



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO**  
**FACOLTÀ DI SCIENZE AGRARIE E ALIMENTARI**

**CORSO DI LAUREA IN**  
**VALORIZZAZIONE E TUTELA DELL'AMBIENTE E DEL**  
**TERRITORIO MONTANO**

**CARATTERIZZAZIONE FITOCHIMICA DEL FAGIOLO COPAFAM**

Relatore: Prof.ssa Gigliola Borgonovo

Correlatore: Dott. Davide Pedrali

Elaborato finale di: Chiara Piccinelli  
Matricola: 927119

Anno Accademico 2021/2022



*Alla mia famiglia  
e a me stessa.*

## Indice

1. Introduzione .....	7
1.1 Agro-biodiversità.....	7
1.2 Il fagiolo.....	10
1.3 Fagiolo Copafam .....	11
2. Scopo del lavoro .....	13
3. Materiali e metodi .....	14
3.1 Materiale vegetale .....	14
3.2 Analisi fitochimica .....	15
3.2.1 Preparazione degli estratti per l'analisi HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) .....	15
3.2.2 Preparazione degli estratti per la quantificazione di polifenoli, flavonoidi totali e valutazione dell'attività antiossidante.....	16
3.2.3 Contenuto di polifenoli .....	16
3.2.4 Contenuto di flavonoidi.....	17
3.2.5 Attività antiossidante .....	17
3.2.6 Contenuto di antocianine.....	17
3.2.7 Idrolisi basica .....	17
3.2.8 Analisi <sup>1</sup> H NMR .....	18
3.3 Analisi statistica .....	19
4. Risultati e discussioni.....	20
4.1 Caratterizzazione nutrizionale .....	20
4.2 Caratterizzazione fitochimica .....	21
4.2.1 Polifenoli e flavonoidi.....	21
4.2.2 DPPH.....	22
4.2.3 Acidi fenolici .....	23
4.2.4 Antocianine .....	23
4.3 Analisi NMR.....	24
5. Conclusioni.....	27
Bibliografia.....	29
Ringraziamenti.....	34

## Riassunto

Biodiversità e agro-biodiversità sono due concetti di fondamentale importanza; in particolare, l'agro-biodiversità vegetale comprende varietà spontanee, cultivar moderne e *landraces*. Queste ultime sono cultivar locali tradizionali (coltivate principalmente in ambiente montano o sub-montano) strettamente associate agli usi e ai costumi delle popolazioni che da sempre le coltivano e conservano. Per questo motivo le *landraces* rappresentano un'importantissima risorsa per i programmi di miglioramento genetico nonché una fonte alimentare a disposizione dell'uomo. Tali cultivar spesso hanno un'elevata capacità di tollerare gli stress sia biotici (parassiti) che abiotici (cambiamento climatico) e possono essere caratterizzate da eccellenti proprietà nutrizionali. La perdita di biodiversità e di agro-biodiversità, conosciuta come "erosione genetica", ha avuto inizio dopo la "Green revolution" e ha comportato la scomparsa di numerose varietà locali che sono state soppiantate da cultivar moderne decisamente più produttive.

Numerose sono le proposte, sia a livello nazionale che internazionale, volte alla conservazione dell'agro-biodiversità; in tal senso, due sono le tecniche principali adottate: conservazione "*in situ/on farm*" e conservazione "*ex situ*".

L'Italia è un Paese ricchissimo di varietà locali tradizionali che sono però poco, o per nulla, studiate a livello scientifico. Tra le famiglie più numerose troviamo quella delle Fabaceae (leguminose), alla quale appartiene la varietà di fagiolo denominata "Copafam", oggetto di studio del seguente elaborato. Il fagiolo Copafam (appartenente alla specie *Phaseolus coccineus* L.) è una *landrace* che cresce e viene coltivata principalmente sulle Alpi e prealpi della provincia di Brescia. Il fagiolo Copafam, il cui nome significa "ammazza fame", ha dimensioni maggiori rispetto ai fagioli comuni (*Phaseolus vulgaris* L.) e può presentare colorazioni differenti (rosa, viola, beige o bianco con striature marroni o nere). Si tratta di una varietà caratterizzata da un frutto ruvido, contenente fino a 5 semi lunghi circa 2,5 cm. Una delle caratteristiche principali di questa varietà di fagiolo è legata al fatto che la sua produttività aumenta all'aumentare della quota alla quale le piante vengono coltivate; infatti è stato dimostrato che le piante

di Copafam coltivate al di sotto dei 500 m s.l.m., fioriscono ma non arrivano a maturazione.

L'obiettivo di questo lavoro è quello di comparare il profilo fitochimico del fagiolo Copafam con altre tre varietà commerciali (Bianco di Spagna, Cannellino e Borlotto), al fine di promuoverne il consumo e valorizzare i territori montani nei quali questa varietà viene coltivata. Dallo studio svolto il fagiolo Copafam è risultato una buona fonte di polifenoli ( $121,36 \pm 5,31$  mg GAE/g dw) e di antociani ( $28,11 \pm 0,16$  mg Cy3G/kg dw). Questa varietà autoctona e il fagiolo Borlotto hanno mostrato un alto livello di flavonoidi ( $6,51 \pm 0,17$  e  $7,67 \pm 0,5$  mg/kg dw rispettivamente) e un'eccellente attività antiossidante ( $76,42 \pm 1,27$  e  $77,45 \pm 0,48\%$ , rispettivamente). Il contenuto in acido fitico è risultato simile per tutti i campioni. Le analisi HPLC degli estratti idrolizzati hanno mostrato profili cromatografici simili e l'acido idrossicinnamico è risultato il principale metabolita secondario. È interessante notare che i due campioni della specie *Phaseolus coccineus* L. (Copafam e Bianco di Spagna) presentano un elevato contenuto di acido sinapico mentre i campioni appartenenti alla specie *Phaseolus vulgaris* L. (Cannellino e Borlotto) presentano un elevato contenuto di acido ferulico e p-cumarico.

Dai dati raccolti in base al profilo fitochimico e alla composizione nutrizionale, il fagiolo Copafam può essere considerato come una buona fonte di proteine e di componenti bioattivi e funzionali. Oggigiorno i consumatori prestano sempre più attenzione agli aspetti nutrizionali, pertanto, la varietà autoctona di fagiolo Copafam ben si presta alla realizzazione di prodotti alimentari funzionali e innovativi.

## 1. Introduzione

### 1.1 Agro-biodiversità

Secondo la FAO (2015) la biodiversità può essere intesa come la variabilità degli organismi viventi che appartengono ad ecosistemi differenti. L'agro-biodiversità costituisce una branca della biodiversità e può essere definita come la variabilità dei sistemi agricoli coltivati (agro-ecosistemi) (Santamaria e Ronchi, 2016), tenendo in considerazione anche la diversità esistente tra gli ecosistemi stessi, la diversità delle specie e la diversità tra le specie. Nel corso degli anni l'uomo ha addomesticato una serie di piante selvatiche dotate di caratteristiche desiderabili che erano già presenti o che sono sorte durante la coltivazione; ciò ha contribuito alla creazione di popolazioni denominate "varietà autoctone" (Zeven, 1998). L'agro-biodiversità vegetale comprende varietà spontanee, cultivar moderne e *landraces*. Le *landraces*, in particolare, sono cultivar locali tradizionali che non sono state oggetto di un programma di miglioramento genetico e sono caratterizzate da un adattamento specifico alle condizioni ambientali e di coltivazione di una determinata area. Inoltre rappresentano una memoria storica e culturale in quanto sono strettamente associate con gli usi, le conoscenze e le abitudini delle popolazioni che le coltivano e conservano (Santamaria e Ronchi, 2016).

Essendosi adattate a diverse condizioni ambientali, le varietà autoctone rappresentano un'importantissima risorsa genetica per i programmi di miglioramento delle colture nonché una fonte alimentare a disposizione dell'uomo e degli altri esseri viventi (Giupponi et al., 2021); una loro eventuale perdita contribuirebbe alla scomparsa della biodiversità locale, della memoria storica e dei prodotti alimentari locali (Ardenghi et al., 2019).

La biodiversità e l'agro-biodiversità in particolare rappresentano due concetti importanti sotto diversi aspetti. Innanzitutto aumentano la resilienza ai cambiamenti climatici incrementando la stabilità dei processi ecosistemici; apportano benefici per la salute attraverso la diversità alimentare; contribuiscono alla sicurezza alimentare e riducono il rischio di perdite di rendimento (Ceccarelli e Grando, 2022). È possibile affermare che gli agro-ecosistemi caratterizzati da un elevato grado di diversificazione interna tendono a mostrare una maggiore resilienza socio-ecologica ai disturbi e agli eventi imprevisti. I

sistemi di coltivazione multi-specie possono migliorare la fertilità del suolo; ridurre le perdite dovute ad agenti patogeni e parassiti; aiutare gli agricoltori ad adattarsi a mutevoli condizioni ambientali, socio-culturali e di mercato (Pautasso et al. 2013). Nonostante tutte queste prove, il miglioramento genetico delle piante responsabile della produzione di nuove varietà si è spostato, in particolare negli ultimi 70 anni, verso l'uniformità (Ceccarelli e Grando, 2022).

A livello internazionale, i Paesi membri delle Nazioni Unite hanno sottoscritto l'Agenda 2030 per lo Sviluppo Sostenibile (Agenda 2030, 2015) la quale comprende 17 obiettivi da raggiungere entro il 2030. In particolare il secondo ("sconfiggere la fame") prevede:

- Entro il 2030, *"garantire sistemi di produzione alimentare sostenibili e applicare pratiche agricole resilienti che aumentino la produttività e la produzione, che aiutino a conservare gli ecosistemi, che rafforzino la capacità di adattamento ai cambiamenti climatici, alle condizioni meteorologiche estreme, alla siccità, alle inondazioni e agli altri disastri, e che migliorino progressivamente il terreno e la qualità del suolo"*;
- Entro il 2020, *"assicurare la diversità genetica di semi, piante coltivate e animali da allevamento e domestici e le loro specie selvatiche affini, anche attraverso banche del seme e delle piante gestite e diversificate a livello nazionale, regionale e internazionale, e promuovere l'accesso e la giusta ed equa condivisione dei benefici derivanti dall'utilizzo delle risorse genetiche e delle conoscenze tradizionali collegate, come concordato a livello internazionale"*.

Numerosi sono anche gli interventi nazionali proposti dal Piano Nazionale di Ripresa e Resilienza (PNRR, 2021) che mette a disposizione dei fondi per favorire lo sviluppo di una tipologia di agricoltura sostenibile all'interno del nostro Paese. In particolare, sono stati stanziati dei fondi per favorire la nascita di trenta comunità locali (Green communities), localizzate prevalentemente in territori rurali o di montagna, che siano in grado di realizzare piani di sviluppo sostenibili dal punto di vista energetico, ambientale, economico e sociale, ed essere quindi in grado di realizzare un modello di azienda agricola sostenibile che sia incentrata sulla tutela e la valorizzazione della biodiversità locale. Il Programma Nazionale della Ricerca (PNR) mira ad un uso più sostenibile delle proteine vegetali (come quelle presenti nelle leguminose); infatti *"per garantire alimenti in quantità sufficiente, nutrienti, sicuri, salutari, accessibili ed economicamente"*

*sostenibili per una popolazione in continua crescita, considerando anche l'impatto sul cambiamento climatico e sul consumo delle materie prime, è di particolare interesse promuovere l'intensificazione sostenibile nella produzione di proteine vegetali da piante superiori (ad esempio, leguminose) [...]" (PNR 2021-2027).*

Durante la seconda metà del XX secolo, la "Green revolution" (Rivoluzione verde) è stata responsabile dell'estinzione di numerose cultivar. Questa azione, nota come erosione genetica (Ardenghi et al., 2019), ha molto spesso riguardato *landraces* coltivate con sistemi agricoli tradizionali le quali sono state sostituite con varietà commerciali molto più produttive e facilmente adattabili ai nuovi sistemi di coltivazione (FAO, 2004). Secondo la FAO (2008), i cambiamenti nelle pratiche colturali e nell'uso del suolo, la sostituzione delle varietà autoctone con cultivar moderne, i cambiamenti climatici e il costante spopolamento delle aree rurali e montane sono tra i principali fattori che contribuiscono all'erosione genetica.

La coltivazione e conservazione delle varietà locali è realizzabile attraverso tecniche agronomiche tradizionali come: conservazione "*in situ, on farm*" (coltivatori custodi) e conservazione "*ex situ*" (banche del germoplasma e consorzi) (MiPAAF, 2008).

Secondo la Convenzione ONU sulla Diversità Biologica (CBD, 1992) la conservazione *in situ* prevede di "*conservare le piante nel loro ambiente naturale o nel caso delle specie e varietà coltivate, nelle aree dove hanno sviluppato i propri caratteri distintivi. La conservazione in situ permette di mantenere per intero la variabilità genetica delle diverse popolazioni oltre al mantenimento dei processi adattativi ed evolutivi delle specie e degli ecosistemi*" (Ardenghi et al., 2019). La conservazione *on farm* è definita come: "*la gestione sostenibile, da parte degli agricoltori, della diversità genetica delle varietà locali all'interno di sistemi di coltivazione tradizionali*" (Ardenghi et al., 2019).

La conservazione *ex situ* consiste invece, nella conservazione delle risorse genetiche al di fuori del loro ambiente naturale; presenta "*vantaggi perché permette di conservare un ingente numero di accessioni per lungo tempo, anche decine di anni, in spazi e con costi relativamente limitati; inoltre le accessioni conservate ex situ possono essere facilmente spedite, scambiate tra le diverse istituzioni e donate agli agricoltori*" (Ardenghi et al., 2019). Le principali metodologie di conservazione *ex situ* prevedono la

presenza di banche del germoplasma in campo, stoccaggio in vitro, banche del DNA e banche dei semi.

Secondo lo studio condotto dal Centro di Studi Applicati per la Gestione Sostenibile e la Difesa della Montagna (Ge.S.Di.Mont), l'Italia è particolarmente ricca di agrobiodiversità, e la maggior parte delle *landraces* viene coltivata in ambiente montano o sub-montano (150-800 m s.l.m.). Molte di queste varietà tradizionali locali possono rappresentare un'importante risorsa agroalimentare per gli ambienti montani ma sono poco o per nulla studiate a livello scientifico. Le famiglie più numerose sono rappresentate da Fabaceae (leguminose), Poaceae (graminacee), Solanaceae (patate) (Giupponi et al., 2021).

## 1.2 Il fagiolo

La pianta di fagiolo appartiene al genere *Phaseolus*, a sua volta appartenente alla famiglia delle *Fabaceae* (o *Leguminosae*) che comprende numerose specie con portamento perlopiù rampicante. Il genere *Phaseolus* comprende più di 400 specie; di queste, cinque sono quelle più diffuse a livello mondiale (in ordine di importanza commerciale): *Phaseolus vulgaris* L., *Phaseolus coccineus* L., *Phaseolus lunatus* L., *Phaseolus acutifolius* A. Gray. e *Phaseolus dumosus* Macfady (Capistràn-Carabarin et al., 2019); mentre a livello nazionale, come riportato da Pignatti (1982), le specie di *Phaseolus* più coltivate sono *Phaseolus vulgaris* L. e *Phaseolus coccineus* L.

I fagioli comuni (*Phaseolus vulgaris*) sono piante annuali che vengono coltivate in zone temperate e semitropicali, per poter sfruttare i semi (freschi o essiccati) che sono comunemente conosciuti come: "fagioli marini", "fagioli rossi", "fagioli neri", "fagioli Borlotti" o "fagioli mirtillo rosso" (Ganesan e Xu, 2017).

La pianta di *Phaseolus vulgaris* presenta un apparato radicale poco sviluppato e ricco di nodosità. Lo stelo presenta altezze variabili tra gli 0,3-7 m; è di forma rotonda alla base ed esagonale nella parte apicale. Le foglie primarie sono semplici, opposte e di forma ovale; mentre quelle del fusto sono trifogliate e il fogliolo medio è più ampio e simmetrico; quelle laterali sono strette e asimmetriche. L'infiorescenza è un racemo più corto rispetto alle foglie. Il colore dei fiori varia dal rosa-bianco al viola e la loro

dimensione è compresa tra 1-1,8 cm; l'impollinazione è autogama. Il frutto è lineare e oblungo. I semi hanno dimensioni variabili tra 11-15 mm di lunghezza, 5-8 mm di larghezza e 5 mm di spessore. Il peso di 1000 semi è compreso tra 200 e 500 g. Tra i componenti dei semi maturi, i principali sono: 24,3% di proteine, 63% di carboidrati, 1,8% di grassi, 3,8% di fibre e 4,9% di ceneri (Giurcă, 2009).

*Phaseolus coccineus* è la terza specie di fagiolo più coltivata al mondo. Si tratta di una coltura rampicante e perenne, che spesso viene però trattata come una pianta annuale per la produzione di baccelli verdi o per ricavarne i semi (Spataro et al., 2011).

La pianta di *Phaseolus coccineus* presenta un apparato radicale a fittone, ricco di amido e con nodosità e germogli vegetativi nella zona del colletto. Il fusto presenta altezze comprese tra 2-7 m, è vigoroso e leggermente contorto. Le foglie sono trifogliate, acuminate all'estremità e rotonde alla base. L'infiorescenza è zigomorfa, ermafrodita e con racemo multifiorito più lungo delle foglie di 25-35 cm. Il fiore è di colore rosso, bianco, rosa o bicolore; l'impollinazione è allogama, raramente autogama. Il frutto è oblungo; contiene semi con dimensioni variabili tra i 20-25 mm di lunghezza, 13-14 mm di larghezza e 8 mm di spessore, che presentano diversi colori: bianco, nero, beige o viola. Il peso di 1000 semi può variare tra 1000 e 1400 g. All'interno dei semi ritroviamo: il 20% di proteine, il 63% di carboidrati, l'1,5% di grassi, il 5% fibre e il 3,5% di ceneri (Giurcă, 2009).

La specie *Phaseolus coccineus* richiede, per una crescita ottimale e per il raggiungimento della maturazione, temperature più basse di quelle previste per la specie *Phaseolus vulgaris*. In seguito a questa capacità di adattamento a temperature più basse, le piante di *Phaseolus coccineus* si sono diffuse rapidamente in numerose regioni dell'Europa settentrionale e nelle aree montane dell'Europa meridionale dove vengono coltivate dalla primavera all'estate (Spataro et al., 2011). Un esempio è rappresentato dal fagiolo Copafam, oggetto di studio di questo elaborato.

### **1.3 Fagiolo Copafam**

Numerose sono le varietà di *Phaseolus coccineus* che vengono coltivate in Italia e che presentano evidenti differenze per quanto riguarda la dimensione e la colorazione dei

semi; tra cui il fagiolo “Copafam” (Giupponi et al., 2018). Questa *landrace* cresce e viene coltivata principalmente sulle Alpi e prealpi lombarde, in particolare nella provincia di Brescia.

Il fagiolo Copafam è una pianta rampicante a rapida crescita che può raggiungere i 3 m di altezza; è provvista di racemi multifioriti (più lunghi rispetto alle foglie) e fiori con corolla rossa, raramente bianca. Il frutto è ruvido, lungo circa 15 cm, e può contenere fino a 5 semi lunghi circa 2,5 cm; il seme può essere rosa, viola, beige o bianco con striature marroni o nere (Giupponi et al., 2018).

È stato dimostrato, in seguito alla realizzazione di 7 campi sperimentali posti a quote differenti, che una delle peculiarità di questa varietà di fagiolo è legata al fatto che la sua capacità di svilupparsi e di produrre semi diminuisce al diminuire dell’altitudine alla quale viene coltivata, e viceversa (Nicefori, 2021). Infatti, piante di Copafam coltivate in campi a quote più elevate hanno prodotto semi con dimensioni maggiori caratterizzati da una riduzione del loro contenuto di fibre e lignina, rendendo quindi il prodotto molto più digeribile (Giupponi et al., 2018).

## **2. Scopo del lavoro**

Il presente elaborato ha lo scopo di analizzare i risultati ottenuti dalla caratterizzazione nutrizionale e fitochimica del fagiolo “Copafam” confrontandolo con tre varietà commerciali di fagiolo: Bianco di Spagna, Cannellino e Borlotto.

Il lavoro di tesi è incentrato esclusivamente sulla caratterizzazione fitochimica delle quattro diverse varietà di fagiolo, ma è inserito in un più ampio progetto di ricerca portato avanti dal Ge.S.Di.Mont polo di Edolo dell’Università degli Studi di Milano. Il progetto di ricerca a cui si fa riferimento è “Fagio.Lo - Ricerca, caratterizzazione e valorizzazione di cultivar di fagiolo tradizionale lombarde”, progetto finanziato dalla regione Lombardia nell’ambito del Programma di Sviluppo Rurale (PSR).

Le analisi di laboratorio sono state effettuate come attività di tirocinio formativo del Corso di Laurea in Valorizzazione e Tutela dell’Ambiente e del Territorio Montano durante l’Anno Accademico 2020/2021.

### 3. Materiali e metodi

L'analisi fitochimica del fagiolo "Copafam" e degli altri tre fagioli commerciali è stata eseguita presso il Centro di Studi Applicati per la Gestione Sostenibile e la Difesa della Montagna (CRC Ge.S.Di.Mont) dell'Università degli Studi di Milano, con sede a Edolo (BS) e presso il laboratorio di Spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare (NMR) del Dipartimento di Scienze per gli Alimenti, la Nutrizione e l'Ambiente (DeFENS) dell'Università degli Studi di Milano.

#### 3.1 Materiale vegetale

In laboratorio sono stati sottoposti all'analisi fitochimica quattro campioni differenti di fagiolo: due appartenenti alla specie *Phaseolus coccineus* L. e due alla specie *Phaseolus vulgaris* L. (Tabella 1).

<i>Phaseolus coccineus</i> L.		<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	
Campione	Provenienza	Campione	Provenienza
Copafam	Coltivato in Valle Camonica	Cannellino	Commerciale
Bianco di Spagna	Commerciale	Borlotto	Commerciale

**Tabella 1:** Varietà di fagiolo analizzate.

I fagioli della varietà Copafam sono stati coltivati e raccolti direttamente da agricoltori locali nel corso 2021, in diversi siti della Valle Camonica (provincia di Brescia) localizzati ad altitudini differenti, tutte poste al di sopra dei 600 m s.l.m. Sono stati inclusi come confronto anche tre fagioli commerciali (Bianco di Spagna, Cannellino e Borlotto) che sono stati invece acquistati in un mercato locale.

Per poter effettuare le analisi, i fagioli sono stati trasformati in farina (Figura 1). Le farine sono state ottenute macinando finemente i semi (lasciati precedentemente ad essiccare a temperatura ambiente) con un macinino commerciale (IKA A10 basic, Werke GmbH & Co.KG, Staufen, Germania).



**Figura 1:** Semi e farina delle quattro varietà di fagiolo (Copafam, Bianco di Spagna, Cannellino e Borlotta)

### 3.2 Analisi fitochimica

#### 3.2.1 Preparazione degli estratti per l'analisi HPLC (High-Performance Liquid Chromatography)

L'estrazione dei campioni per l'analisi HPLC è stata eseguita seguendo il protocollo proposto da Madrera (Rodríguez Madrera et al., 2021). Brevemente: 1,5 g di farina di fagioli sono stati sottoposti ad estrazione con 30 mL di etanolo acquoso al 46% contenente lo 0,1% di acido formico. Il tutto è stato mantenuto a temperatura ambiente e sottoposto a mescolamento tramite agitatore magnetico che è stato lasciato agire tutta notte. Tutte le estrazioni sono state effettuate in triplicato. Al termine delle 24 ore tutte le provette sono state inserite all'interno di una centrifuga (Hermle z300, HERMLE Labortechnik GmbH, Wehingen, Germania) e centrifugate a 4000 giri per 15 minuti; ciò ha permesso la separazione della fase solida da quella liquida. La parte liquida ottenuta dalla centrifugazione è stata trasferita all'interno di un pallone in vetro, ed evaporata in vuoto (LABOROTA 4000eco, Heidolph Instruments GmbH & Co., Schwabach, Germania) a 50°C. Il residuo solido ottenuto dall'evaporazione della fase liquida è stato poi sospeso mediante l'aggiunta di 2 mL di una soluzione di acqua e metanolo al 20% acidificato con

acido formico 0,1%. La soluzione così ottenuta è stata filtrata mediante un filtro di nylon 0.45 µm. Dal filtrato così ottenuto sono stati prelevati 0,5 mL per l'analisi HPLC.

### **3.2.2 Preparazione degli estratti per la quantificazione di polifenoli, flavonoidi totali e valutazione dell'attività antiossidante**

L'estrazione dei campioni è stata eseguita secondo la recente procedura riportata da Alcázar-Valle (Alcázar-Valle et al., 2020). In breve: 10 g di farina di fagioli (peso secco) sono stati sottoposti ad estrazione tramite l'aggiunta di 100 mL di una miscela composta da acetone, acqua ed acido acetico (70:29:0,5 v/v/v). Il tutto è stato mantenuto a temperatura ambiente e sottoposto a mescolamento tramite agitatore magnetico che è stato lasciato agire tutta notte. Gli estratti sono poi stati centrifugati a 4000 giri per 15 minuti, lavati con la miscela di solventi e il surnatante è stato trattenuto. Infine, l'estratto è stato concentrato utilizzando un evaporatore rotante a 45°C.

### **3.2.3 Contenuto di polifenoli**

Per la valutazione del contenuto totale di polifenoli è stato applicato il metodo spettrofotometrico proposto da Folin-Ciocalteu (Singleton e Rossi, 1965). Brevemente: 0,2 mL di estratto sono stati miscelati con 0,2 mL di reagente di Folin-Ciocalteu e 3,0 mL di acqua distillata. Quindi sono stati aggiunti 0,75 mL di carbonato di sodio 10%. La miscela è stata lasciata riposare per 8 minuti a temperatura ambiente. Infine sono stati addizionati 0,85 mL di acqua distillata, seguita da riposo al buio per 2 ore. L'assorbanza è stata misurata a 765 nm e il contenuto in polifenoli totali espressa in riferimento all'acido gallico come milligrammi di Acido Gallico Equivalente/g di peso secco (mgGAE/d dw). È stato utilizzato uno spettrofotometro UV/Vis Varian Cary 50 (Agilent, 5301 Stevens Creek Blvd, Santa Clara, CA, USA).

### **3.2.4 Contenuto di flavonoidi**

La determinazione dei flavonoidi totali è stata eseguita mediante saggio del cloruro di alluminio proposto da Alcázar-Valle (Alcázar-Valle et al., 2020). Il contenuto di flavonoidi è stato espresso come equivalenti di quercetina equivalente per kg di farina secca di fagioli (mg QE/kg dw). 0,05 mL di estratto vengono addizionati di 0,7 mL di acqua distillata e 0,25 mL di soluzione di cloruro di alluminio ( $\text{AlCl}_3$ ) (133 mg di  $\text{AlCl}_3$  e 400 mg di acetato di sodio in 100 mL di metanolo/acqua/acido acetico (140:50:10, v/v/v)). L'assorbanza è stata misurata a 415 nm.

### **3.2.5 Attività antiossidante**

L'attività antiossidante è stata valutata mediante il metodo 2,2-difenil-1-picrylidrazil (DPPH) riportato da Brand-Williams (Brand-Williams et al., 1995). Brevemente: 0,3 mL di estratto di fagioli sono stati miscelati con 2,7 mL di una soluzione di DPPH  $6 \times 10^{-5}$  M. La soluzione è poi stata lasciata 30 minuti al buio e a temperatura ambiente. L'assorbanza è stata misurata a 517 nm. L'attività antiossidante è stata calcolata come percentuale di RSA (attività di scavenging dei radicali).

### **3.2.6 Contenuto di antocianine**

Il contenuto di antociani è stato valutato applicando il protocollo riportato da Abdel-Aal (Abdel-Aal e Hucl P., 1999). Brevemente: 3 g di farina di fagioli sono stati addizionati con 24 mL di etanolo (0,15% HCL 0,1N). La miscela è stata agitata per 30 minuti e centrifugata a 4000 giri per 15 minuti. Il surnatante trasferito in un matraccio tarato da 50 mL che è poi stato portato a volume. La soluzione è stata filtrata e l'assorbanza è stata misurata a 535 nm. La quantificazione è stata espressa come equivalenti di cianidina 3-glucoside equivalente per kg di farina di fagioli (mg Cy3G/kg dw).

### **3.2.7 Idrolisi basica**

L'idrolisi basica è stata eseguita seguendo il processo proposto da Lin (Lin et al., 2008). Brevemente: 1 mL di estratto è stato portato a secchezza sotto flusso di azoto, ridisciolto

in 0,3 mL di NaOH 4N e agitato magneticamente per 18 ore a temperatura ambiente. Sono stati aggiunti 0,15 mL HCL 12N e 0,55 mL di metanolo. La soluzione è stata filtrata con filtro di nylon 0,2  $\mu\text{m}$  prima dell'analisi cromatografica. Le analisi sono state eseguite con un cromatografo liquido LC Agilent serie 1200 (Waldbronn, Germania) costituito da un degasatore, una pompa a gradiente quaternario, un campionatore automatico e un rivelatore MWD (Waldbronn, Germania). Per la separazione cromatografica è stata utilizzata una colonna Luna<sup>®</sup> C18 (150 x 4,6 mm) (Phenomenex, Santa Clara, USA) a 25°C. 10  $\mu\text{L}$  di campioni sono stati utilizzati per le iniezioni. Sono stati utilizzati come solvente (A) HCOOH 0,1% mentre come solvente (B) acetonitrile; l'analisi è stata eseguita lavorando con un flusso di 0,8 mL/min operando con condizioni a gradiente e acquisendo i segnali a 310 nm. Il gradiente utilizzato è stato: 0 min 95% A; 5 min 95% A; 10 min 85% A; 40 min 60% A; 42 min 5% A; 45 min 5% A, 50 min 95% A. Le singole soluzioni madre di ciascuno standard sono state preparate utilizzando etanolo assoluto e conservate a -20°C. Le soluzioni della miscela standard di lavoro sono state preparate diluendo la quantità appropriata di ciascuna soluzione standard madre per ottenere 5 differenti concentrazioni. Per gli acidi p-cumarico e acido sinaptico è stato utilizzato un range di concentrazioni degli standard di 2,5-100 mg/mL mentre per l'acido ferulico di 5-500 mg/ml. I tempi di ritenzione di tutti gli standard sono stati confermati da iniezioni di standard individuali. Una fortificazione di campioni casuali è stata utilizzata per verificare ulteriormente i fattori di ritenzione. Ogni giorno lavorativo veniva iniettata una miscela standard per controllare i tempi di ritenzione. LOD (0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e LOQ (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) sono stati calcolati secondo il rapporto segnale/rumore S/N pari a 3 e 10, rispettivamente.

### **3.2.8 Analisi <sup>1</sup>H NMR**

Gli spettri <sup>1</sup>H NMR sono stati acquisiti a 25°C con uno spettrometro Bruker AV600, operante ad una frequenza di 600.13 MHz per il protone e 150.91 MHz per il carbonio, equipaggiato con un probe TXI con z-gradienti. L'acquisizione dello spettro <sup>1</sup>H NMR è stata effettuata con 32 scansioni utilizzando un programma di soppressione dell'acqua mediante presaturazione della risonanza dell'acqua. Gli spettri sono stati processati con

il software TOPSPIN 1.3. I chemical shift ( $\delta$ ) sono riportati in ppm facendo riferimento al segnale dell'acqua a 4.70 ppm. Le assegnazioni  $^1\text{H}$  NMR sono state effettuate in confronto con i dati di letteratura (Choelho et al., 2020).

Per l'analisi  $^1\text{H}$  NMR una quantità compresa tra 30 e 40 mg di farina di fagioli sono stati addizionati di 700  $\mu\text{L}$  di  $\text{D}_2\text{O}$  e agitati a temperatura ambiente per 10 minuti, dopo centrifugazione il surnatante è stato trasferito in un tubo di 5 mm e analizzato.

### **3.3 Analisi statistica**

Tutte le caratteristiche dei campioni sono presentate come media e deviazione standard, ogni campione è stato analizzato in triplicato.

I dati sono stati analizzati attraverso un'analisi della varianza (ANOVA) con Tukey test come post-hoc utilizzando IBMSPSS Statistics (IBM Corp., Armonk, NY, USA) come software. Sono stati considerati significativamente diversi valori di  $p < 0.05$ .

## 4. Risultati e discussioni

### 4.1 Caratterizzazione nutrizionale

A completamento delle analisi fitochimiche sono riportati i risultati ottenuti dalla caratterizzazione nutrizionale delle quattro varietà di fagiolo (Tabella 2).

Campione	Proteine (g/100 g dw)	Lipidi (%)	D-Glucosio (g/100 g dw)	Saccarosio (g/100 g dw)	RSO (Raffinose-Series-Oligosaccharides) (g/100 g dw)	Amido (g/100 g dw)	Fibra (g/100 g dw)
Copafam	21,93 ± 0,41 <sup>a</sup>	3,23 ± 0,10 <sup>b</sup>	0,19 ± 0,01 <sup>a</sup>	4,42 ± 0,01 <sup>a</sup>	4,82 ± 0,66 <sup>a</sup>	33,10 ± 1,40 <sup>a</sup>	34,83 ± 1,75 <sup>c</sup>
Bianco di Spagna	22,87 ± 0,30 <sup>b</sup>	3,85 ± 0,12 <sup>d</sup>	0,17 ± 0,02 <sup>a</sup>	6,78 ± 0,02 <sup>c</sup>	4,70 ± 0,15 <sup>a</sup>	32,33 ± 0,46 <sup>a</sup>	23,83 ± 0,55 <sup>a</sup>
Cannellino	26,48 ± 0,17 <sup>d</sup>	3,59 ± 0,08 <sup>c</sup>	0,16 ± 0,01 <sup>a</sup>	4,46 ± 0,03 <sup>a</sup>	4,80 ± 0,19 <sup>a</sup>	37,08 ± 0,47 <sup>b</sup>	27,58 ± 0,88 <sup>b</sup>
Borlotto	23,94 ± 0,23 <sup>c</sup>	2,84 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,16 ± 0,01 <sup>a</sup>	6,34 ± 0,05 <sup>b</sup>	4,94 ± 0,39 <sup>a</sup>	37,37 ± 1,35 <sup>b</sup>	33,94 ± 0,32 <sup>c</sup>

**Tabella 2:** Risultati della caratterizzazione nutrizionale dei quattro differenti campioni di fagiolo.

Dall'analisi è emerso che per quanto riguarda il contenuto di proteine i due fagioli appartenenti alla specie *vulgaris* (Cannellino e Borlotto) presentano una maggior quantità di proteine (26,48 e 23,94 g/100 g dw rispettivamente) mentre il Copafam è risultato il campione con il contenuto proteico minore con 21,93 g/100 g. In quest'ultimo le proteine rappresentano circa il 22% del peso secco, quindi è comunque un'ottima fonte proteica, il risultato è in accordo con i valori riportati in letteratura (Piergiovanni e Lioi, 2010).

Per quanto riguarda il contenuto di lipidi, il Copafam presenta un basso contenuto di grassi (3,23%) rispetto ai campioni Bianco di Spagna e Cannellino (Tabella 2); mentre il contenuto medio di glucosio e saccarosio è risultato più basso nel campione di *landrace* bresciana il Copafam (0,19 g/100 g e 4,42 g/100 g rispettivamente). Il basso contenuto di zuccheri e il basso contenuto di lipidi consentono al fagiolo Copafam di rispettare le linee guida della FAO e dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS, 2019).

Il Copafam presenta un elevato contenuto di fibra (34,83 g/100 g) al pari del Borlotto (33,94 g/100 g) (Tabella 2). Questo nutriente rende l'alimento meno digeribile, ma è in grado di regolare i livelli di glucosio e colesterolo nel tratto intestinale (soprattutto la sua porzione solubile); inoltre, la frazione insolubile che arriva nell'intestino viene fermentata dal microbiota svolgendo quindi una funzione prebiotica che scatena una

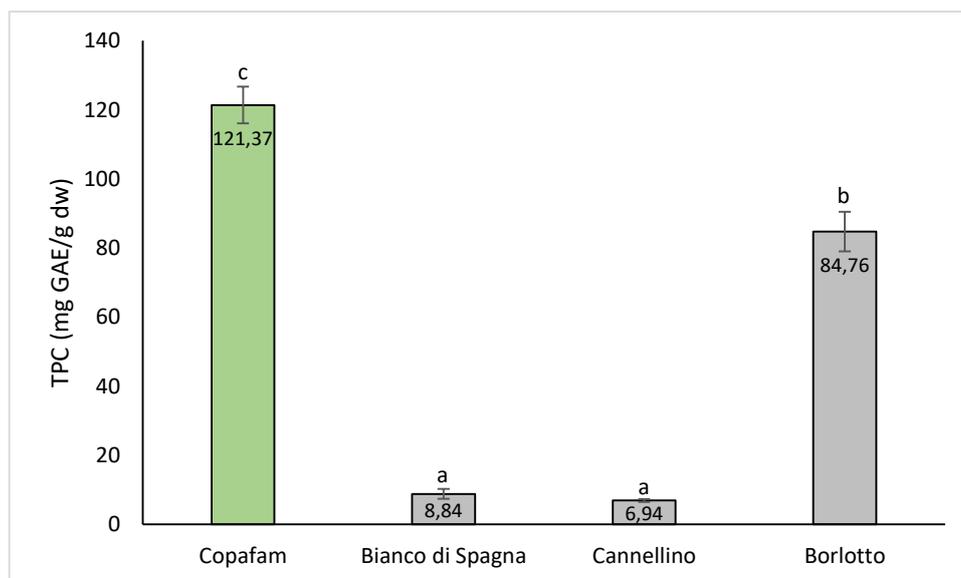
serie di processi metabolici attraverso i quali vengono prodotti acidi grassi e molecole ad azione antiinfiammatoria ed energetica importanti (Gomes Basso Los et al., 2018).

Non sono emerse differenze nel contenuto di oligosaccaridi, ovvero parte di zuccheri che passano indigeriti nell'intestino e che vengono fermentati dai microrganismi presenti nel colon causando una serie di problematiche come ad esempio meteorismo (Bento et al., 2021). Per quanto riguarda il contenuto di amido, i fagioli della specie *vulgaris* ( $37,08 \pm 0,47$  g/100 g dw nel Cannellino,  $37,37 \pm 1,35$  g/100 g dw nel Borlotto) presentano valori leggermente maggiori rispetto ai fagioli della specie *coccineus* ( $33,10 \pm 1,40$  g/100 g dw nel Copafam,  $32,33 \pm 0,46$  g/100 g dw nel Bianco di Spagna), in accordo con i dati di letteratura (Ganesan e Xu, 2017) (Tabella 2).

## 4.2 Caratterizzazione fitochimica

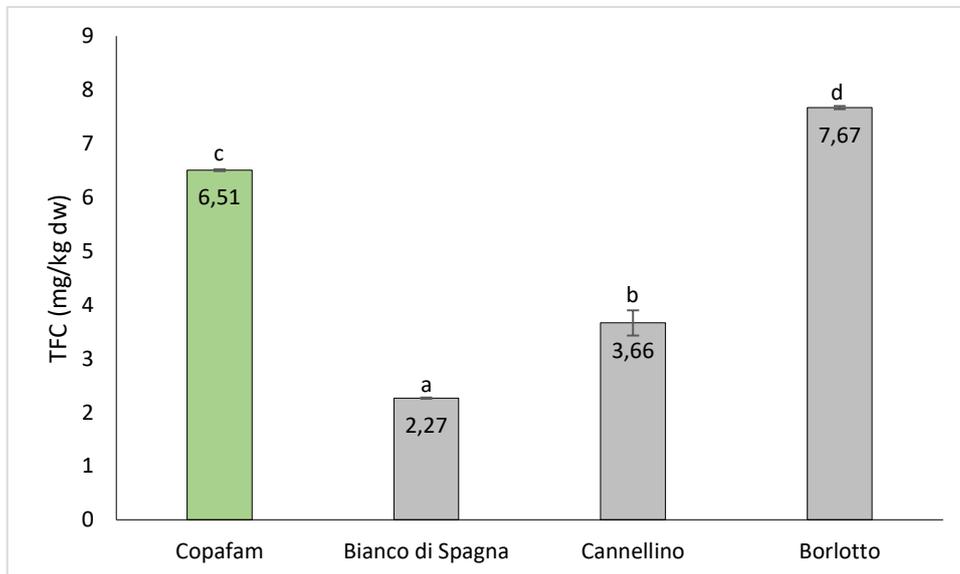
### 4.2.1 Polifenoli e flavonoidi

Il contenuto di polifenoli (TPC) risulta essere più elevato nel fagiolo Copafam ( $121,37 \pm 5,31$  mg GAE/g dw) rispetto alle varietà commerciali studiate ( $6,94 \pm 0,41$  mg GAE/g dw nel Cannellino,  $8,84 \pm 1,45$  mg GAE/g dw nel Bianco di Spagna e  $84,76 \pm 5,72$  mg GAE/g dw nel Borlotto) (Figura 2).



**Figura 2:** Contenuto di polifenoli nei campioni di fagiolo

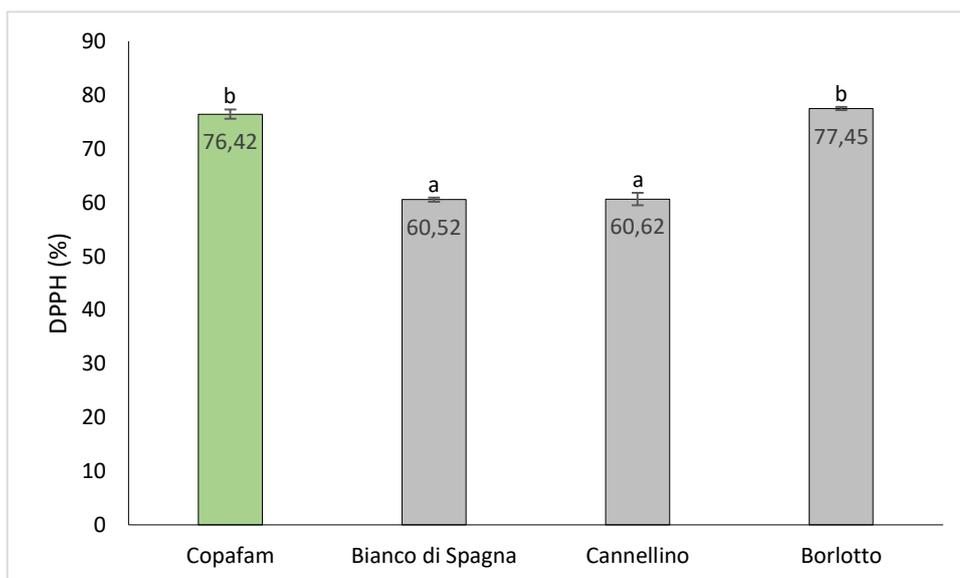
I flavonoidi (TFC) presenti nel fagiolo Copafam risultano  $6.51 \pm 0,02$  mg QE/g dw, leggermente inferiori rispetto a quelli presenti nel fagiolo Borlotto ( $7.67 \pm 0,03$  mg QE/g dw) (Figura 3).



**Figura 3:** Contenuto di flavonoidi nei campioni di fagiolo

#### 4.2.2 DPPH

Il fagiolo Copafam è caratterizzato da un elevato potere antiossidante ( $76.42 \pm 1.27$  %), paragonabile al campione di fagiolo Borlotto ( $77.45 \pm 0.48$  %) (Figura 4).



**Figura 4:** Potere antiossidante nei campioni di fagiolo

### 4.2.3 Acidi fenolici

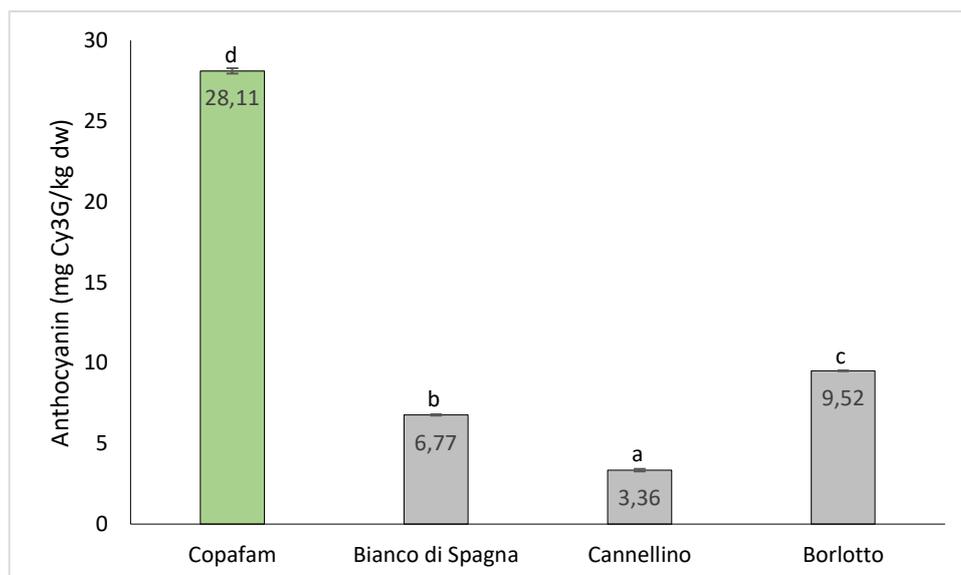
Dalle analisi HPLC condotte sui campioni di estratto idrolizzato sia Copafam che Bianco di Spagna (entrambi appartenenti alla specie *Phaseolus Coccineus* L.) presentano un elevato contenuto di acido sinapico; mentre Cannellino e Borlotto (entrambi appartenenti alla specie *Phaseolus vulgaris* L.) presentano un elevato contenuto di acido ferulico e p-cumarico (Tabella 3).

Campione	p-cumarico (mg/100 g dw)	sinapico (mg/100 g dw)	ferulico (mg/100 g dw)
Copafam	2,96 ± 0,11 <sup>b</sup>	7,78 ± 0,33 <sup>b</sup>	16,01 ± 0,45 <sup>a</sup>
Bianco di Spagna	2,33 ± 0,15 <sup>a</sup>	8,00 ± 0,56 <sup>b</sup>	17,74 ± 1,25 <sup>ab</sup>
Cannellino	4,31 ± 0,09 <sup>c</sup>	3,89 ± 0,13 <sup>a</sup>	19,61 ± 0,33 <sup>b</sup>
Borlotto	5,18 ± 0,38 <sup>d</sup>	5,35 ± 0,42 <sup>a</sup>	24,65 ± 1,95 <sup>c</sup>

**Tabella 3:** Contenuto di acidi fenolici (p-cumarico, sinapico e ferulico) nei campioni di fagiolo

### 4.2.4 Antocianine

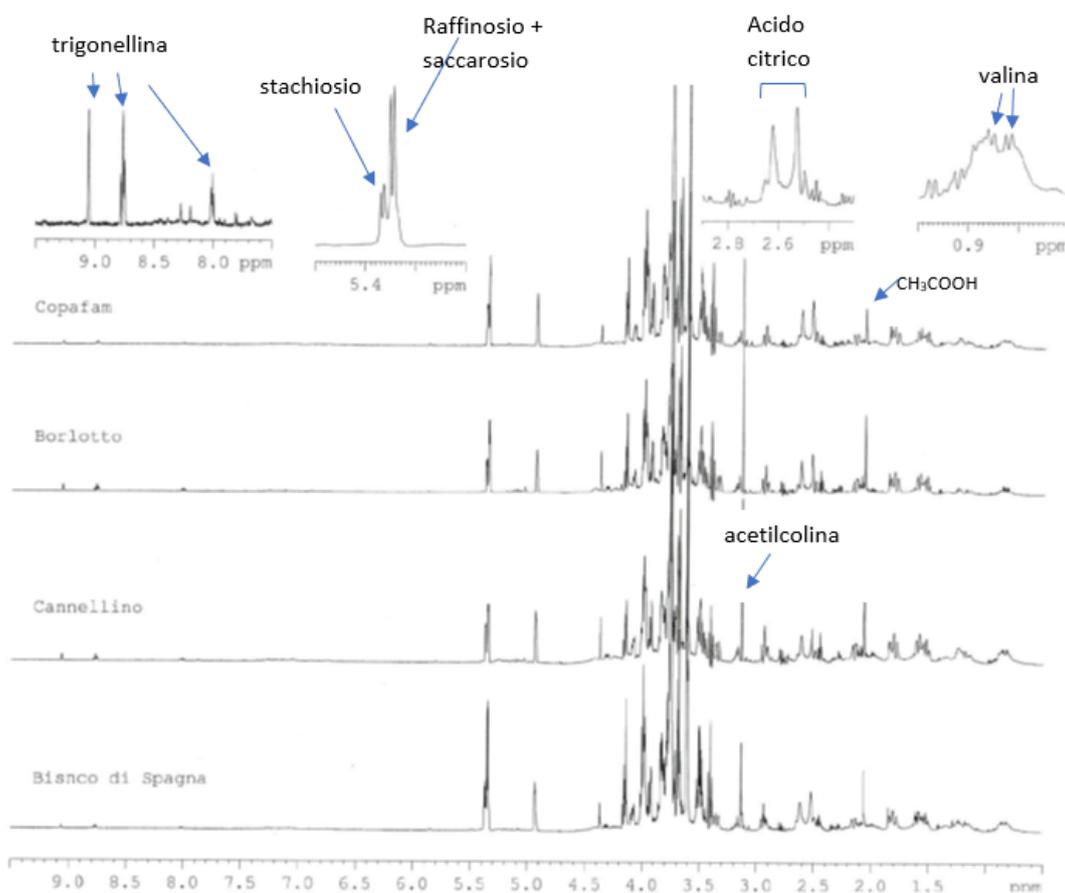
Il fagiolo Copafam è caratterizzato da una colorazione particolarmente variegata, ciò è probabilmente dovuto ad un elevato contenuto di antocianine. Il contenuto di antocianine nel fagiolo Copafam risultata essere 28.11 ± 0,16 mg Cy3G/kg dw (Figura 5). Al contrario, Bianco di Spagna e Cannellino, risultano essere estremamente poveri di antocianine (6,77 ± 0,04 mg Cy3G/kg dw e 3,36 ± 0,09 mg Cy3G/kg dw rispettivamente).



**Figura 5:** Contenuto di antocianine nei campioni di fagiolo

### 4.3 Analisi NMR

Il profilo  $^1\text{H}$  NMR (Figura 6) dei campioni analizzati è molto simile; gli spettri presentano segnali di composti alifatici (catene di amminoacidi o catene lipidiche), carboidrati e composti aromatici. I principali composti presenti sono oligosaccaridi quali raffiniosio e saccarosio che presentano la risonanza del protone anomero come doppietto a 5,34 ppm, e stachiosio riconoscibile dal doppietto risuonante a 5,36 ppm. Tra i segnali minoritari possiamo ritrovare quelli corrispondenti alla valina (due doppietti dei gruppi metilici a 0,82 e 0,85 ppm), all'acido acetico (singoletto a 2,00 ppm), acido citrico (doppietti a 2,58 ppm), acetilcolina (singoletto a 3,21 ppm) e quelli della trigonellina (segnali risuonanti a 9,05, 8,76, 8,01 e 4,43 ppm). L'attribuzione dei segnali è in accordo con la letteratura (Coelho et al., 2020).



**Figura 6:** Profili <sup>1</sup>H NMR degli estratti acquosi dei campioni di fagiolo.

L'integrazione dei segnali è stata effettuata suddividendo lo spettro in 5 regioni sottraendo il segnale del solvente: 1) zona dei composti alifatici tra 0 e 0,27 ppm, 2) zona dei carboidrati 2,7-4,60 ppm; 3) zona dei protoni anomeric di zuccheri 4,79- 5,62 ppm; 4) zona dei protoni olefinici e aromatici 5,75-7,75 ppm; 5) zona dei protoni aromatici 7,75-9,18 ppm (Tabella 4).

	<b>0-2.7 ppm</b>	<b>2.7-4.60 ppm</b>	<b>4.79-5.62 ppm</b>	<b>5.75-7.75 ppm</b>	<b>7.75-9.18 ppm</b>
<b>Copafam</b>	23,63	70,62	4,97	0,52	0,24
<b>Bianco di Spagna</b>	23,29	68,94	4,59	2,97	0,18
<b>Cannellino</b>	31,38	63,64	4,21	0,37	0,38
<b>Borlotto</b>	22,27	71,63	5,00	0,61	0,47

***Tabella 4:** Area dei segnali normalizzati a 100 nelle varie regioni dello spettro NMR.*

Nell'estratto acquoso, il contenuto di carboidrati nel fagiolo Copafam è 71% paragonabile a quello del Borlotto (72%), il fagiolo bianco ha un maggior contenuto in stachiosio, e raffinosisio rispetto agli altri campioni.

## 5. Conclusioni

I risultati della ricerca condotta suggeriscono che i fagioli Copafam differiscono dai fagioli commerciali nella composizione nutrizionale e fitochimica. Infatti, il contenuto proteico è risultato superiore nei fagioli appartenenti alla specie *P. vulgaris* (Borlotto e Cannellino) mentre nel Copafam il contenuto è risultato più basso ( $21.93 \pm 0.41$  g/100g dw). Tutti i campioni hanno comunque mostrato un contenuto proteico superiore al 20%, tanto che i fagioli possono essere considerati una buona fonte di questo macronutriente e una possibile alternativa alla carne rossa, l'attuale principale fonte di proteine nella dieta dei consumatori. Il contenuto in lipidi è risultato simile tra tutte le cultivar considerate; il livello variava dal 3,19% al 4,49%, nel Copafam il contenuto di grassi è risultato il più basso. Secondo Yoshida (2012), i fagioli colorati hanno mostrato i valori medi più bassi di contenuto lipidico. Inoltre, in ricerche precedenti, è stato riscontrato che i principali acidi grassi nei fagioli sono insaturi e polinsaturi, metaboliti importanti ai fini salutistici (Doan et al. 2019; Yoshida et al. 2012). Nel Copafam il contenuto medio di glucosio e saccarosio è risultato più basso rispetto agli altri campioni ( $0,19 \pm 0,01$  g/100 g dw e  $4,42 \pm 0,01$ g/100 g dw rispettivamente) mentre non sono emerse differenze nel contenuto di oligosaccaridi (4.70 - 4.90g/100 g dw). Dal profilo  $^1\text{H}$  NMR dell'estratto acquoso si caratterizzano oltre al saccarosio altre unità saccaridiche: il trisaccaride raffinio e il tetrasaccaride stachiosio.

Livelli modesti di lipidi e zuccheri rappresentano le giuste condizioni per mantenere una dieta sana (OMS 2020). Il fagiolo Copafam ha mostrato il più alto contenuto di fibre ( $34.83 \pm 2.48$  g/100g dw). La fibra alimentare, oltre a ridurre i livelli di colesterolo, induce la proliferazione di microbi benefici nell'intestino (proprietà prebiotiche) e precursori degli SCFA durante il processo di fermentazione (Conti et al. 2021; Rodríguez Madrera et al. 2020). Alcázar-Valle (2020) ha riscontrato in *P. coccineus* un'elevata percentuale di fibre e un contenuto proteico inferiore rispetto a *P. vulgaris*, che presentava una maggiore percentuale di livelli proteici, coerentemente con i risultati della nostra ricerca e i precedenti risultati di Giupponi et al. (2018).

I risultati sulle proprietà antiossidanti hanno mostrato che la varietà Copafam è caratterizzata da un'elevata attività di *scavenging* nei confronti del DPPH ( $76.42 \pm 1.27$  %). Questa azione antiossidante potrebbe essere direttamente correlata al profilo dei composti fenolici. In effetti, Copafam è risultato il fagiolo più ricco di antociani e polifenoli. Nello specifico, tutti i fagioli esaminati in questo studio contengono derivati dell'acido idrossicinnamico come principale componente. I campioni di *P. coccineus* contengono acido sinapico in quantità superiore mentre i campioni di *P. vulgaris* hanno una maggior presenza di acido ferulico e acido p-cumarico. Questi risultati sono coerenti con i risultati precedenti di Lin (Lin et al., 2008) e Madrera (Madrera et al., 2020) che hanno riportato che i derivati dell'acido idrossicinnamico costituivano i principali componenti fenolici dei fagioli dopo trattamento alcalino. I composti bioattivi (polifenoli, antociani e l'attività antiossidante) identificati nei fagioli sono spesso correlati nella riduzione del rischio di obesità, malattie croniche, diabete e regolazione del metabolismo (Madrera et al. 2020; Lin et al. 2008; Alcázar-Valle et al. 2020). Inoltre, il fagiolo Copafam ha mostrato il più basso contenuto di acido fitico e una minore attività di inibizione della tripsina. Un alto livello di antinutrienti rappresenta un importante problema nutrizionale poiché la presenza di TIA (Trypsin inhibitor activity) diminuisce la digeribilità delle proteine e un alto livello di acido fitico, ad esempio, riduce la disponibilità di alcuni nutrienti essenziali come i minerali, come K, Fe e Zn e gli aminoacidi (Bento et al. 2021; Alcázar-Valle et al. 2020).

Dai dati raccolti in base al profilo fitochimico e alla composizione nutrizionale il fagiolo Copafam può essere considerato una buona fonte di proteine e di componenti bioattivi e funzionali. Oggigiorno i consumatori prestano sempre più attenzione agli aspetti nutrizionali, pertanto, la varietà autoctona di fagiolo Copafam ben si presta alla realizzazione di prodotti alimentari funzionali e innovativi.

Importante è anche sensibilizzare i consumatori e tutte le persone coinvolte nella filiera alimentare all'importanza di mantenere l'agro-biodiversità e promuovere un atteggiamento sostenibile nei suoi confronti.

## Bibliografia

- Abdel-Aal E., Hucl P., (1999). A Rapid Method for Quantifying Total Anthocyanins in Blue Aleurone and Purple Pericarp Wheats. *Cereal Chemistry*, 76(3): 350 - 354.
- Agenda 2030 per lo Sviluppo Sostenibile. Goal 2: “sconfiggere la fame”, (2015). Testo consultabile al: <https://www.agenziacoesione.gov.it/wp-content/uploads/2020/04/agenda-2030-goal2.pdf>
- Alcázar-Valle M., Lugo-Cervante, E., Mojica L., Morales-Hernández N., Reyes-Ramirez H., Enriquez-Vara, J., Garcia-Morales, S., (2020). Bioactive Compounds, Antioxidant Activity, and Antinutritional Content of Legumes: A Comparison between Four *Phaseolus* Species. *Molecules*, 25, 3528, 1-21. DOI: 10.3390/molecules25153528.
- Ardenghi N., Bodino S., Canella M., Cauzzi P., Guzzon F., Rossi G., Tazzari E. (2019). Le varietà agronomiche lombarde tradizionali a rischio di estinzione o di erosione genetica. *Ortive e cerealicole: uno sguardo d’insieme*. Pavia, Pavia University Press.
- Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C., (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 28. 25-30. 0023-6438/95/010025 + 06 \$08.00/0.
- Bento J.A.C., Ribeiro P.R.V., Silva L.M.A, Alves Filho E.G., Bassinello P.Z., de Brito, E.S., Caliari M., Soares Jùnior M.S., (2021). Chemical profile of colorful bean (*Phaseolus vulgaris* L.) flours: Changes influenced by the cooking method. *Food Chemistry* 356, 129718. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129718>
- Capistràn-Carabarin A., Aquino-Bolanos E., Garcia-Diaz Y., Chavez-Servi, J., Vera-Guzman A., Carrillo-Rodriguez J. (2019). Complementarity in Phenolic Compounds and the Antioxidant Activities of *Phaseolus coccineus* L. and *P. vulgaris* L. Landraces. *Foods*, 8(8), 295. <https://doi.org/10.3390/foods8080295>.

- CBD – Convention on Biological Diversity, (1992). Convention on Biological Diversity: Text and Annexes. Montreal, Quebec, Canada: Secretariat of the Convention on Biological Diversity. Testo consultabile al: <https://www.cbd.int/convention/text/>
- Ceccarelli S., Grando S., (2022). Return to Agrobiodiversity: Participatory Plant Breeding. *Diversity*, 14, 126. DOI: 10.3390/d14020126.
- Coelho, S.R.M., Alves Filho E.G., Silva L.M.A., Bischof, T.Z., Ribeiro P.R.V., Zocolo G.J., Canuto K.M., Bassinello P.Z., de Brito E.S., (2020). NMR and LC-MS assessment of compound variability of common bean (*Phaseolus vulgaris*) stored under controlled atmosphere. *Lwt – Food Science and Technology*, 117, 1-8. DOI: 10.1016/j.lwt.2019.108673.
- Conti M.V., Guzzetti L., Panzeri D., De Giuseppe R., Coccetti P., Labra M., Cena H., (2021). Bioactive compounds in legumes: Implications for sustainable nutrition and health in the elderly population. *Trends Food Science & Technology*, 117, 139-147. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.072>
- Doan L.P., Nguyen T.T., Pham M.Q., Tran Q.T., Pham Q.L., Tran D.Q., Than V.T., Bach L.G., (2019). Extraction processes, identification of fatty acids, tocopherols, sterols and phenolic constituents and antioxidant evaluation of seed oils from five fabaceae species. *Processes*, 7, 456. DOI:10.3390/pr7070456.
- FAO (2004). Building on Gender Agrobiodiversity and Local Knowledge. Rome, 1-5. Testo consultabile al: <https://www.fao.org/publications/card/en/c/79c1ae5f-c15a-567f-9467-6beca7e90797/>
- FAO (2008). Resource Book for the Preparation of National Plans for Conservation of Crop Wild Relatives and Landraces. Rome, 263-271. Testo consultabile al: [https://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/PGR/PubPGR/ResourceBook/TEXT ALL 2511.pdf](https://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/PGR/PubPGR/ResourceBook/TEXT_ALL_2511.pdf)
- FAO (2015). Suoli e biodiversità. Nel suolo risiede un quarto della biodiversità del nostro

pianeta. Roma, 1-4. Testo consultabile al:  
<https://www.fao.org/3/i4551it/i4551it.pdf>

Ganesan K., Xu B., (2017). Polyphenol-Rich Dry Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and Their Health Benefits. *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 2331. DOI: 10.3390/ijms18112331

Giupponi L., Tamburini A., Giorgi A. (2018). Prospects for Broader Cultivation and Commercialization of Copafam, a Local Variety of *Phaseolus coccineus* L., in the Brescia Pre-Alps. *Mountain Research and Development*, 38(1):24-34. <https://doi.org/10.1659/MRD-JOURNAL-D-17-00013.1>.

Giupponi L., Pedrali D., Leoni V., Rodari A., Giorgi A., (2021). The Analysis of Italian Plant Agrobiodiversity Databases Reveals That Hilly and Sub-Mountain Areas Are Hotspots of Herbaceous Landraces. *Diversity*, 13, 70. DOI: 10.3390/d13020070

Giurcă D.M., (2009). Morphological and Phenological Differences Between the Two Species of the Phaseolus Genus (*Phaseolus vulgaris* and *Phaseolus coccineus*). *Cercetări Agronomice în Moldova*. Vol. XLII, No. 2 (138).

Gomes Basso Los F., Ferreira Zielinski A.A., Wojeicchowski J.P., Nogueira A., Demiate I.M., (2018). Beans (*Phaseolus vulgaris* L.): whole seeds with complex chemical composition. *Current Opinion in Food Science*, 19:63–71. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cofs.2018.01.010>

Lin L., Harnly, J., Pastor-Corrales, M., Luthria, D., (2008). The polyphenolic profiles of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry* 107(1): 399–410. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.08.038.

Madrera R., Suares Valles B., (2020). Development and validation of ultrasound assisted extraction (UAE) and HPLC-DAD method for determination of polyphenols in dry beans (*Phaseolus vulgaris*). *Journal of Food Composition and Analysis*, 85, 10334. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.103334>

Madrera R., Campa Negrillo A., Suárez Valles, B., Ferreira Fernández, J., (2021). Phenolic Content and Antioxidant Activity in Seeds of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Foods*, 10, 864. <https://doi.org/10.3390/foods10040864>.

MiPAAF (2008). Piano Nazionale sulla Biodiversità di Interesse Agricolo, 6-8. Testo consultabile al:  
[https://www.isprambiente.gov.it/files/biodiversita/20080313\\_SR\\_Piano\\_nazionale\\_biodiversita\\_agricoltura.pdf](https://www.isprambiente.gov.it/files/biodiversita/20080313_SR_Piano_nazionale_biodiversita_agricoltura.pdf)

Nicefori G., (2021). Contributo alla caratterizzazione di cultivar tradizionali di fagioli lombardi. Corso di Laurea in Valorizzazione e Tutela dell'Ambiente e del Territorio Montano, Facoltà di Scienze Agrarie e Alimentari, Università degli Studi di Milano.

OMS – Organizzazione Mondiale della Sanità (2019). Linee guida per una sana alimentazione. Centro di Ricerca Alimenti e Nutrizione. 91-99. Testo consultabile al: [https://www.salute.gov.it/imgs/C\\_17\\_pubblicazioni\\_2915\\_allegato.pdf](https://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_2915_allegato.pdf)

Pautasso M., Aistara, G., Barnaud A., Caillon S., Clouvel P., Coomes O., Delêtre M., Demeulenaere E., De Santis P., Döring T., Eloy, L., Emperaire L., Garine E., Goldringer I., Jarvis D., Joly H., Leclerc C., Louafi S., Martin P., Massol F., McGuire S., McKey D., Padoch C., Soler C., Thomas M., Tramontini S., (2013). Seed exchange networks for agrobiodiversity conservation. *Agronomy for Sustainable Development*, 33:151-175. DOI: 10.1007/s13593-012-0089-6

Pignatti S., (1982). Flora d'Italia Vol. I, II, III. Edagricole, Bologna.

Piergiorgio A.R., Lioi L., (2010). Italian Common Bean Landraces: History, Genetic Diversity and Seed Quality. *Diversity*, 2, 837-862. DOI:10.3390/d2060837.

PNR 2021-2027 – Programma Nazionale per la Ricerca, (2020). Roma, Ministero dell'Università e della Ricerca, 136-140. Testo consultabile al: <https://www.mur.gov.it/sites/default/files/2021-01/Pnr2021-27.pdf>

PNRR – Piano Nazionale di Ripresa e Resilienza, (2021). Rivoluzione verde e transizione

ecologica. Testi consultabili al: <https://italiadomani.gov.it/it/il-piano/missioni-pnrr/rivoluzione-verde-transizione-ecologica.html>

Santamaria P., Ronchi L., (2016). Varietà da conservazione in Italia: lo stato dell'arte per le specie orticole. *Italus Hortus* 23(2): 29-44.

Singleton V.L., Rossi A., (1965): Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.

Spataro G., Tiranti B., Arcaleni P., Bellucci E., Attene G., Papa R., Spagnoletti Zeuli P., Negri V., (2011). Genetic diversity and structure of a worldwide collection of *Phaseolus coccineus* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 122:1281–1291. DOI: 10.1007/s00122-011-1530-y

Venter C.S., van Eysen E., (2001). More legumes for better overall health. *SAJCN*. Vol 14, Num 3, pp S32-S38; SUP ; ref : 51 ref ISSN 1607-0658. Testo consultabile al: [https://www.researchgate.net/profile/Christine-Venter/publication/265265972\\_More\\_legumes\\_for\\_better\\_overall\\_health/links/55eff8e008ae199d47c0390c/More-legumes-for-better-overall-health.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Christine-Venter/publication/265265972_More_legumes_for_better_overall_health/links/55eff8e008ae199d47c0390c/More-legumes-for-better-overall-health.pdf)

Yoshida H; Yoshida, N., Tomiyama-Sakamoto Y; Mizushina Y., (2012). Characteristic distributions of fatty acids in different lipids from Jack beans (*Canavalia gladiata* DC.). *European Journal of Lipid Science and Technology*, 114, 787-793. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201100341>

Zeven A.C., (1998). Landraces: A review of definitions and classifications. *Euphytica*, 104: 127-139.

## **Ringraziamenti**

Ringrazio la Professoressa Gigliola Borgonovo e il Dottor Davide Pedrali per avermi pazientemente seguita durante il tirocinio e la stesura della tesi.

Ringrazio i miei genitori, Maria Pia e Giovanni, per avermi sostenuta e per avermi permesso di portare a termine il mio percorso di studi. Un grazie va anche al nonno Angelo, per essersi sempre interessato ai miei esami.

Ringrazio la mia amica Magda, con la quale ho condiviso gioie e dolori di questo percorso universitario.

Ringrazio il Paese di Zone, nella speranza di poterlo, in futuro, chiamare “casa”.