Vafidis D *et al.* Population dynamics, allometric relationships and reproductive status of *Microcosmus sabatieri* (Tunicata: Ascidacea) in the Aegean Sea. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 2008;88:1043–1051.

Van Rijn I *et al.* Alien species stabilize local fisheries catch in a highly invaded ecosystem. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 2020;77:752–761.

Varona J F *et al.* Plitidepsin has a positive therapeutic index in adult patients with COVID-19 requiring hospitalization. MedRxiv 2021;25:21257505.

Vernocchi P *et al.* Characterization of mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*) harvested in Adriatic Sea (Italy). Food control 2007;18:1575-1583.

Watters D J. Ascidian toxins with potential for drug development. Marine Drugs 2018;16:162.

Widdows J *et al.* Effects of Pollution on the Scope for Growth of Mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the Venice Lagoon, Italy. Marine Environmental Research 1997;43:69-79.

Wilson E R *et al.* Ecological Review of the Ciona Species Complex. Biological Bulletin 2022;242:153–171.

Wolfender J L *et al.* Innovative omics-based approaches for prioritisation and targeted isolation of natural products-new strategies for drug discovery. Natural Product Reports 2019;36:855–868.

Yang L G *et al.* Low n-6/n-3 PUFA Ratio Improves Lipid Metabolism, Inflammation, Oxidative Stress and Endothelial Function in Rats Using Plant Oils as n-3 Fatty Acid Source. Lipids 2016;51:49–59.

- Young C M. Ascidian cannibalism correlates with larval behavior and adult distribution. J. exp. mar. Biol. Ecol. 1988;117:9–26.
- Young K. Omega-6 (n-6) and omega-3 (n-3) fatty acids in tilapia and human health: a review. International Journal of Food Sciences and Nutrition 2009;60:203–211.
- Zatta P *et al.* Evaluation of heavy metal pollution in the Venetian lagoon by using *Mytilus galloprovincialis* as biological indicator. Science of the total environment 1992;119:29-41.
- Zhan A *et al.* Ascidiaceans as models for studying invasion success. Marine Biology 2015;162:2449–2470.
- Zhan A *et al.* Complex genetic patterns in closely related colonizing invasive species. Ecology and Evolution 2012;2:1331–1346.
- Zhan A *et al.* Ascidiaceans as models for studying invasion success. Mar. Biol. 2015;162:2449–2470.
- Zhan K *et al.* Tunicate-Inspired Gallol Polymers for Underwater Adhesive: A Comparative Study of Catechol and Gallol. Biomacromolecules 2017;18:2959–2966.
- Zhang Z *et al.* Impacts of climate change on geographical distributions of invasive ascidiaceans. Marine Environmental Research 2020;159:104993.
- Zhao Y e Li J. Ascidian bioresources: Common and variant chemical compositions and exploitation strategy - Examples of *Halocynthia roretzi*, *Styela plicata*, *Ascidia sp.* and *Ciona intestinalis*. Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences 2016;71:165–180.
- Zhao Y e Li J. Excellent chemical and material cellulose from tunicates: Diversity in cellulose production yield and chemical and morphological structures from different tunicate species. Cellulose 2014;21:3427–3441.
- Zhao Y *et al.* Tunicate cellulose nanocrystals: Preparation, neat films and nanocomposite films with glucomannans. Carbohydrate Polymers 2015;117:286–296.

Ringraziamenti

Desidero ringraziare la mia relatrice, la Professoressa Marchini, per il suo supporto, la sua professionalità e la sua gentilezza; il mio correlatore, il Dott. Salvatore Coco, per avermi coinvolto nel progetto e per la preziosa guida nella stesura di questa tesi.

Ringrazio inoltre il Prof. Daniele Merli e la Dott.ssa Federica Maraschi del Dipartimento di Chimica dell'Università di Pavia e il Prof. Alberto Felici dell'Università di Camerino per la disponibilità nell'utilizzo dei loro laboratori e per il genuino interesse mostrato in questo progetto.