

VALORIZZAZIONE DI SCARTI DELLA FILIERA AGRO-ALIMENTARE DI PHASEOLUS VULGARIS L.

Seconda parte

Nella seconda parte dell'articolo saranno illustrati gli aspetti sperimentali e analitici del lavoro svolto nell'ambito del progetto BIOFACE ("Biomolecole dalla valorizzazione integrata di sottoprodotti agroalimentari per applicazioni sostenibili con finalità fitosanitarie, alimentari, ed energetiche" – Programma di Sviluppo Rurale PSR 2014-2020 Op. 16.1.01 – GO PEI-Agri – FA 5C) finanziato dalla Regione Emilia Romagna, che ha valutato la resa estrattiva e la composizione chimica in metaboliti degli estratti ottenuti dai sottoprodotti di lavorazione della filiera del fagiolo. Il Prof. Gianni Sacchetti è responsabile scientifico del progetto BIOFACE e coordinatore del gruppo di lavoro che si è occupato della tematica illustrata nell'articolo.

***Marco Spalluto**

Le matrici vegetali impiegate in questo lavoro sono state ottenute da due sottoprodotti di lavorazione di *Phaseolus vulgaris*: la prima, definita "fagioli mix" composta da fagioli borlotti, verdi, kidney e, la seconda, costituita solo da "fagioli cannellini", volgarmente chiamati anche fagioli bianchi. Gli scarti della lavorazione sono stati sottoposti a un trattamento preliminare volto a garantirne la loro conservazione. In particolare, i due campioni di fagioli sono stati sottoposti a due differenti tipi di disidratazione/conservazione: con una parte di ciascun campione si è proceduto con un riscaldamento in stufa ventilata per 48 h a una temperatura di 70 °C fino al raggiungimento di un peso costante; con la seconda parte di ciascun campione di fagioli si è invece proceduto alla liofilizzazione. Le due differenti procedure sono state sviluppate per verificare se i due diversi processi di disidratazione/conservazione potessero influire sulla resa estrattiva. In seguito, gli scarti sono stati macinati rendendo il prodotto omogeneo e favorendo l'efficienza della successiva fase di estrazione.

L'obiettivo del lavoro sperimentale è stato quello di valutare il compromesso migliore tra resa estrattiva e composizione chi-

mica in metaboliti di interesse, come β -glucani e polifenoli.

Osservando i dati riassunti nelle tabelle 1 e 2, sia per il campione “fagioli mix” che per i “fagioli cannellini” si osserva una resa estrattiva crescente passando dal 100% di etanolo al 100% di acqua. La resa estrattiva in acqua al 100% dei “fagioli mix”, pari a 14,24%, è più elevata di poco più di un punto percentuale rispetto a quella dei “cannellini” (13,00%), mentre per gli estratti in etanolo al 100% i valori di resa, pur essendo molto bassi, si invertono: 1,00% per il “fagioli mix” e 1,65% per i “fagioli cannellini”. La resa estrattiva con solvente acquoso al 100% è di un ordine di grandezza superiore rispetto al solvente etanologico al 100%.

Va osservato che il solvente acquoso è più adatto all'estrazione di molecole di natura zuccherina, tra cui i β -glucani come evidenziato da Vizhi e Many (2014) e metaboliti secondari glicosilati, quest'ultimi peraltro solitamente più solubili in una miscela contenente anche una certa percentuale di etanolo (Tacchini *et al.*, 2019).

Osservando i dati di resa in etanolo al 50%, il valore dei “fagioli mix” è quasi doppio (10,67%), rispetto al campione “fagioli cannellini” (5,96%). Oltre al dato relativo alla resa estrattiva, è certamente importante capire quale sia la composizione chimica dei due campioni.

Gli estratti del campione “fagioli mix” presentano una pigmentazione molto più variegata

rispetto al campione di fagioli cannellini, con ogni probabilità da attribuirsi alla presenza di tannini e antociani.

Per valutare se il differente processo di disidratazione/conservazione delle matrici vegetali di scarto poteva influire sulle rese estrattive, sono state effettuate estrazioni con le miscele di solvente più performanti ovvero 100% H₂O - 50% EtOH - 100% EtOH.

I dati riportati nelle Tabelle 1 e 2 si riferiscono ai campioni disidratati in stufa (70 °C per 48 h fino a peso costante), mentre i dati nelle Tabelle 3 e 4 si riferiscono ai valori ottenuti dagli stessi campioni trattati con liofilizzazione (-60 °C a pressione <0,2 mbar).

Confrontando i risultati, si osserva in generale e per entrambi i campioni una maggiore resa estrattiva per le matrici liofilizzate (es. campione “cannellini”: resa di 2,99% del liofilizzato contro una resa dell'1,00% in stufa con solvente etanologico al 100%; 20% contro 14,24% per gli estratti in acqua). Da qui la conferma del dato di letteratura che riporta, in generale, che la liofilizzazione potrebbe influire maggiormente sulla minimizzazione del danno determinato da eventuali processi biologici endogeni (es. processi enzimatici ossidativi) ed esogeni (processi di degradazione a carico di microrganismi) favorendo un più ottimale risultato in termini qualitativi (Ratti, 2001), mentre il trattamento in stufa sem-

brerebbe favorire meno questi aspetti riflettendo un esito meno apprezzabile (Izli e Isik, 2016). In letteratura sono riportati dati relativi a diversi metodi di essiccazione di matrici biologiche, e viene rilevato che le proprietà fisico-chimiche e antiossidanti di metaboliti come β -glucani e polifenoli in esse contenuti differivano dopo il trattamento termico. Con la liofilizzazione delle medesime matrici, invece, per quanto riguarda polisaccaridi come i β -glucani si è osservata la presenza di molecole con peso molecolare mediamente inferiore rispetto alle stesse matrici fresche, con una configurazione più ramificata e a tripla elica in grado di sviluppare capacità antiossidanti più elevate rispetto al saggio del DPPH. Ma *et al.* (2013) In particolare, i valori medi di attività antiossidante espressi come IC₅₀ erano, con progressione via via più debole (a IC₅₀ maggiore corrisponde una più bassa capacità antiossidante): IC₅₀ = 0,64±0,04 mg/mL per l'estratto liofilizzato, IC₅₀ = 1,62±0,01 mg/mL per la matrice sottoposta a essiccazione a bassa pressione, IC₅₀ = 1,76±0,05 mg/mL per la matrice essiccata in stufa.

Si può quindi presupporre che la liofilizzazione sia il metodo più adatto per recuperare -glucani e sostanze antiossidanti, le quali possono invece essere danneggiate dal calore, trasformandosi in prodotti più volatili che potrebbero spiegare almeno in parte la resa più bassa dei fagioli essiccati in stufa. I “fagioli cannellini” non hanno evidenziato

un aumento di resa con la liofilizzazione per il solo estratto in soluzione acquosa al 100%: questo dato contrasta con le precedenti evidenze e sarà oggetto di ulteriori approfondimenti.

I risultati ottenuti sono ancora da considerarsi preliminari perché le estrazioni con una determinata miscela solvente sono state ripetute una sola volta e saranno dunque oggetto di ulteriore valutazione e approfondimento per poter confermare le evidenze fin qui ottenute con adeguati parametri di significatività.

NMR protonico (1H-NMR, risonanza magnetica nucleare protonica)

L'analisi NMR protonica (1H-NMR) condotta anch'essa in via preliminare sui fagioli essiccati in forno e poi estratti, ha messo in rilievo la presenza rilevante di acqua residua negli estratti liofilizzati evidenziando la preliminarità dei dati e

quindi la necessità di ulteriori prove di liofilizzazione che minimizzino ulteriormente la presenza di acqua – che limiterebbe la significatività del dato sulla resa estrattiva – sottoponendo i campioni variamente liofilizzati a valutazioni sulla percentuale di rimozione dell'acqua con un saggio di perdita all'essiccamento. Gli estratti hanno inoltre evidenziato la presenza di una componente zuccherina, tra 3-4 ppm, peraltro attesa. Con successive analisi di approfondimento al 13C-NMR si potrà mettere in evidenza se si tratterà di β -glucani. La componente fenolica, è poco concentrata (6-10 ppm) e non è possibile fare deduzioni allo stato dei dati raccolti sulle variazioni in quantità tra i vari estratti.

Analisi qualitativa in HP-TLC (cromatografia su stratosottile con lastre ad alte prestazioni)

Gli estratti ottenuti sono valutati qualitativamente mediante HP-TLC per verificare la presen-

za di polifenoli come per esempio flavonoidi, cumarine, acidi fenolici. Sempre in via preliminare, sono stati osservati i profili cromatografici delle matrici essiccate in stufa e successivamente estratte in ultrasuoni.

Le lastre in Figura 1 mostrano a 366 nm bande di un colore azzurro che sono quasi assenti nei solventi di estrazione di base alcolica, leggermente visibili nel solvente idroalcolico al 90% di EtOH, in aumento man mano che ci si sposta verso i solventi a base maggiormente acquosa. L'estrazione con solvente al 50% sembra essere quella con un profilo più variegato di metaboliti di colore azzurro, ascrivibili ad acidi fenolici e/o cumarine. Le lastre HP-TLC degli estratti sono state poi derivatizzate con un trattamento di NP e glicole propilenico per verificare l'eventuale presenza di flavonoidi a 366 nm. Nei "fagioli mix" in particolare compaiono deboli bande giallo verdi con Rf superiore a 0.5, probabilmente corrispondenti ai flavo-

n°	campione (g)	[solvente] H ₂ O:EtOH	vol. solvente (mL)	resa (g)	resa %
1	3.02	100:0	39	0.43	14.24
2	3.03	90:10	39	0.42	13.86
3	2.99	80:20	39	0.39	13.04
4	3.01	70:30	39	0.39	12.96
5	2.99	60:40	39	0.33	11.04
6	3.00	50:50	39	0.32	10.67
7	3.01	40:60	39	0.31	10.29
8	3.01	30:70	39	0.22	7.31
9	3.00	20:80	39	0.18	6.00
10	3.01	10:90	39	0.06	1.99
11	3.00	0:100	39	0.03	1.00

Tabella 1. Rese estrattive espresse in % (g di estratto secco/100 g di matrice essiccata) degli estratti ottenuti mediante estrazione assistita da ultrasuoni dagli scarti di lavorazione di fagioli mix preventivamente essiccati in forno

n°	campione (g)	[solvente] H ₂ O:EtOH	vol. solvente (mL)	resa (g)	resa %
1	3.00	100:0	39	0.39	13
2	3.00	90:10	39	0.31	10.3
3	3.01	80:20	39	0.29	9.63
4	3.04	70:30	39	0.22	7.23
5	3.02	60:40	39	0.18	5.96
6	3.04	50:50	39	0.18	5.92
7	3.01	40:60	39	0.15	4.98
8	3.02	30:70	39	0.13	4.30
9	3.00	20:80	39	0.09	3.00
10	3.03	10:90	39	0.09	2.97
11	3.02	0:100	39	0.05	1.65

Tabella 2. Rese estrattive espresse in % (g di estratto secco/100 g di matrice essiccata) degli estratti ottenuti mediante estrazione assistita da ultrasuoni dagli scarti di lavorazione di fagioli cannellini, preventivamente essiccati in forno

n°	campione (g)	[solvente] H ₂ O:EtOH	vol. solvente (mL)	resa (g)	resa %
1	3.0027	100:0	39	0.5893	19.44
2	3.0096	50:50	39	0.3750	12.46
3	3.0007	0:100	39	0.09	2.99

Tabella 3. Rese estrattive espresse in % (g di estratto secco/100 g di matrice essiccata) degli estratti ottenuti mediante estrazione assistita da ultrasuoni dagli scarti di lavorazione di fagioli mix, dopo un processo di liofilizzazione

n°	campione (g)	[solvente] H ₂ O:EtOH	vol. solvente (mL)	resa (g)	resa %
1	3.0160	100:0	39	0.2979	9.88
2	3.0008	50:50	39	0.2207	7.35
3	3.0005	0:100	39	0.0642	2.13

Tabella 4. Rese estrattive espresse in % (g di estratto secco/100 g di matrice essiccata) degli estratti ottenuti mediante estrazione assistita da ultrasuoni, dagli scarti di lavorazione di fagioli cannellini, dopo un processo di liofilizzazione

noidi agliconici quercetina e kaempferolo di cui è documentata la presenza in *Phaseolus vulgaris* (Mojica *et al.*, 2015; Beninger e Hosfield, 1999).

Nelle lastre relative ai campioni “cannellini”, dopo la derivatizzazione compaiono a 366 nm invece macchie giallo-verdi con un Rf inferiore a 0.5, caratteristico di flavonoidi glicosilati, con ogni probabilità kaempferolo 3-O-galattoside, kaempferolo 3-O-glucoside, miricetina 3-O-araboside, già riportati in letteratura per essere rilevabili in *Phaseolus vulgaris* (Mojica *et al.*, 2015; Beninger e Hosfield, 1999).

Il profilo cromatografico in HPTLC mostra che le soluzioni idroalcoliche con EtOH al di 50% e 60% sono quelle che presentano più bande cromatografiche, con una maggiore variabilità di metaboliti fenolici corrispondenti a un maggior numero di bande separate.

Analisi qualitativa HPLC (Cromatografia liquida ad alta pressione)

L'HPLC ci ha consentito di avere una prima qualitativa e semi-quantitativa indicazione sulla presenza di molecole fenoliche negli estratti. L'estratto acquoso del campione di “fagioli mix” disidratato in stufa sembra evidenziare una quantità di fenoli semplici maggiore rispetto allo stesso campione liofilizzato. La maggiore resa estrattiva del campione liofilizzato non sembra quindi essere correlabile ad

un aumento della concentrazione di fenoli semplici. I cromatogrammi degli estratti in etanolo al 100% dello stesso campione presentano invece differenze meno marcate. Il cromatogramma relativo all'estratto del campione “fagioli mix” ottenuto con solvente idroalcolico al 50% di etanolo ha evidenziato comunque un buon contenuto di fenoli semplici, alcuni dei quali sono stati determinati con il metodo dell'arricchimento con standard puri (Figura 2 e 3). In particolare, sono stati individuati l'acido gallico (acido 2,3,4-triidrossibenzoico), vanillico, caffeico, ferulico, p-cumarico, o-cumarico, m-cumarico, acido protocatecuico, siringico, clorogenico, p-idrossibenzoico (salicilico). La loro identità è stata confermata per confronto con gli spettri UV degli standard puri, confermando inoltre i dati di letteratura (Luthria e Pastor-Corrales, 2006; Mojica, Luis, *et al.*, 2015). In un ulteriore studio basato sulla ricerca antiossidante di *Phaseolus vulgaris* ha riscontrato 17 composti fenolici: catechina, miricetina 3-O-araboside, epicatechina, acido vanillico, acido siringico e acido o-cumarico, sono quelli che hanno presentato le massime concentrazioni tra i composti fenolici identificati. Catechina (1,75–5,42%) ed epicatechina (3,80–12,48%) sono state trovate in tutti i campioni. I flavonoli come catechina, quercetina, miricetina e kaempferol erano presenti come agliconi.

Acidi fenolici come acido siringico, acido ferulico, acido p-cumarico e o-acido cumarico, acido vanillico sono stati trovati nelle cultivar studiate. La miricetina e il kaempferol 3-O galattoside sono stati identificati solo nei fagioli neri (1,5%).

Successivi approfondimenti potranno consentire di identificare e quantificare altre molecole fenoliche che la letteratura documenta essere comunque presenti in *Phaseolus vulgaris* (Mojica, Luis, *et al.*, 2015) ma che, allo stato dei dati raccolti, non ci è possibile confermare.

Quantificazione dei polifenoli totali con metodo di Folin-Ciocalteu

Gli estratti acquosi (H₂O 100%), idro-etanolici (EtOH 10-20-30-40-50-60-70-80- 90%) ed etanolici (EtOH 100%) degli scarti di lavorazione “fagioli mix” e “fagioli cannellini” sono stati valutati spettrofotometricamente (metodo di Folin-Ciocalteu) per determinare il loro contenuto in polifenoli totali. Con questo metodo, i polifenoli totali vengono espressi come milligrammi equivalenti di acido gallico su grammo di matrice iniziale. La matrice che risulta avere un maggior contenuto di polifenoli totali risulta essere quella dei “fagioli mix” e, nello specifico, l'estratto in etanolo al 60% con un contenuto pari a 50.52±2.78 mg equivalenti di acido gallico per grammo di matrice essiccata (Figura

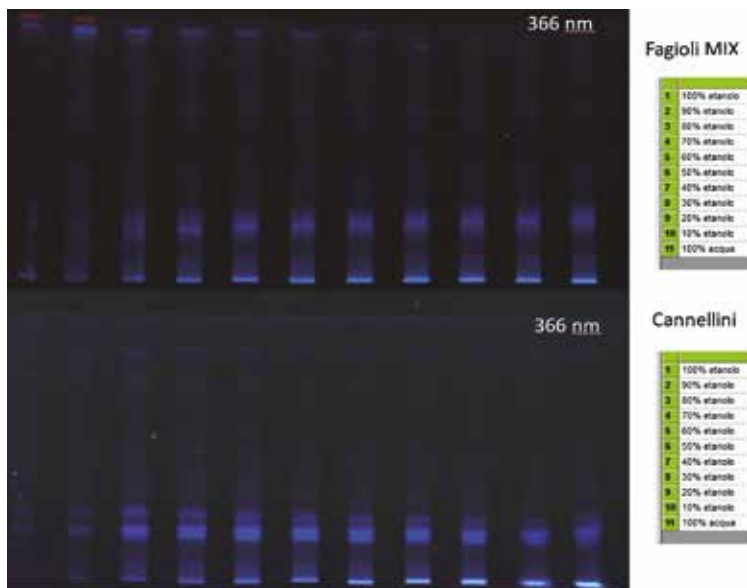


Figura 1. Confronto tra due lastre di TLC sviluppate a 366nm di fagioli mix e Fagioli cannellini essiccati in forno

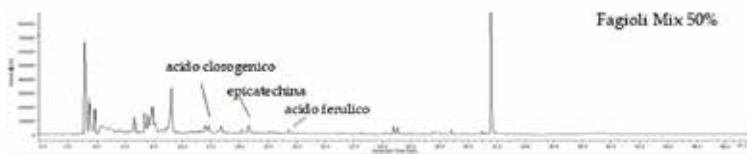


Figura 2. Cromatogramma HPLC estratto in EtOH 50% di fagiolo mix

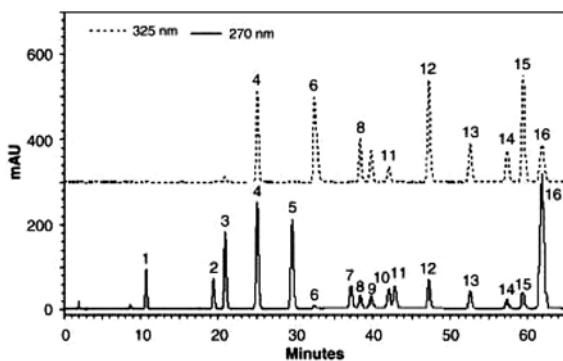


Figura 3. Separazione di 13 acidi fenolici e tre miscele standard monitorate a due diverse lunghezze d'onda (270 e 325 nm). Tutti i picchi sono stati identificati confrontando il tempo di ritenzione e gli spettri UV con gli standard commerciali come segue: 1. Acido gallico, 2. Acido protocatecuico, 3. 2,3,4, Acido treidrossibenzoico, 4. Aldeide protocatecuica, 5. p-Idrossibenzoico acido, 6. acido gentisico, 7. acido vanillico, 8. acido clorogenico, 9. acido caffeico, 10. vanillina, 11. acido siringico, 12. Siringealdeide, 13. p-Acido cumarico, 14. Acido ferulico, 15. Acido sinapico e 16. m-Acido cumarico. (Luthria, and Marcial A. Pastor-Corrales. 2006)

4). Per quanto riguarda i “fagioli cannellini”, il miglior risultato è stato ottenuto con l’estratto al 90% di EtOH con un contenuto pari a 36.14 ± 0.60 mg equivalenti di acido gallico per grammo di matrice essiccata, seguito dall’estratto ottenuto con EtOH al 10% (Figura 5). La quantità di polifenoli totali nei “fagioli cannellini” ha evidenziato, in generale, valori molto simili in tutti gli estratti ottenuti con solvente idroalcolico con rapporti inter-

medi di acqua/etanolo.

In generale il contenuto in polifenoli totali non è comunque molto elevato in entrambe le matrici, come appariva già visibile dall’analisi NMR. In letteratura i dati sul contenuto di polifenoli totali risultano in parte contrastanti, dal momento che alcuni (Rocha-Guzman *et al.*, 2007) riportano un quantitativo di polifenoli inferiore (dal 11% al 26% calcolato come mg equivalenti di catechina per g di matrice),

se confrontato con il nostro valore, mentre altri (Nyau *et al.*, 2016) riportano valori maggiori: la differenza è certamente da attribuirsi al differente solvente di estrazione utilizzato nonché alle differenti caratteristiche geografiche ed ambientali di provenienza della matrice vegetale.

Quantificazione dei flavonoidi totali

Si è valutata la quantità equivalente di iperoside per grammo di matrice secca (metodo dell’Al-Cl₃), per stimare la presenza dei flavonoidi totali. Analizzando i “fagioli mix” nel test quantitativo dei flavonoidi si è visto che il solvente con la miglior resa è la soluzione alcolica al 90% con 11.96 ± 0.01 mg di iperoside su g di matrice secca, con un valore molto simile a quello ottenuto per gli estratti con solvente alcolico al 100% (Figura 6). Valori comunque non particolarmente differenti si sono osservati negli estratti ottenuti con solvente etanolic al 50%. Dal momento che in HP-TLC la presenza di flavonoidi sembrava più intensa negli estratti ottenuti con etanolo al 50% appare evidente la necessità di ulteriori verifiche.

I “fagioli cannellini” hanno invece fatto risaltare come l’estrazione in acqua fosse la soluzione più efficiente, evidenziando un valore di resa in flavonoidi massimo nell’estratto acquoso al 100% che diminuisce progressivamente all’aumento della percentuale di solvente alcolico (Figura 7). Come precedentemente osservato per il campione “fagioli mix”, i dati non sono concordi con quanto emerso dall’analisi HP-TLC, ove si osservava la scomparsa di fenoli in soluzioni prevalentemente alcoliche, e non era evidente l’aumento di flavonoidi con il progredire della percentuale di acqua nella soluzione estrattiva.

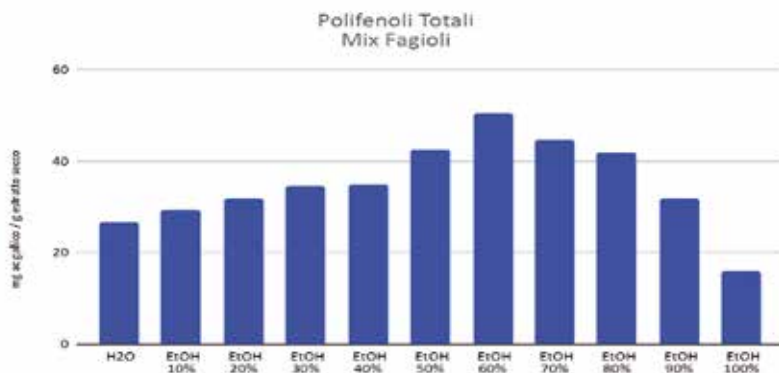


Figura 4. Polifenoli totali degli estratti esaminati con il metodo Folin-Ciocalteu, espressi in mg di acido gallico/g di matrice essiccata.

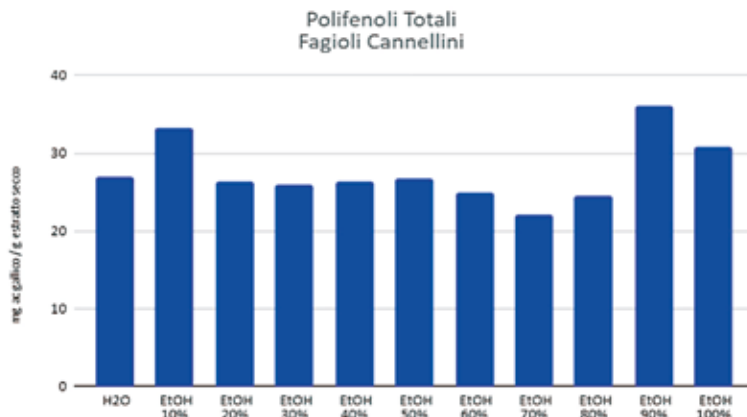


Figura 5. Polifenoli totali degli estratti esaminati con il metodo Folin-Ciocalteu, espressi in mg di acido gallico/g di matrice essiccata

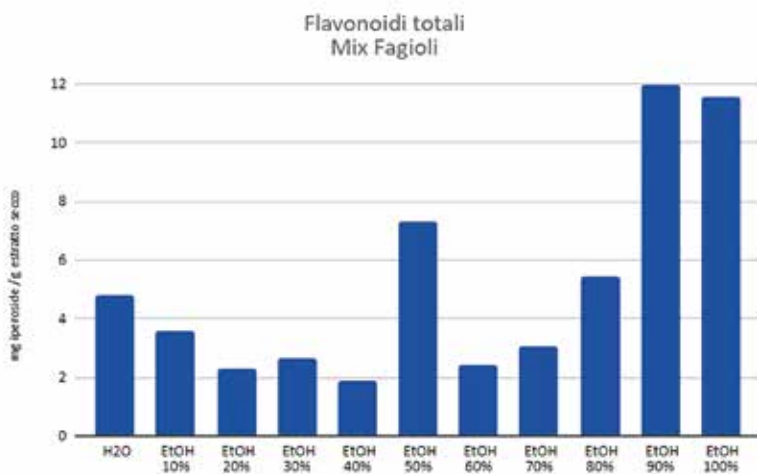
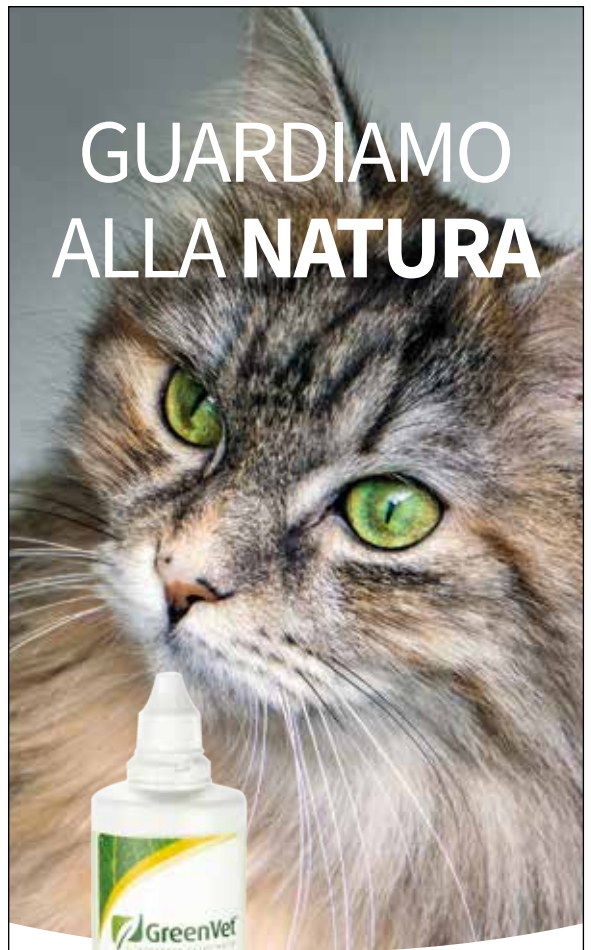


Figura 6. Contenuto di flavonoidi totali in fagioli mix espresso come mg di iperoside/g di matrice

Per quanto riguarda i “fagioli mix”, i valori ottenuti sul contenuto in flavonoidi totali hanno dato dei buoni risultati, anche se inferiori a quelli riscontrati in letteratura. La concentrazione di flavonoidi variava da 42,1 a 62,6 mg di quercetina equivalenti/100 g in estratti acquosi, e

da 95.2 a 123.5 mg di quercetina equivalente/100 g in estratti metanolici al 70%. (Nyau, V. *et al.*; 2016). In questo caso, la differenza riscontrata è con ogni probabilità da attribuirsi a differenti caratteristiche geografiche ed ambientali di provenienza della matrice vegetale.

GUARDIAMO ALLA NATURA



Con AMAMELIDE
(*Hamamelis Virginiana*)



La **soluzione oftalmica** della linea di prodotti **GreenVet** è ideale per una **detersione** delicata e benefica della rima palpebrale di **cani, gatti e di tutti gli animali da compagnia**.

Scegli un'alternativa naturale per il **benessere animale!**

GreenVet
fitoterapia veterinaria

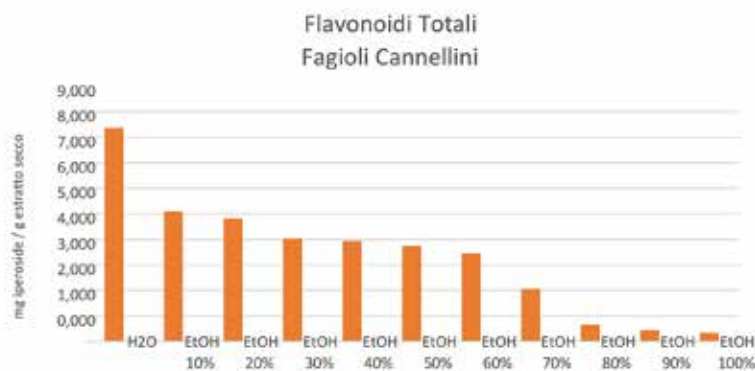


Figura 7. Flavonoidi totali degli estratti di fagioli cannellini espressi in mg di iperoside/g di matrice essicata

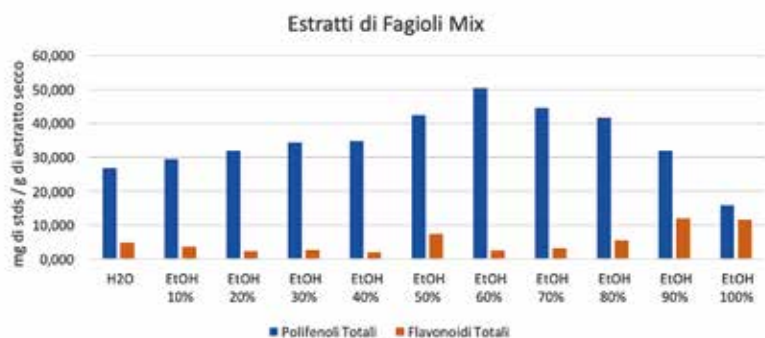


Figura 8. Confronto tra la quantità di polifenoli e flavonoidi nei fagioli mix

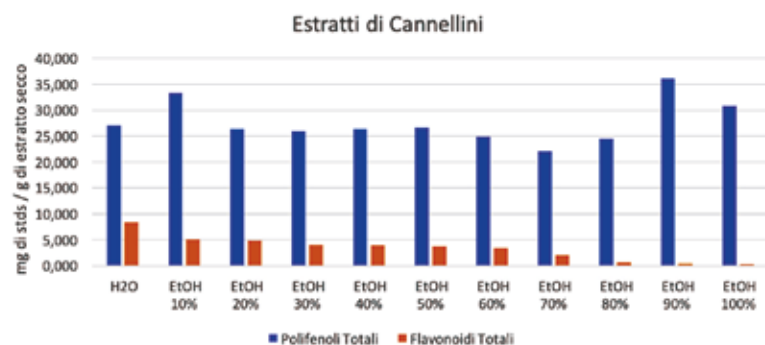


Figura 9. Confronto tra la quantità di polifenoli e flavonoidi nei fagioli cannellini

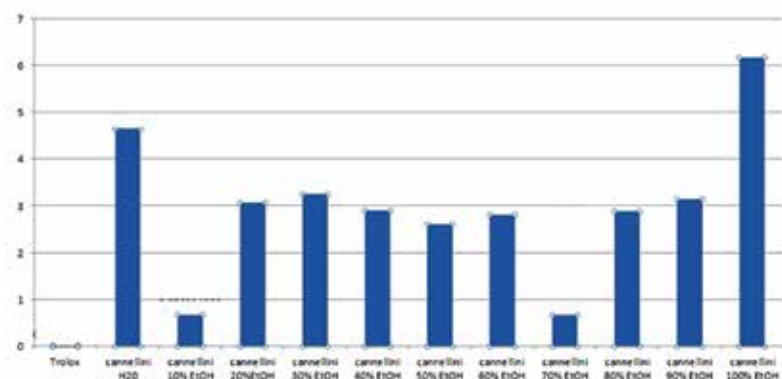


Figura 10. A titolo di esempio si riporta la valutazione IC50 con metodo DPPH per gli estratti di fagioli cannellini

Polifenoli a confronto

Facendo un confronto sulle due matrici utilizzate per questo studio, si può evidenziare che i campioni “fagioli mix” presentano un quantitativo maggiore di biomolecole polifenoliche (Figura 8). Per i “fagioli mix” l’estratto più ricco in polifenoli è quello ottenuto con un solvente al 60% di etanolo, mentre quello più ricco in flavonoidi è relativo al solvente 100% etanolo, che potrebbe rispecchiare la presenza di flavonoidi liberi, non glicosilati e pertanto più solubili in etanolo che in acqua, come peraltro riscontrato anche nell’analisi HP-TLC. L’estratto ottenuto dalla miscela di solventi acqua:etanolo al 50% ha comunque evidenziato un buon contenuto in polifenoli, caratterizzandosi come un buon compromesso applicativo rispetto all’applicazione pratica su scala produttiva tenendo conto della necessità di ridurre l’impiego di solventi organici, nell’ottica di una prospettiva di produzioni maggiormente green e circolare. Il dato del massimo contenuto in flavonoidi e polifenoli, per il campione “fagioli mix” non si correla con il processo estrattivo che conduce alla massima resa (estratto in acqua al 100%). Nel campione di “fagioli cannellini”, invece, si è osservato il fenomeno opposto, ovvero che nell’estratto caratterizzato dalla massima resa (acqua al 100%) si è potuta osservare la maggiore abbondanza di polifenoli e flavonoidi (Figura 9).

Attività antiossidante

Per stimare l’attività antiossidante degli scarti di lavorazione presi in esame, sono stati determinati i valori di IC₅₀ tramite saggi spettrofotometrici (DPPH assay), valutando in particolare la proprietà radical scavenger. I valori ottenuti sono stati suc-

cessivamente comparati con il valore di IC_{50} di un antiossidante di sintesi, il Trolox® preso come controllo positivo di riferimento e con i dati, eventualmente, forniti dalla letteratura.

Paragonando i risultati ottenuti dai campioni testati con quello del controllo positivo, tutti gli estratti risultano avere un'attività antiossidante poco marcata. Quello che ha mostrato la miglior bioattività risulta essere l'estratto al 50% dei "fagioli mix" (DPPH pari a $0.24 \pm 0,11$ mg/mL). Questo dato va di pari passo con quello ottenuto nella quantificazione dei polifenoli totali dove, proprio questa matrice ha dimostrato il miglior compromesso tra polifenoli totali e flavonoidi, anche se il contenuto più alto di polifenoli era relativo all'estratto in etanolo al 60%. Possiamo dunque ipotizzare una relazione diretta tra il quantitativo di polifenoli totali della matrice ed il suo potere antiossidante per questa tipologia di estratti. Il valore di IC_{50} del controllo positivo, cioè del Trolox®, è di 0.007 mg/mL quindi di più di un ordine di grandezza in meno rispetto a quella dell'estratto più attivo che era di 0.24 g/mL. Non per tutte le soluzioni è stato possibile calcolare l' IC_{50} , come nel caso dell'estratto con etanolo al 100%, in cui la diluizione madre aveva un valore di inibizione ancora molto basso.

Confrontando questi risultati con quelli analoghi di Rocha-Guzmán *et al.*, (2007) si nota che l'attività antiossidante è direttamente proporzionale al quantitativo di polifenoli presenti nelle matrici del fagiolo comune, e la scelta del solvente utilizzato è naturalmente determinante: per gli autori le estrazioni con acetone al 70% e metanolo al 50% hanno consentito di ottenere valori di attività

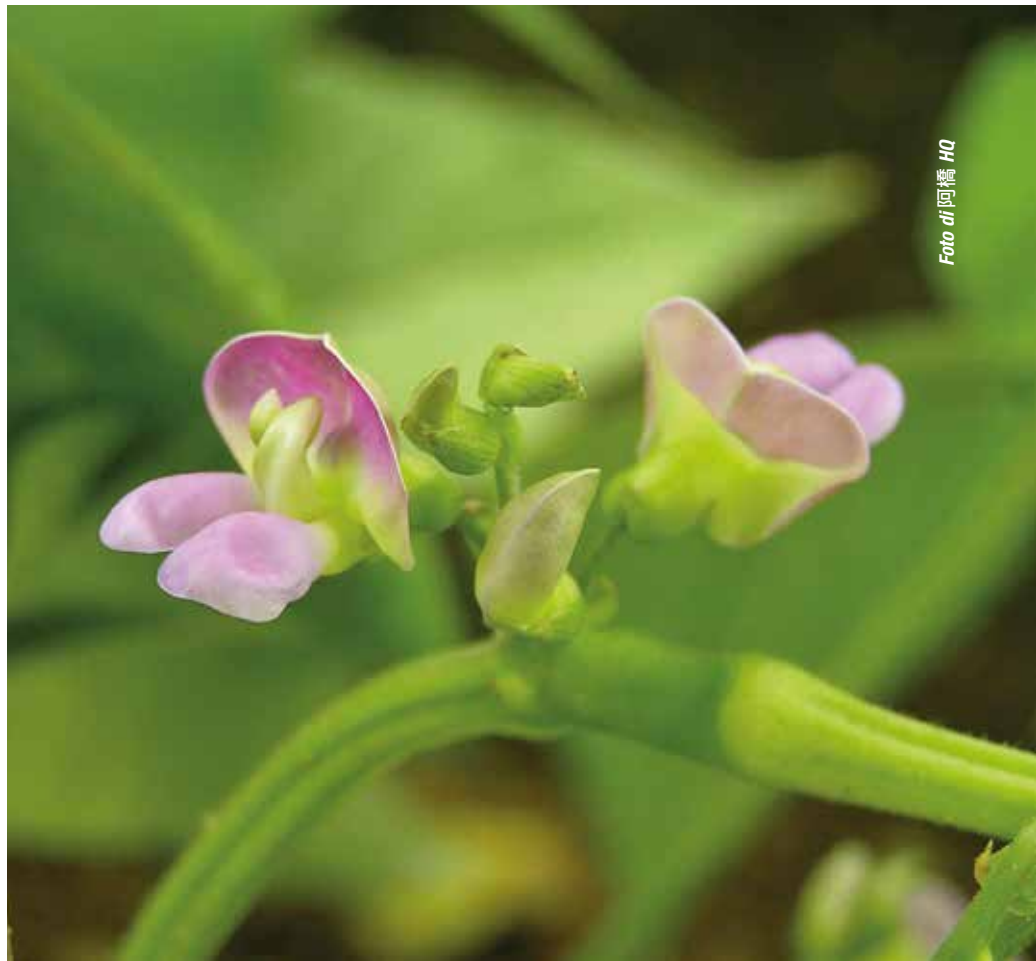


Foto di 阿橋 HQ

Phaseolus vulgaris

antiossidante più significativi. Per quanto concerne gli estratti di "fagioli cannellini" non è stato possibile trovare una correlazione diretta tra contenuto di polifenoli e attività antiossidante. Solo per l'estratto ottenuto con solvente al 10% di etanolo si è osservata un'importante attività antiossidante correlabile al contenuto elevato di polifenoli e flavonoidi (Figura 10). Anche l'estratto al 70% di etanolo ha mostrato un buon valore di IC_{50} anche se non correlabile direttamente al contenuto di flavonoidi e polifenoli. Questi dati vanno quindi interpretati nel senso che l'attività antiossidante osservata è senz'altro determinata anche da altri composti, oltre ai flavonoidi e polifenoli,

non evidenziati dalle nostre analisi preliminari.

A causa delle restrizioni imposte dall'emergenza pandemica Covid-19, le estrazioni della componente polisaccaridica non hanno potuto aver luogo ma è stata colta l'occasione per sviluppare – sebbene con approccio teorico – il modello sperimentale che potrà essere sviluppato in condizioni più favorevoli. In particolare, ai fini del presente progetto di tesi l'estrazione della componente polisaccaridica - con particolare riferimento ai β -glucani - potrebbe essere condotta come segue:

- estrazione con l'acqua che eliminerebbe l'uso di solventi organici. Questo approccio, se efficace, aderirebbe total-



Fagiolo di Lima

mente alle prerogative green e di economia circolare a cui il progetto BIOFACE si ispira.

- Estrazione con l'aggiunta di etanolo. Dopo una prima fase di trattamento della matrice a refluxo con etanolo, che contribuisce alla disattivazione degli enzimi (β -glucanasi) e alla estrazione della maggior parte dei lipidi, l'amido (polisaccaride omogeneo) potrebbe essere rimosso tramite un'estrazione a temperature inferiori a 50 °C e la precipitazione - e conseguente separazione - delle proteine si potrebbe ottenere con soluzione di bicarbonato a pH 10, in alternativa all'approccio biotecnologico utilizzando enzimi (amilasi).

In ogni caso, la sfida sarà quella di ottenere, come per i polifenoli e flavonoidi le migliori condi-

zioni che garantiscano il miglior compromesso tra resa di estrazione e contenuto di biomolecole di interesse, i β -glucani in questo caso, e che possano soddisfare quanto più possibile l'approccio eco-sostenibile e di economia circolare da cui il progetto BIOFACE prende origine.

Conclusioni

Lo studio dell'estrazione con approccio ecosostenibile degli scarti di filiera agroalimentare dei fagioli ha mostrato che la liofilizzazione è il metodo di disidratazione più adeguato alla conservazione della qualità fitochimica delle matrici. Relativamente alla tipologia di solvente impiegato, l'estratto idroalcolico al 50% e 60% del "fagioli mix" presentava il maggior contenuto di polifenoli totali e flavonoidi totali. Il risultato più significa-

tivo per i "fagioli cannellini", invece, è relativo all'estratto in etanolo al 10%, avendo esibito il contenuto di polifenoli e flavonoidi totali più elevato tra i fitocomplessi ottenuti da questa matrice, nonché un'alta resa estrattiva.

Le analisi in cromatografia su strato sottile (HP-TLC) hanno confermato questi dati, evidenziando anche le differenze del profilo flavonoidico tra le due matrici: nei fagioli mix si può ipotizzare una prevalenza di flavonoidi non glicosilati (bande a $R_f > 0.5$), mentre nei "fagioli cannellini" si osserva una maggiore presenza di flavonoidi glicosilati (bande a $R_f < 0.5$).

Data la preliminarità dei dati ottenuti, la caratterizzazione chimica sarà senz'altro un elemento da approfondire in tutti gli estratti ottenuti, in modo da identificare con maggiore dettaglio quali-quantitativo le principali molecole di interesse. Per ora, nell'estratto ottenuto con etanolo al 50% dei "fagioli mix" è stato possibile determinare, attraverso analisi di cromatografia liquida (HPLC-DAD), la presenza di acido clorogenico, acido ferulico ed epicatechina, in accordo con quanto riportato in letteratura.

Per quanto riguarda la capacità *radical scavenger* degli estratti, il dato più interessante, benché considerevolmente più debole rispetto al riferimento (Trolox®) è stato ottenuto con l'estratto etanolic al 50% dei "fagioli mix". Interessante notare come nel caso degli estratti di "fagioli mix" esista una correlazione diretta tra la quantità di polifenoli totali e l'attività antiossidante dei vari fitocomplessi ottenuti, andamento già noto in letteratura.

Il progetto di tesi aveva tra gli scopi anche quello di valutare la componente polisaccaridica degli scarti dei fagioli e la possibile presenza dei β -glucani. A

causa delle limitazioni dovute alla diffusione del Covid-19, non si è potuto approfondire questi aspetti e la parte sperimentale è stata integrata con una ricerca bibliografica e la conseguente impostazione del modello sperimentale da seguire. L'obiettivo della tesi è quindi stato necessariamente rimodulato nella progettazione teorica dello sviluppo delle metodiche estrattive e di purificazione della frazione contenente, potenzialmente, i β -glucani. Da qui emerge che un preventivo trattamento in etanolo, seguito da un'estrazione in ambiente acquoso, e da un procedimento di purificazione che porti all'eliminazione degli zuccheri semplici (monosaccaridi, disaccaridi o polisaccaridi a catena corta), polisaccaridi omogenei

(amido) e della maggior parte delle proteine, potrebbe essere il metodo estrattivo più esaustivo.

In conclusione, questo progetto di tesi – parte di una progettualità più estesa che fa riferimento al progetto BIOFACE (*Programma di Sviluppo Rurale PSR 2014-2020 Op. 16.1.01 – GO PEI-Agri – FA 5C, finanziato dalla Regione Emilia Romagna*) - evidenzia, quindi, che gli scarti del fagiolo comune della filiera agro-alimentare, spesso eliminati perché non conformi agli standard dell'industria conserviera e della trasformazione alimentare in genere, rappresentano una fonte di molecole ad alto valore aggiunto (polifenoli, flavonoidi e β -glucani), caratterizzandosi come potenziale ed interessan-

te arricchimento del mercato dell'integrazione alimentare e/o della cosmesi, rispondendo alle emergenti ed ormai irrinunciabili esigenze produttive, strettamente legate alla eco-sostenibilità e consolidate rispetto alla circolarità economica dei processi.

* *L'articolo rielabora la tesi di laurea in Chimica e Tecnologie Farmaceutiche svolta dall'autore presso l'Università degli Studi di Ferrara; relatore prof.ssa Alessandra Guerini, correlatore dott. Massimo Tacchini.*

Bibliografia

La bibliografia completa è disponibile sul sito www.natural1.it

The advertisement features a central image of a woman in athletic wear running against a bright yellow background. On the left, there is a green vertical banner with the 'BIG CHAMPION' logo (a silhouette of a runner) and the 'PROBIOS' logo (a stylized plant). Below the banner, it says 'BIOLOGICO dal 1978'. The main text reads 'TUTTA LA FORZA DELLA NATURA' in large white letters, followed by 'Obiettivo equilibrio' in smaller white letters. At the bottom right, there are images of Probios products: a box of Granola, a bag of Snack, a box of Muesli, and a bottle of oil. The website 'WWW.PROBIOS.IT' and social media icons are listed at the bottom right.