



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escuela Técnica Superior
de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL

**EFFECTO DE DIFERENTES MÉTODOS
DE COCCIÓN SOBRE LA DIGESTIÓN
PROTEICA Y LA ACTIVIDAD
ANTIOXIDANTE DE DIFERENTES
PASTAS DE LEGUMBRES**

TRABAJO FIN DE GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS
ALIMENTOS

Curso Académico: 2020-2021

ALUMNA: PATRICIA FUERTES GIL

TUTOR: PAU TALENS OLIAG

TUTORAS EXPERIMENTALES: MARTA GALLEGO IBÁÑEZ
MILAGROS ARNAL SALINAS

VALENCIA, JUNIO 2021



Efecto de diferentes métodos de cocción sobre la digestión proteica y la actividad antioxidante de diferentes pastas de legumbres

Resumen

Las legumbres son una excelente fuente de proteínas y aportan carbohidratos, fibra, vitaminas y minerales esenciales. Se consumen en todo el mundo y pueden incluirse en la dieta como ingredientes en ensaladas, guisos, purés o incluso pastas. Además de su valor nutricional, el consumo de legumbres se ha correlacionado con propiedades beneficiosas para la salud, como reducción del riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, cáncer, diabetes, hipertensión o hipercolesterolemia. Muchos de estos efectos se atribuyen a las propiedades antioxidantes que proporcionan los péptidos bioactivos y los compuestos fenólicos. A pesar de esto, la baja digestibilidad proteica y la presencia de factores antinutricionales mantienen el consumo de legumbres por debajo de su potencial nutricional. Para mejorar la calidad nutritiva de las legumbres se emplean diferentes tipos de procesado como el remojo o el cocinado, aunque la biodisponibilidad de los nutrientes estará determinada por la acción enzimática durante la digestión gastrointestinal.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de distintos métodos de cocción (convencional, a presión y microondas) sobre las características fisicoquímicas de diferentes pastas de legumbres (soja, lenteja y guisante), así como en la digestibilidad proteica y la actividad antioxidante durante la digestión gastrointestinal simulada.

Los resultados obtenidos indicaron que los diferentes métodos de cocción de las legumbres dieron lugar a diferencias en las propiedades fisicoquímicas, y en las características texturales y viscoelásticas de las pastas, a excepción de las muestras de soja, aunque todas las pastas presentaron propiedades elásticas y un comportamiento de gel débil. La cocción seguida de la digestión gastrointestinal mejoró la digestibilidad de las proteínas y la actividad antioxidante de las pastas de legumbres, lo que se atribuyó a los péptidos y aminoácidos generados a partir de la hidrólisis de proteínas más que a los compuestos fenólicos. Sin embargo, el grado de influencia de cada fase de la digestión (oral, gástrica e intestinal) en la digestibilidad y actividad antioxidante fue distinta en función del tipo de legumbre y método de cocción, ya que estaría influenciada por la estructura de la matriz e interacciones entre componentes.

Palabras clave: legumbres, proteínas, péptidos, digestión gastrointestinal, actividad antioxidante.

Autora: Patricia Fuertes Gil

Tutor: Pau Talens Oliag

Tutoras experimentales: Marta Gallego Ibáñez
Milagros Arnal Salinas

Valencia, junio 2021

Effect of different cooking methods on protein digestion and antioxidant activity of different legume pastes

Abstract

Legumes are an excellent source of protein, carbohydrates and fiber, as well as essential vitamins and minerals. They are consumed all over the world and can be included in the diet as ingredients in salads, stews, purees or pastes. Besides their nutritional value, the consumption of legumes has been correlated with beneficial health properties such as reducing the risk of cardiovascular diseases, cancer, diabetes, hypertension or hypercholesterolemia. Many of these effects have been attributed to the antioxidant properties provided by bioactive peptides and phenolic compounds. Despite that, the low protein digestibility and presence of antinutritional factors maintain the consumption of legumes below their nutritional potential. In order to improve the nutritional quality of legumes, different processes such as soaking or cooking are used, although the bioavailability of nutrients is determined by the action of enzymes during gastrointestinal digestion.

The aim of this work was to evaluate the effect of different cooking methods (conventional, pressure and microwave) on the physicochemical characteristics of different legume pastes (soybean, lentil and pea), as well as on the protein digestion and antioxidant activity during the simulated gastrointestinal digestion. The obtained results indicated that the different cooking methods result in differences in the physicochemical properties of the legume pastes as well as in the textural and viscoelastic characteristics, except for soybean samples, despite all the samples presented elastic properties and behavior weak gel behaviour. Cooking followed by gastrointestinal digestion improved protein digestibility and antioxidant activity of the legume pastes, which was attributed to peptides and amino acids rather than free phenolic compounds. However, the influence of each digestion stage on the digestibility and antioxidant activity was different according to the legume type and cooking method, as it would be influenced by the matrix structure and interaction between components.

Keywords: legumes, protein, peptides, gastrointestinal digestion, antioxidant activity.

Author: Patricia Fuertes Gil

Supervisor: Pau Talens Oliag

Experimental supervisors: Marta Gallego Ibáñez
Milagros Arnal Salinas

Valencia, June 2021

Me gustaría agradecer en primer lugar a mis tutores Pau Talens, Marta Gallego y Mila Arnal la oportunidad que me han dado de trabajar con ellos, por enseñarme todo lo que he aprendido durante este tiempo, por sus consejos y su confianza.

Agradecer al Ministerio Español de Ciencia e Innovación la financiación de este trabajo a través del proyecto RTI2018-098842-B-100.

A mis amigas, a las que he conocido durante estos cuatro años, Virginia, Bárbara, Marina y Gema, y por supuesto a Sandra y Emily que me han apoyado siempre.

A mi familia que nunca ha dudado de mí, me han acompañado en todo momento y me han apoyado en todas mis decisiones.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Las legumbres como alimento y su consumo	1
1.2 Composición química de las legumbres	2
1.3 El procesado de las legumbres	4
1.4 Digestibilidad y bioactividad de las legumbres	5
2. OBJETIVOS	8
2.1 Objetivo general	8
2.2 Objetivos específicos	8
2.3 Plan de trabajo	8
3. MATERIALES Y MÉTODOS	9
3.1 Materiales y reactivos	9
3.2 Elaboración de las pastas de legumbres	9
3.3 Caracterización fisicoquímica de las pastas	10
3.3.1 Humedad	10
3.3.2 Actividad de agua	10
3.3.3 pH.....	10
3.3.4 Sólidos solubles	11
3.3.5 Color	11
3.3.6 Textura y comportamiento viscoelástico	11
3.4 Digestión gastrointestinal <i>in vitro</i>	12
3.5 Determinación de proteínas, péptidos y grupos amino libres	13
3.6 Determinación de fenoles totales	13
3.7 Actividad antioxidante	13
3.7.1 Método del DPPH	14
3.7.2 Método del poder reductor del hierro	14
3.7.3 Método del ABTS	14
3.8 Análisis estadístico	14
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	15
4.1 Caracterización fisicoquímica de las pastas de legumbres	15
4.2 Digestibilidad proteica de las pastas de legumbres	21
4.3 Actividad antioxidante de las pastas de legumbres	25
5. CONCLUSIONES	30
6. BIBLIOGRAFÍA	31

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentración (mmol/L) de electrolitos en los fluidos salival (FSS), gástrico (FGS) e intestinal (FIS).....	12
Tabla 2. Parámetros fisicoquímicos de las pastas de soja, lenteja y guisante obtenidas tras los diferentes métodos de cocción.	16
Tabla 3. Textura y propiedades viscoelásticas de las pastas de soja, lenteja y guisante obtenidas tras los diferentes métodos de cocción.....	18
Tabla 4. Contenidos de proteínas solubles, péptidos, grupos amino libres y fenoles totales en las pastas de soja, lenteja y guisante tras los diferentes métodos de cocción obtenidos antes y durante la digestión gastrointestinal simulada.	22

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Volumen (millones de kilogramos) y valor total (€) de legumbres durante el periodo 2008-2020.	2
Figura 2. Consumo de legumbres per cápita durante el periodo 2010-2020 (kilogramos/persona y año).....	2
Figura 3. Semillas de soja, lenteja y guisante y las pastas obtenidas para cada legumbre.	10
Figura 4. Cambios en el módulo elástico (G') y módulo viscoso (G'') según el esfuerzo aplicado para las pastas de (a) soja, (b) lenteja y (c) guisante obtenidas tras los diferentes métodos de cocción.	20
Figura 5. Actividad antioxidante medida por el método de captación del radical DPPH de las pastas de (a) soja, (b) lenteja y (c) guisante tras los diferentes métodos de cocción obtenida antes y durante la digestión gastrointestinal simulada.	26
Figura 6. Actividad antioxidante medida por el método del poder reductor del hierro de las pastas de (a) soja, (b) lenteja y (c) guisante tras los diferentes métodos de cocción obtenida antes y durante la digestión gastrointestinal simulada.	27
Figura 7. Actividad antioxidante medida por el método de captación del radical ABTS de las pastas de (a) soja, (b) lenteja y (c) guisante tras los diferentes métodos de cocción obtenida antes y durante la digestión gastrointestinal simulada.	28

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

- AACC: Asociación Americana de Química de los Cereales
- ABTS: Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
- AUC: Área bajo la curva
- a_w : Actividad de agua
- BHT: Hidroxitolueno butilado
- BSA: Albúmina de suero bovino
- C*: Croma
- DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
- FAN: Factores antinutricionales
- FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
- FGS: Fluido gástrico simulado
- FIS: Fluido intestinal simulado
- FSS: Fluido salival simulado
- G' : Módulo elástico
- G'' : Módulo viscoso
- G^* : Módulo complejo
- GU: Guisante
- GUC: Guisante con cocción convencional
- GUM: Guisante con cocción en microondas
- GUP: Guisante con cocción a presión
- h^* : Tonalidad
- HAT: Transferencia de átomos de hidrógeno
- L^* : Luminosidad
- LAOS: Ensayo oscilatorio de gran amplitud
- LE: Lenteja
- LEC: Lenteja con cocción convencional
- LEM: Lenteja con cocción en microondas
- LEP: Lenteja con cocción a presión
- LVR: Región viscoelástica lineal
- MAPA: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación
- PBS: Tampón fosfato salino
- RP: Poder reductor del hierro
- SAOS: Ensayo oscilatorio de pequeña amplitud
- SDS: Docecilsulfato sódico
- SET: Transferencia de electrones
- SO: Soja
- SOC: Soja con cocción convencional
- SOM: Soja con cocción en microondas
- SOP: Soja con cocción a presión
- $\tan \delta$: Tangente del ángulo de fase
- TCA: Ácido tricloroacético
- TE: Equivalentes de Trolox
- TNBS: Ácido trinitrobenzenosulfónico
- δ : Ángulo de fase
- η^* : Viscosidad compleja
- σ_{LVR} : Esfuerzo en la LVR

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Las legumbres como alimento y su consumo

Las legumbres son cultivos de la familia *Leguminosae* también llamada *Fabaceae*, la cual incluye más de 19.500 especies clasificadas en alrededor de 750 géneros. Las leguminosas constituyen uno de los grupos de plantas más importantes para la humanidad, ya que ocupan el segundo lugar después de los cereales en el suministro de cultivos alimentarios para la agricultura mundial (Abbas y Ahmad, 2018). Se cultivan principalmente por sus semillas comestibles y, por lo tanto, también se denominan leguminosas de grano. Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), las alubias o judías secas (*Phaseolus vulgaris*), las lentejas (*Lens culinaris*) y los guisantes (*Pisum sativum*) son los tipos de legumbres más comúnmente conocidos y consumidos (FAO 2021).

Como cultivo, las leguminosas son importantes a nivel medioambiental ya que tienen la capacidad de fijar nitrógeno, lo que las hace un candidato importante para mantener la fertilidad, mejorar la condición física del suelo, y mantener el equilibrio ambiental, permitiendo un menor uso de agroquímicos y fertilizantes (Courty *et al.*, 2015). Además, su cultivo puede mitigar significativamente la contribución agrícola al cambio climático al reducir el uso de energía, la emisión de gases de efecto invernadero y mantener un balance positivo de carbono en el suelo (Martín-Cabrejas, 2019).

Las legumbres son seguras para el consumo, relativamente económicas y fáciles de conseguir, por lo que a lo largo de la historia han supuesto la principal fuente de proteínas de origen vegetal en la alimentación de millones de personas en todo el mundo. Sin embargo, en los últimos años se ha podido detectar un bajo consumo de legumbres, influenciado en parte, por la rápida evolución en los hábitos alimentarios de la población, en los que se ha visto un progresivo abandono de los alimentos básicos a favor de productos más transformados y procesados. Como medida correctiva de esta tendencia y con el objetivo de promover el valor y consumo de las legumbres y concienciar sobre sus beneficios, la FAO anunció el 2016 como el Año Internacional de las Legumbres (FAO 2016). Aprovechando el éxito obtenido, la Asamblea General de las Naciones Unidas designó el 10 de febrero como Día Mundial de las Legumbres. Además, las recomienda como uno de los alimentos esenciales para satisfacer las necesidades básicas de proteínas y energía de la dieta humana (Margier *et al.*, 2018).

Tal y como refleja el informe del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA) sobre el consumo alimentario en España (2019), el mercado de las legumbres creció un 5,1 % en volumen durante el año 2019, llegando hasta los 346 millones de kilogramos en 2020. En valor, se mantiene la misma tendencia y su incremento fue de un 4,2 %, suponiendo 180,8 millones de € en 2020 (Figura 1).

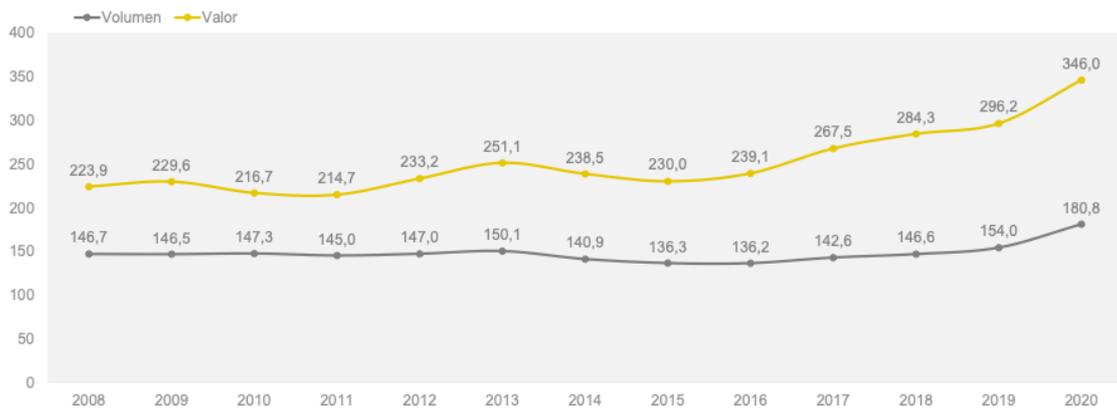


Figura 1. Volumen (millones de kilogramos) y valor total (€) de legumbres durante el periodo 2008-2020. Fuente: MAPA

El consumo de legumbres per cápita se sitúa en 4,1 kilogramos por persona y año, una cantidad que se incrementó un 22,75 % en 2020 respecto al periodo anterior (Figura 2), siendo este incremento directamente proporcional al auge de las legumbres cocidas. En España en el año 2020, la legumbre más consumida fue el garbanzo, con una ingesta aproximada por persona de 1,39 kilogramos/año, mientras que el consumo de lentejas y alubias fue de 0,98 y 0,94 kilogramos/persona/año, respectivamente.

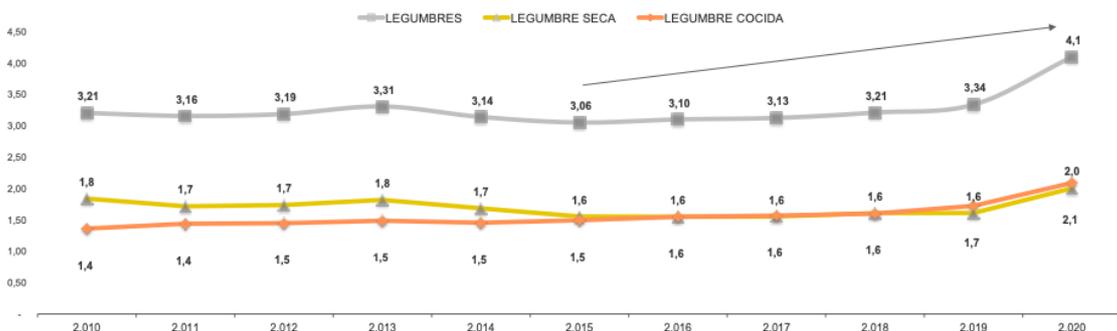


Figura 2. Consumo de legumbres per cápita durante el periodo 2010-2020 (kilogramos/persona y año). Fuente: MAPA

Las legumbres se pueden incluir en la dieta como ingredientes en una gran variedad de platos, ya sea en ensaladas, guisos, pastas o purés, lo que hace que puedan ser consumidas por toda la población en general. Las pastas o purés de legumbres requieren poca o ninguna masticación, son productos suaves, húmedos, no pegajosos, homogéneos y fáciles de tragar, lo que evita cualquier peligro por asfixia y los convierte en una buena opción para la alimentación de personas ancianas, con problemas de deglución o incluso bebés (Sungsinchai *et al.*, 2019).

1.2 Composición química de las legumbres

Las legumbres son ricas en proteínas, y contienen cantidades importantes de hidratos de carbono, fibra, vitaminas y minerales esenciales. Los hidratos de carbono presentes en las legumbres se consideran complejos, con lo cual son lentamente digeridos y absorbidos por el intestino. También presentan un alto contenido de fibra, principalmente soluble, y en general,

contienen un bajo contenido en grasas, principalmente ricas en ácidos grasos poliinsaturados y monoinsaturados. En cuanto a las vitaminas y minerales, las legumbres destacan por su contenido en vitamina B₁ (tiamina), B₃ (niacina), B₆ (piridoxina) y folatos, así como en calcio, magnesio, potasio, fósforo, zinc y hierro (Martín-Cabrejas, 2019).

Las legumbres suponen la principal fuente de proteínas de origen vegetal. Su contenido oscila entre el 20 % y el 40 % siendo los altramuces junto con la soja los que presentan el mayor contenido (36,2 % y 35,9 % respectivamente), seguidos de las lentejas (23,8 %), guisantes (21,6 %) garbanzos (19,4 %) y alubias (19 %) (Vaz Patto, 2016; Perales Enjamio *et al.*, 2013). Sin embargo, este contenido proteico presenta gran variabilidad ya que depende de la especie, genotipo y condiciones medioambientales. Las principales proteínas que se encuentran en las legumbres son las globulinas y las albúminas, que representan sobre un 70 % y un 15 %, respectivamente. Las globulinas son solubles en sal, y están compuestas mayoritariamente por legumina y vicilina, mientras que las albúminas son solubles en agua e incluyen enzimas y lectinas. En menor proporción se encuentran las prolaminas, que son solubles en alcohol, y las glutelinas, que son solubles en detergentes ácidos o bases diluidos (Boye *et al.*, 2010). Una de las propiedades que define la calidad de las proteínas es la composición en aminoácidos esenciales. En el caso de las legumbres, en general son ricas en lisina y leucina, pero carecen de aminoácidos azufrados (metionina y cisteína) y triptófano. Al contrario, los cereales son ricos en metionina pero deficitarios en lisina (Vaz Patto, 2016), por lo que serían productos nutricionalmente complementarios para obtener proteína vegetal de alto valor biológico.

A pesar de ser una fuente de proteínas y de tener un buen perfil nutricional, la utilización de las legumbres está condicionada por la presencia de factores antinutricionales (FAN). Estos compuestos son metabolitos secundarios de origen natural que protegen a la planta frente situaciones de estrés como los ataques de plagas. Algunos ejemplos de FAN son los taninos, ácido fítico, saponinas, lectinas, inhibidores de tripsina y oligosacáridos como la rafinosa, estaquiosa y verbascosa (Avilés-Gaxiola *et al.*, 2018). Los FAN afectan a la digestibilidad de proteínas, a la biodisponibilidad de aminoácidos y minerales (Gilani *et al.*, 2005; Abbas y Ahmad, 2018), y en algunas ocasiones pueden ser tóxicos o causar efectos fisiológicos indeseables (Muzquiz *et al.*, 2012). Entre los FAN que afectan a la digestibilidad de las proteínas, los inhibidores de tripsina son uno de los que causan mayor preocupación. Estos son capaces de inhibir la actividad de las enzimas pancreáticas tripsina y quimiotripsina, lo que reduce la digestión y la absorción de proteínas como consecuencia de la formación de complejos indigeribles (Avilés-Gaxiola *et al.*, 2018). El ácido fítico forma complejos con los minerales de la dieta (Ca, Zn, Fe y Mg) y los hace no disponibles para su absorción; inactiva algunas enzimas digestivas como las proteasas, inhibiendo la proteólisis al competir por los cofactores minerales que necesitan para estar activas; y puede inactivar las α -amilasas lo que provoca una alteración en el metabolismo de los carbohidratos (Joye, 2019; Parca *et al.*, 2018). Por su parte, los taninos, tienen la capacidad de formar complejos y precipitar las proteínas, reduciendo su digestibilidad, y pueden inhibir la actividad enzimática de la amilasa, lipasa, tripsina y quimiotripsina, lo que conlleva a una disminución de la digestibilidad de los nutrientes (Gilani *et al.*, 2012; Abbas y Ahmad, 2018). Por último, las lectinas son proteínas que se unen a los azúcares, presentan alta resistencia a la proteólisis y son estables en un amplio rango de pH (Joye, 2019).

1.3 El procesado de las legumbres

El procesado de las legumbres, incluyendo procesos como el remojo, cocción, fermentación o germinación de las semillas, contribuye a la reducción o la inactivación de los FAN y mejora la digestibilidad de las proteínas.

El remojo es el método de procesado más simple y económico. Normalmente se utiliza como pretratamiento con el fin de ablandar la semilla y acortar el tiempo de cocción. Además, permite la eliminación de los FAN solubles en agua, aunque su efectividad depende de la temperatura, pH y tiempo (Avilés-Gaxiola *et al.*, 2018). Entre los posibles FAN que se eliminan mediante el remojo encontramos el ácido fítico, los taninos, los inhibidores de tripsina y los oligosacáridos (Abbas y Ahmad, 2018).

Los tratamientos térmicos tienen un papel importante en la palatabilidad de las legumbres, así como en la mejora de la digestibilidad y del valor nutricional. Las proteínas a menudo se encuentran formando estructuras supramoleculares y/o están atrapadas físicamente en estructuras celulares, lo que restringe el acceso de las enzimas para iniciar su hidrólisis (Bhattarai *et al.*, 2017). En este caso, los tratamientos térmicos desencadenan alteraciones en dichas estructuras y/o desnaturalizan las proteínas lo que permite que las enzimas digestivas obtengan un acceso más fácil, mejorando así la digestibilidad de las proteínas. Además, los procesos térmicos tienen la capacidad de inactivar los FAN termolábiles como los inhibidores de tripsina, ya que el proceso promueve la rotura de los enlaces intermoleculares responsables de mantener la estructura terciaria y la actividad del compuesto (Avilés-Gaxiola *et al.*, 2018).

Los tratamientos térmicos más utilizados en el cocinado doméstico de las legumbres incluyen la cocción convencional y la cocción a presión. Ambos métodos implican cocer las legumbres mediante inmersión en agua en ebullición, pero en el caso de la cocción a presión se alcanzan presiones más altas que la atmosférica, lo que eleva la temperatura de ebullición y permite acortar el tiempo de procesado (Drulyte y Orlien, 2019). En estos casos, la mejora de la digestibilidad no solo se debe a la desnaturalización proteica y a la inactivación de FAN, sino también a la eliminación de estos compuestos por lixiviación en el agua de cocción. Otro tratamiento térmico alternativo a los métodos nombrados anteriormente es la cocción en microondas. La energía de las microondas es una radiación no ionizante que conduce a la generación instantánea de calor dentro del producto (Marconi *et al.*, 2000). Se considera eficaz en la inactivación de algunos FAN, como los inhibidores de proteasas, sin afectar a la calidad de los nutrientes y las proteínas, aunque dependerá de la duración de la exposición. Por ello, podría considerarse un tratamiento interesante como alternativa a los métodos convencionales ya que se puede conseguir un nivel adecuado de inactivación de los FAN en un menor periodo de tiempo (Vagadia *et al.*, 2017).

Por otra parte, también se utilizan tratamientos no térmicos, como la fermentación y la germinación. En ambos casos lo que se busca es mejorar las características organolépticas y nutricionales de las legumbres mediante la acción enzimática. En el caso de la germinación se favorecen las condiciones para que actúen las enzimas presentes en las propias legumbres y en la fermentación son los microorganismos los responsables de producirlas (Sá *et al.*, 2019; Abbas y Ahmad, 2018).

En consecuencia, el método de procesado influye de manera importante en la digestibilidad de las legumbres, pero esta se ve también afectada por el tipo de legumbre, la variedad, la composición y la estructura.

1.4 Digestibilidad y bioactividad de las legumbres

La digestión gastrointestinal es un proceso complejo en el que los alimentos ingeridos se transforman en nutrientes a través de alteraciones mecánicas y enzimáticas, mediante el cual las macromoléculas se hidrolizan en sus componentes básicos para su absorción. Dichos compuestos son utilizados por el organismo como fuente de energía para el mantenimiento y el crecimiento celular. La digestibilidad de los alimentos se puede considerar una de las cualidades más importantes para evaluar su valor nutricional, y su estudio *in vivo* permite comprender los efectos y cambios reales de los nutrientes durante la digestión. Sin embargo, los estudios *in vivo* son muy complejos y costosos, por lo que los ensayos *in vitro* son una estrategia fácil, rápida y adecuada para investigar de forma simulada los cambios de los alimentos durante el proceso de digestión gastrointestinal (Ogawa *et al.*, 2018). A pesar de esto, las diferencias en las condiciones y en los parámetros experimentales utilizados en los distintos ensayos simulados provoca diferencias considerables en la evaluación de la digestibilidad, complicando la comparación de los resultados (Drulyte y Orlie, 2019). Para evitar estos inconvenientes, se requiere la estandarización de los protocolos de digestión gastrointestinal simulada, como el desarrollado por la red internacional INFOGEST (Minekus *et al.*, 2014; Brodkorb *et al.*, 2019).

La digestión gastrointestinal comienza en la fase oral, siendo la masticación la primera fuerza mecánica y la que en mayor medida contribuye a desestructurar la matriz alimentaria. Esta fase también sirve para mezclar el alimento con la saliva conformando el bolo alimentario. La saliva contiene α -amilasa, la cual es la enzima encargada de iniciar la hidrólisis de los carbohidratos. Posteriormente, tras la deglución, el bolo llega al estómago y comienza la fase gástrica. En esta etapa, la pepsina se encarga de iniciar la hidrólisis de las proteínas, obteniéndose como productos péptidos relativamente grandes y algunos aminoácidos. La lipasa gástrica es otra de las enzimas presentes en esta fase, pero su contribución a la lipólisis total no llega al 30 % (Guo *et al.*, 2017). Por último, en la fase intestinal, el páncreas secreta el jugo pancreático que contiene una mezcla de enzimas que incluye proteasas y peptidasas (principalmente tripsina y quimotripsina), amilasa y lipasa pancreáticas. En esta fase continúa la hidrólisis de las proteínas, generando un conjunto de pequeños péptidos y aminoácidos libres. Asimismo, las amilasas retoman la actividad glicolítica que había iniciado la α -amilasa salival, completando la hidrólisis de los carbohidratos. Por su parte, la lipasa pancreática, en presencia de colipasa y sales biliares, continuará la lipólisis que había iniciado la lipasa gástrica (Hur *et al.*, 2011; Joye, 2019).

La digestibilidad de las legumbres depende no solo de su composición nutricional, sino también de la estructura de la matriz y de los cambios que haya sufrido durante el procesado. Por lo tanto, la estructura de la matriz determina la liberación de los nutrientes durante la digestión, modulando la cinética y el grado en que se hacen disponibles para la absorción. Algunos tipos de procesado como la cocción o la molienda pueden ayudar a aumentar la bioaccesibilidad de diferentes compuestos al modificar la integridad estructural, particularmente de las paredes celulares, provocando su liberación al entorno extracelular (Aguilera, 2019).

Los compuestos bioactivos están presentes de manera natural en los alimentos y además de su valor nutricional, proporcionan beneficios para la salud. En este sentido, diversos estudios epidemiológicos han relacionado el consumo de legumbres con una menor incidencia de padecer enfermedades cardiovasculares, cáncer, diabetes, hipertensión, hipercolesterolemia, trastornos gastrointestinales o enfermedad suprarrenal (Boye *et al.*, 2010). Estos beneficios han sido principalmente atribuidos a la presencia de péptidos bioactivos y compuestos fenólicos.

Los péptidos bioactivos son fragmentos proteicos de entre 2 y 20 aminoácidos, que pueden estar presentes de forma natural en los alimentos o pueden obtenerse mediante la hidrólisis enzimática de determinadas proteínas. Esa hidrólisis puede llevarse a cabo durante el procesado, de forma natural durante el proceso de digestión gastrointestinal o puede ser inducido mediante la utilización de enzimas comerciales o microorganismos en condiciones controladas. Cuando los péptidos se encuentran formando parte de la secuencia de la proteína de origen están inactivos, por lo que necesitan liberarse por hidrólisis para ejercer actividades fisiológicas (Kumar *et al.*, 2019).

Para ejercer su bioactividad en el organismo, los péptidos bioactivos presentes en el alimento deben resistir la acción de las peptidasas durante la digestión gastrointestinal, de forma que no se produzca la degradación de sus secuencias, y sean absorbidos para alcanzar sus sitios de acción de forma intacta (Bhandari *et al.*, 2020). Durante el proceso de digestión también pueden generarse nuevos péptidos bioactivos, resultantes de la acción de las enzimas pepsina, tripsina y quimotripsina sobre las proteínas. La actividad de los péptidos bioactivos va a depender de su biodisponibilidad, de las posibles interacciones con otros compuestos, de la resistencia a la actividad de las enzimas digestivas y de su capacidad de alcanzar los órganos diana para ejercer su acción.

Se han identificado numerosos péptidos bioactivos en las legumbres, con diferentes bioactividades dependiendo del tamaño y de la secuencia de aminoácidos que presentan. Algunos de estos actúan como antihipertensivos, inmunoestimulantes, antimicrobianos, antioxidantes, antiinflamatorios y anticancerígenos (Kamran y Reddy, 2018). Una de las actividades más importantes de los péptidos bioactivos es su capacidad antioxidante, que puede atribuirse a la eliminación de radicales, inhibición de la peroxidación de los lípidos y quelación de iones metálicos. La presencia prolongada de radicales libres puede provocar daños en los sistemas biológicos, causando la aparición de enfermedades como la aterosclerosis, artritis, diabetes o cáncer (Johansen *et al.*, 2005). Los péptidos antioxidantes se consideran compuestos estables, seguros, con bajo peso molecular, alta actividad y fácil absorción. Dicha capacidad antioxidante está muy relacionada con su composición, estructura e hidrofobicidad, siendo el triptófano, tirosina, metionina, lisina, cisteína e histidina algunos ejemplos de aminoácidos que aportan actividad antioxidante (Sarmadi y Ismail, 2010).

Otros de los compuestos bioactivos presentes en las legumbres son los compuestos fenólicos, los cuales son metabolitos secundarios bioactivos que incluyen compuestos de diversas estructuras, pesos moleculares y propiedades. Según su estructura química se dividen en flavonoides y no flavonoides. La mayoría de estos se encuentran en las cubiertas de las semillas de las leguminosas y principalmente se tratan de ácidos fenólicos, flavonoides y taninos condensados (Singh *et al.*, 2017). Se consideran esenciales para la calidad de productos alimenticios derivados de plantas al ser determinantes para el color, gusto y sabor de los alimentos (Giusti *et al.*, 2019), pero también por poseer muchos beneficios para la salud. Algunos de ellos actúan como agentes anticancerígenos, antitrombóticos, antialérgicos, antioxidantes o antimicrobianos (Singh *et al.*, 2017). Entre los beneficios de los compuestos fenólicos destacan sus propiedades antioxidantes. Son capaces de neutralizar los radicales libres al donar un electrón o un átomo de hidrógeno debido a su sistema altamente conjugado. Reducen la tasa de oxidación suprimiendo la generación de radicales libres o desactivando las especies reactivas y precursores de los radicales libres. Su actividad antioxidante está relacionada con su estructura química, número y posición de los grupos hidroxilos (Cirkovic Velickovic y Stanic-Vucinic, 2017).

Para poder ejercer efectos beneficiosos en el organismo, los compuestos bioactivos deben de estar biodisponibles, es decir, que la fracción del componente ingerido esté disponible para su utilización en funciones fisiológicas normales (Cilla *et al.*, 2018). Durante la digestión, los fenoles pueden interactuar con otras moléculas de la matriz como por ejemplo las proteínas, lo que afectaría tanto a la disponibilidad de los fenoles como a la digestión de las proteínas y por consecuencia a la posible liberación de péptidos bioactivos. Además de las proteínas, los fenoles pueden interactuar con iones de hierro o zinc durante la digestión, proceso que provoca la pérdida de compuestos fenólicos debido a la formación de quelatos (Karaś *et al.*, 2017).

Por lo tanto, conocer los cambios fisicoquímicos que ocurren en los alimentos durante el proceso de la digestión, así como los diversos factores que influyen en la digestibilidad, bioaccesibilidad y biodisponibilidad es útil para diseñar alimentos funcionales. Para evaluar esto se utilizan los modelos *in vitro*, que imitan los procesos fisiológicos que ocurren durante la digestión gastrointestinal (Minekus *et al.*, 2014). Sin embargo, se requieren ensayos *in vivo* adicionales para verificar dicho efecto fisiológico en el organismo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

El objetivo general del trabajo es evaluar el efecto de diferentes métodos de cocción sobre las características fisicoquímicas de diferentes pastas de legumbres (soja, lenteja y guisante), así como en la digestibilidad proteica y la actividad antioxidante durante la digestión gastrointestinal simulada.

2.2 Objetivos específicos

Para alcanzar ese objetivo general, se plantearon diferentes objetivos específicos:

- Caracterización de las pastas de soja, lenteja y guisante mediante el análisis de parámetros fisicoquímicos, textura y comportamiento viscoelástico.
- Evaluación de la digestibilidad de las proteínas durante la digestión gastrointestinal *in vitro*.
- Evaluación de la actividad antioxidante durante la digestión gastrointestinal *in vitro*.

2.3 Plan de trabajo

El plan de trabajo para conseguir los objetivos propuestos es el siguiente:

- Remojo y cocinado de cada legumbre (soja, lenteja y guisante) mediante distintos métodos: cocción convencional, cocción a presión y microondas.
- Preparación de las distintas pastas de legumbres.
- Análisis de parámetros fisicoquímicos: humedad, actividad de agua, pH, sólidos solubles, color.
- Análisis de textura mediante un ensayo de extrusión inversa, y del comportamiento viscoelástico mediante ensayos oscilatorios.
- Digestión gastrointestinal *in vitro* de las pastas.
- Determinación del contenido de proteínas solubles, péptidos y grupos amino libres en las distintas etapas de la digestión (oral, gástrica, intestinal).
- Determinación del contenido de fenoles totales en las distintas etapas de la digestión.
- Determinación de la capacidad antioxidante de las pastas en las distintas etapas de la digestión.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales y reactivos

Para la elaboración de las distintas pastas de legumbres se emplearon semillas secas de soja (*Glycine max*), lenteja (*Lens culinaris*) y guisante (*Pisum sativum*) adquiridas en Leantomange, S.L. (Pozuelo de Alarcón, Madrid, España).

Para la simulación de la digestión gastrointestinal se utilizaron las enzimas α -amilasa salival humana, pepsina de mucosa gástrica porcina, pancreatina de páncreas porcino y extracto de bilis porcino de Sigma-Aldrich, Co. (St. Louis, MO, EE.UU.), y las sales cloruro de potasio (KCl), fosfato monopotásico (KH_2PO_4), bicarbonato de sodio (NaHCO_3), cloruro de sodio (NaCl), cloruro de magnesio hexahidratado ($\text{MgCl}_2(\text{H}_2\text{O})_6$), carbonato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ y cloruro de calcio (CaCl_2) de Scharlau Chemie, S.A. (Sentmenat, Barcelona, España).

Para los ensayos de digestibilidad proteica y contenido en fenoles totales se utilizaron los reactivos siguientes: azul Coomassie G-250, albúmina de suero bovino (BSA), L-tirosina, ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS), docecilsulfato sódico (SDS) y L-leucina de Sigma-Aldrich, Co. (St. Louis, MO, EE.UU.); ácido tricloroacético (TCA), reactivo de Folin-Ciocalteu, y ácido gálico de Scharlau Chemie, S.A. (Sentmenat, Barcelona, España).

Para los ensayos de actividad antioxidante se utilizaron los reactivos siguientes: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), hidroxitolueno butilado (BHT), persulfato de potasio, sal de diamonio del ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) de Sigma-Aldrich, Co. (St. Louis, MO, EE.UU.); ferrocianuro de potasio y cloruro férrico de MP Biomedicals, LLC. (Solon, OH, EE.UU.); Trolox de Acros Organics (Fair Lawn, NJ, EE.UU.), y ácido ascórbico de Scharlau Chemie, S.A. (Sentmenat, Barcelona, España).

3.2 Elaboración de las pastas de legumbres

Las legumbres se pusieron a remojo en agua durante 12 horas, con una proporción legumbres:agua de 1:3 (p/v), y a continuación se sometieron a tres métodos de cocción diferentes con una proporción legumbres:agua de 1:6 (p/v):

- Cocción convencional a 100 °C durante 40 minutos.
- Cocción a presión a 8,7 psi durante 15 minutos.
- Cocción en microondas a 800W durante 20 minutos.

Para elaborar las pastas se añadieron 15 g agua por cada 100 g de legumbre y se trituraron con una batidora Taurus Robot 300W (Taurus Group, S.L., Barcelona, España) durante 4 minutos en intervalos de 30 segundos para obtener pastas homogéneas.

Por cada legumbre se obtuvieron tres pastas diferentes correspondientes a los tres métodos de cocción. Estas muestras fueron nombradas según el tipo de legumbre: SO (soja), LE (lenteja), o GU (guisante) seguido del método de cocción: C (cocción convencional), P (cocción a presión) o M (microondas).

En la Figura 3 se muestran las semillas de soja, lenteja y guisante remojadas y cocidas, así como las pastas obtenidas de la trituración de las legumbres.

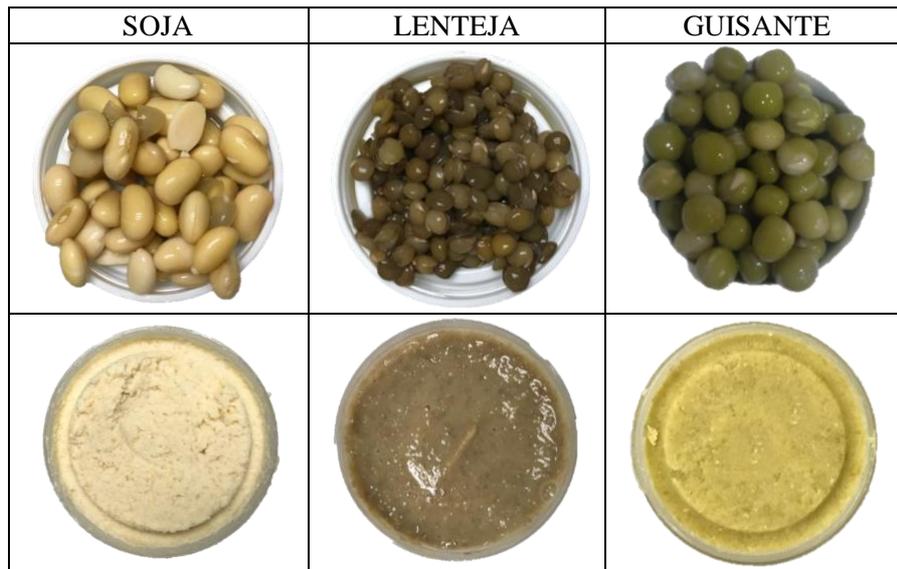


Figura 3. Semillas de soja, lenteja y guisante y las pastas obtenidas para cada legumbre.

3.3 Caracterización fisicoquímica de las pastas

3.3.1 Humedad

La determinación de la humedad de las pastas se realizó mediante el método gravimétrico indirecto por desecación en estufa descrito por la AACC (2000). Para ello se adicionó una cantidad de muestra en un crisol previamente seco y pesado, se colocó en una estufa y se fue pesando hasta obtener tres pesadas consecutivas constantes. Para el cálculo de la humedad se empleó la ecuación (1):

$$\% \text{ Humedad} = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \times 100 \quad (1)$$

Siendo m_1 la masa del crisol vacío, m_2 la masa del crisol y la muestra húmeda, y m_3 el peso del crisol con la muestra seca.

3.3.2 Actividad de agua

Para la determinación de la actividad de agua (a_w) se empleó un higrómetro de punto de rocío (Aqua Lab S3, Decagon Devices, Inc., Pullman, WA, EE.UU.) con una sensibilidad de 0,001, el cual se calibró previamente con soluciones salinas saturadas. Las determinaciones se realizaron a temperatura ambiente y por duplicado.

3.3.3 pH

Para determinar el pH se utilizó un pH-metro (*Basic 20+*, Crison Instruments, S.A., Barcelona, España) previamente calibrado, a temperatura ambiente. Para ello se introdujo el electrodo directamente en un vaso que contenía la pasta, realizando la medida por duplicado.

3.3.4 Sólidos solubles

La determinación de sólidos solubles se realizó utilizando un refractómetro digital (HI 96801, Hanna Instruments, Woonsocket, RI, EE.UU.). Las pastas fueron diluidas en agua para realizar las medidas, obteniéndose los valores de ° Brix a partir de la ecuación (2) (Cháfer, 2000). Las medidas se realizaron a temperatura ambiente y por duplicado.

$$\frac{^{\circ} \text{Brix}}{100} = \frac{m_p \cdot x_{ss}}{m_p \cdot x_w + m_p \cdot x_{ss} + m'_w} \quad (2)$$

Siendo m_p la masa de la pasta, x_{ss} los sólidos solubles, x_w la humedad y m'_w la masa de agua añadida para diluir.

3.3.5 Color

El color se midió con un espectrocolorímetro Minolta CM-700d (Konica Minolta Sensing, Inc., Osaka, Japón). Tras la calibración del equipo, se obtuvo el espectro de reflexión y se determinaron las coordenadas de color CIE-L*a*b* (L^* , a^* , b^*) y los atributos de color (L^* , Luminosidad, h^* , tonalidad; C^* , croma) utilizando como referencia el observador 10° y el iluminante D65. Las medidas se realizaron por duplicado.

3.3.6 Textura y comportamiento viscoelástico

La textura de las pastas se determinó mediante un ensayo de extrusión inversa (“Back extrusión”) con un analizador de textura TA-TX2 (Stable Micro Systems Ltd., Reading, Reino Unido). La muestra se añadió a un recipiente de vidrio (50 mm de diámetro y 70 mm de altura) hasta una altura de 40 mm y se utilizó una sonda cilíndrica (35 mm de diámetro) para comprimir la muestra. La prueba se llevó a cabo a una tasa de compresión de $1 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$ hasta un 75 % de deformación de la muestra. La fuerza máxima (firmeza) y el área bajo la curva (AUC; consistencia) se obtuvieron de los perfiles de fuerza-distancia utilizando el software Exponent (Stable Micro Systems Ltd.). Las medidas se realizaron a temperatura ambiente y por duplicado.

La caracterización viscoelástica de las pastas se realizó en un reómetro Kinexus Pro+ (Malvern Instruments Ltd., MA, EE.UU.) equipado con una geometría placa-placa (PLC61/PU40), siguiendo la metodología descrita por Talens *et al.* (2021) con algunas modificaciones. La muestra se colocó en la superficie de la placa inferior y la placa superior se bajó hasta alcanzar una distancia entre las placas de 1 mm. Se realizaron ensayos oscilatorios de gran amplitud (LAOS) para caracterizar las propiedades viscoelásticas no lineales y determinar los límites de la región viscoelástica lineal (LVR). Las pruebas de barrido de esfuerzo se realizaron a 1 Hz dentro de un rango de 1 a 2.000 Pa, registrándose los cambios en el módulo elástico (G' , Pa) y el módulo viscoso (G'' , Pa) con el esfuerzo, y obteniendo los valores del módulo elástico en la LVR (G'_{LVR} , Pa), el esfuerzo en la LVR (σ_{LVR} , Pa) y el punto de flujo (Pa). Las propiedades viscoelásticas lineales de las muestras también se caracterizaron mediante ensayos oscilatorios de pequeña amplitud (SAOS), usando un rango de frecuencias de 0,1 a 100 Hz a un esfuerzo constante dentro de la LVR. Se registraron los cambios en el módulo elástico (G' , Pa), módulo viscoso (G'' , Pa), módulo complejo (G^* , Pa), viscosidad compleja (η^* , Pa), ángulo de fase (δ , °) y tangente del ángulo de fase ($\text{Tan } \delta = G''/G'$, adimensional). Las medidas se realizaron a temperatura ambiente y por duplicado, y los datos se obtuvieron mediante el software rSpace (Malvern Instruments Ltd.).

3.4 Digestión gastrointestinal *in vitro*

La simulación de digestión gastrointestinal se realizó siguiendo el protocolo estandarizado INFOGEST (Minekus *et al.*, 2014; Brodkorb *et al.*, 2019).

La preparación de los fluidos digestivos, el fluido salival simulado (FSS), el fluido gástrico simulado (FGS) y el fluido intestinal simulado (FIS), se llevó a cabo según Minekus *et al.* (2014). En la Tabla 1 se indican las concentraciones (mmol/L) de electrolitos utilizados para preparar los diferentes fluidos digestivos:

Tabla 1. Concentración (mmol/L) de electrolitos en los fluidos salival (FSS), gástrico (FGS) e intestinal (FIS).

Electrolito	Concentración (mmol/L)		
	FSS	FGS	FIS
KCl	15,1	6,9	6,8
KH ₂ PO ₄	3,7	0,9	0,8
NaHCO ₃	13,6	25	85
NaCl	-	47,2	38,4
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	0,15	0,1	0,33
(NH ₄) ₂ CO ₃	0,06	0,5	-
CaCl ₂	1,5	0,15	0,6

Para simular la fase oral, el FSS (pH 7) y la α -amilasa salival (75 U/mL) se añadieron a la muestra en proporción 1:1 (v/p). La mezcla fue agitada a 40 rpm durante 2 min a 37 °C en un agitador Intell-Mixer RM-2M (ELMI Ltd., Riga, Letonia) colocado en una cámara de incubación (JP Selecta, S.A., Barcelona España). Para simular la fase gástrica, se añadió FGS y pepsina gástrica (2000 U/mL) al bolo oral en proporción 1:1 (v/v). A continuación, el pH se ajustó a 3 con HCl (1M) y la mezcla se incubó durante 2 h a 37 °C como se ha descrito anteriormente. Para simular la fase intestinal, el quimo gástrico se mezcló en proporción 1:1 (v/v) con FIS (pH 7), bilis (10 mM) y pancreatina (basado en la actividad de tripsina para conseguir 100 U/mL). El pH de la mezcla se ajustó a 7 con NaOH (1M) y se incubó 2 h a 37 °C. Trascurrido este tiempo, la digestión se finalizó mediante la inactivación de las enzimas en un baño de agua a 100 °C durante 5 minutos, seguido de un baño con hielo durante 10 minutos. Las muestras fueron después centrifugadas a 8.000 rpm durante 10 min a 4 °C, se separaron los sobrenadantes y se congelaron a -20 °C hasta su posterior análisis. La digestión se realizó por duplicado para cada muestra, con tubos independientes para cada una de las fases (oral, gástrica e intestinal). Para obtener las muestras sin digerir, se mezcló cada muestra con agua en proporción 1:1 (p/v). Además, se prepararon muestras control, que únicamente contenían las enzimas y la bilis (sin muestra), las cuales fueron sometidas el mismo proceso de digestión gastrointestinal simulada. Estas muestras fueron posteriormente analizadas y los valores obtenidos sustraídos de los de las muestras digeridas.

3.5 Determinación de proteínas, péptidos y grupos amino libres

El contenido de proteínas solubles se determinó por duplicado mediante el método Bradford (Bradford, 1976). El reactivo de Bradford se preparó mezclando 40 mg de azul de Coomassie G-250 con 25 mL de etanol 95 % y 50 mL de ácido fosfórico 85 %, se aforó a 500 mL con agua y se filtró con un filtro Whatman nº 1. Para el ensayo, a 40 µL de muestra se le añadieron 2 ml del reactivo de Bradford, la mezcla se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro UV-Visible (Helios Zeta, Thermo Scientific, Reino Unido). La cantidad de proteínas solubles se calculó a partir de una curva patrón de BSA (0-1 mg/mL) y los resultados se expresaron como mg BSA/g muestra seca.

El contenido de péptidos solubles en TCA se determinó por duplicado según el protocolo descrito por Ketnawa y Ogawa (2019). Para ello, se tomaron 50 µL de muestra y se le añadieron 450 µL de TCA al 5 %, se mezcló y se incubó durante 1 hora a 4 °C. Una vez transcurrido dicho tiempo, se centrifugó a 8.000 rpm durante 10 minutos y el contenido de péptidos del sobrenadante se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm. Los resultados se calcularon a partir de una recta patrón de L-tirosina (0-1 mg/mL) y se expresaron en mg de tirosina/g muestra seca.

El contenido de los grupos amino libres se determinó por duplicado utilizando el método TNBS descrito por Adler-Nissen (1979). Para ello, a 40 µL de muestra se le añadieron 320 µL de tampón fosfato de sodio 0,2 M (pH 8,2) y 320 µL de TNBS 0,1 % (v/v), se agitó y se incubó a 50 °C durante 60 minutos. Una vez transcurrido el tiempo, se añadieron 640 µL de HCl 0,1 M para detener la reacción, y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos antes de realizar la lectura de la absorbancia a 340 nm. El contenido de los grupos amino libres se expresó como mg de L-leucina/g muestra seca, los cuales fueron calculados a partir de una recta patrón de L-leucina (1-5 mM).

3.6 Determinación de fenoles totales

El contenido de fenoles totales se determinó por duplicado según el protocolo descrito por Donlao y Ogawa (2018). Para ello, se mezclaron 64 µL de muestra con 320 µL de reactivo Folin-Ciocalteu (10 %, v/v) y 256 µL de Na₂CO₃ (7,5 %, p/v). La mezcla se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente y luego se midió la absorbancia a 765 nm. Los resultados se expresaron en mg de ácido gálico/g muestra seca, los cuales fueron calculados a partir de una recta patrón de ácido gálico (0-200 mg/L).

3.7 Actividad antioxidante

Para analizar la actividad antioxidante de las muestras se utilizaron tres métodos: el método de captación del radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH), el método del poder reductor del hierro (RP) y el método de captación del radical ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS). Las muestras se analizaron por duplicado.

3.7.1 Método del DPPH

Las muestras fueron analizadas utilizando el método del DPPH descrito por Bersuder *et al.* (1998). A 80 μL de muestra se le añadieron 400 μL de etanol y 100 μL de solución DPPH (0,02 % en etanol), se mezcló y se incubó a temperatura ambiente durante 60 minutos en oscuridad. Los radicales reducidos se midieron en un espectrofotómetro a 517 nm. Como control negativo se utilizó agua bidestilada y como control positivo BHT a una concentración de 2 mg/mL. Los resultados se expresaron como mmol de equivalentes de Trolox (TE)/g muestra seca, calculados a partir de una recta patrón de Trolox (0-200 μM).

3.7.2 Método del poder reductor del hierro

La medida de la actividad antioxidante se llevó a cabo mediante la medida de la reducción del hierro férrico a ferroso descrito por Tsai *et al.* (2006). Para ello, a 100 μL de muestra se le añadieron 100 μL del tampón fosfato de sodio (200 mM, pH 6,6) y 100 μL de ferrocianuro de potasio (10 mg/mL), se mezcló y se incubó en oscuridad a 50 °C durante 20 minutos. Transcurrido el tiempo, se añadieron 100 μL de TCA (100 mg/mL) y se centrifugó a 200 rpm durante 10 minutos. Una vez terminada la centrifugación, 250 μL del sobrenadante se mezclaron con 250 μL de agua bidestilada y 50 μL de cloruro férrico (1 mg/mL), y se midió la absorbancia a 700 nm. Como control negativo se utilizó agua bidestilada y como positivo BHT a una concentración de 2 mg/mL. Los resultados se obtuvieron a partir de una curva patrón de Trolox (0-2 mM) y se expresaron como $\mu\text{mol TE/g}$ muestra seca.

3.7.3 Método del ABTS

Este método se llevó a cabo según el protocolo descrito por Re *et al.* (1999) con pequeñas modificaciones. En primer lugar, se disolvió el ABTS (7 mM) en persulfato potásico (2,45 mM) y se dejó en oscuridad durante 12 h para producir los radicales ABTS^{•+}. Tras ese tiempo, la solución de ABTS se mezcló con tampón fosfato salino (PBS, 50 mM, pH 7,4) en la proporción adecuada para obtener una absorbancia de $0,70 \pm 0,02$ a 734 nm. A continuación, a 10 μL de muestra se le añadieron 990 μL de la solución de ABTS, se agitó, se dejó incubar durante 6 minutos a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 734 nm. Se utilizó PBS como control negativo y ácido ascórbico (4 mM) como control positivo. Los resultados se expresaron como $\mu\text{moles de TE/g}$ muestra seca, calculados a partir de una curva patrón de Trolox (0,5-20 μM).

3.8 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el análisis simple de la varianza (ANOVA) utilizando el programa Statgraphics Centurion XVII (Statgraphics Technologies, Inc., The Plains, VA, EE.UU.). El método empleado para discernir entre las medias fue el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel de confianza del 95 %. Los resultados se expresaron como media de las repeticiones \pm desviación estándar.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

4.1 Caracterización fisicoquímica de las pastas de legumbres

Para el estudio de los parámetros fisicoquímicos de las pastas se analizaron el contenido en humedad, la actividad de agua, el pH, los sólidos solubles y el color. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2. En cuanto a la humedad, las pastas de lenteja y guisante presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los diferentes métodos de cocción, correspondiendo el valor más alto a las muestras cocidas a presión. Así, LEP y GUP presentaron valores de $78,79 \pm 0,43 \%$ y $68,60 \pm 0,30 \%$, respectivamente, mientras que la pasta de soja no presentó diferencias significativas entre los distintos métodos ($p > 0,05$).

La actividad de agua es la cantidad de agua libre en los alimentos que se encuentra disponible para el crecimiento de microorganismos y también para que se puedan llevar a cabo diferentes reacciones químicas, con lo cual es un parámetro muy importante para la conservación y seguridad de los alimentos. En este caso, todas las pastas tenían una actividad de agua de 0,99, no presentando diferencias significativas entre los diferentes métodos de cocción ($p > 0,05$).

El pH es un factor determinante en el crecimiento microbiano, por lo tanto, está directamente relacionado con la estabilidad y la vida útil del producto. Las diferentes pastas presentaron un pH comprendido entre 5,96-7,11. Los distintos métodos de cocción provocaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en las muestras de soja y lenteja, siendo los valores más altos los correspondientes a la cocción convencional, SOC ($6,58 \pm 0,01$) y LEC ($7,11 \pm 0,04$).

Por otra parte, el remojo y la cocción van a afectar a la composición nutricional de las legumbres. Son procesos que ayudan a reducir el contenido de los FAN, pero también pueden provocar pérdidas de otros compuestos hidrosolubles como los minerales, las vitaminas, proteínas o azúcares. Estas pérdidas de sólidos solubles van a depender del tiempo del proceso, la temperatura del agua, el tipo de semilla y los defectos fisicoquímicos de la semilla (Güzel y Sayar, 2012). Las tres pastas presentaron diferencias significativas en el contenido de sólidos solubles entre los diferentes métodos de cocción ($p < 0,05$), correspondiendo en todos los casos el valor más alto a la cocción en microondas, SOM ($13,78 \pm 1,16$), LEM ($7,80 \pm 0,33$) y GUM ($13,49 \pm 0,08$). Estos resultados pueden deberse a que la radiación por microondas genera calor dentro del producto casi de forma instantánea debido al movimiento molecular, lo que hace que se produzcan menos cambios en la estructura molecular, reduciendo así la liberación de compuestos nutritivos. Además, en este caso los nutrientes se verían menos afectados que en la cocción convencional porque el tiempo de preparación es más corto (Marconi *et al.*, 2000)

Tabla 2. Parámetros fisicoquímicos de las pastas de soja, lenteja y guisante obtenidas tras los diferentes métodos de cocción.

Parámetro	Soja		
	Cocción convencional	Cocción a presión	Cocción en microondas
Contenido en humedad (%)	71,40 ± 1,20 ^a	70,85 ± 0,37 ^a	71,15 ± 0,91 ^a
a _w	0,99 ± 0,00 ^a	0,99 ± 0,00 ^a	0,99 ± 0,00 ^a
pH	6,58 ± 0,01 ^a	6,50 ± 0,04 ^a	6,38 ± 0,03 ^b
° Brix	13,13 ± 0,09 ^c	13,27 ± 0,04 ^b	13,78 ± 1,16 ^a
Color	L*	79,11 ± 0,48 ^b	80,42 ± 0,38 ^a
	C*	20,78 ± 0,68 ^a	21,32 ± 0,49 ^a
	h*	83,23 ± 0,13 ^c	84,17 ± 0,16 ^b
Parámetro	Lenteja		
	Cocción convencional	Cocción a presión	Cocción en microondas
Contenido en humedad (%)	76,40 ± 0,23 ^b	78,79 ± 0,43 ^a	73,57 ± 0,62 ^c
a _w	0,99 ± 0,00 ^a	0,99 ± 0,00 ^a	0,99 ± 0,00 ^a
pH	7,11 ± 0,04 ^a	6,98 ± 0,02 ^{ab}	6,77 ± 0,12 ^b
° Brix	3,48 ± 0,02 ^b	2,77 ± 0,38 ^b	7,80 ± 0,33 ^a
Color	L*	48,42 ± 0,47 ^b	50,63 ± 0,62 ^a
	C*	10,94 ± 0,82 ^b	12,70 ± 0,02 ^a
	h*	68,19 ± 0,76 ^b	77,85 ± 0,03 ^a
Parámetro	Guisante		
	Cocción convencional	Cocción a presión	Cocción en microondas
Contenido en humedad (%)	66,56 ± 0,20 ^b	68,60 ± 0,30 ^a	65,40 ± 0,07 ^c
a _w	0,99 ± 0,00 ^a	0,99 ± 0,00 ^a	0,99 ± 0,00 ^a
pH	6,03 ± 0,08 ^a	5,96 ± 0,09 ^a	6,06 ± 0,04 ^a
° Brix	6,85 ± 1,47 ^b	5,85 ± 0,14 ^b	13,49 ± 0,08 ^a
Color	L*	61,33 ± 0,45 ^a	62,06 ± 0,21 ^a
	C*	28,87 ± 0,40 ^b	30,20 ± 0,10 ^a
	h*	88,31 ± 0,30 ^a	87,52 ± 0,05 ^b

Diferentes letras indican diferencias significativas entre los métodos de cocción dentro de la misma legumbre ($p < 0,05$).

El color es una característica muy valorada por los consumidores y es un factor determinante para la aceptación del producto por parte de estos. Para la evaluación del color de las muestras se determinó la luminosidad (L*), el croma (C*) y la tonalidad (h*), y los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2. Los valores más altos de luminosidad se observaron en la pasta de soja, siendo el más alto el de SOM (80,42 ± 0,38), y presentando diferencias significativas con el resto de los métodos de cocción. La pasta de lenteja fue la que presentó menor luminosidad y, de forma similar a la pasta de soja, el valor más alto se obtuvo en LEM (50,63 ± 0,62) y se obtuvieron diferencias significativas con respecto a los otros dos métodos de cocción. La pasta de guisante no presentó diferencias significativas entre los distintos métodos de cocción ($p > 0,05$). En cuanto al croma, la pasta de soja no presentó diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los métodos de cocción, en cambio la pasta de lenteja obtuvo los valores más bajos de croma, presentando diferencias significativas entre LEC y LEP ($p < 0,05$). La pasta de guisante presentó los valores más elevados, comprendidos entre 28,87 y 30,20, y presentando diferencias significativas entre GUC y GUM. Por último, en cuanto a la tonalidad, la pasta de guisante presentó los valores más altos, seguido de la pasta de soja y de la lenteja, y mostrando todas las muestras diferencias

significativas entre los métodos de cocción ($p < 0,05$). Los valores más elevados en cada tipo de legumbre se obtuvieron tras la cocción en microondas, GUM ($88,53 \pm 0,13$), SOM ($87,45 \pm 0,35$) y LEM ($77,85 \pm 0,03$), aunque en el caso del guisante no se observaron diferencias significativas entre GUM y GUC. Algunos de los factores que pueden afectar al color de los alimentos durante el procesado son la degradación de los pigmentos, las reacciones de pardeamiento, la oxidación del ácido ascórbico, la acidez y la contaminación por metales pesados (Güzel y Sayar, 2012).

La textura y la reología son herramientas que nos ayudan a la caracterización física de los alimentos. Son parámetros muy importantes no solamente desde el punto de vista de la aceptación del consumidor, sino que también nos permiten predecir la estabilidad de los productos y alcanzar las condiciones de procesado óptimas para obtener los productos deseados y mejorar la satisfacción de los consumidores.

Las propiedades texturales de las pastas de legumbres sometidas a los diferentes métodos de cocción fueron evaluadas por una prueba de extrusión inversa, obteniéndose la fuerza máxima y el área bajo la curva, que representan la firmeza y consistencia, respectivamente. Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 3. Para la pasta de soja, no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los métodos de cocción en cuanto a la firmeza y consistencia. La pasta de lenteja presentó los valores más bajos de las tres pastas de legumbres en ambos parámetros, con diferencias significativas entre los métodos, y obteniéndose los valores más altos en LEM. En el guisante también se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los métodos de cocción, de modo que GUP presentó un descenso significativo tanto en la firmeza como en la consistencia de la pasta respecto a GUC y GUM.

Tabla 3. Textura y propiedades viscoelásticas de las pastas de soja, lenteja y guisante obtenidas tras los diferentes métodos de cocción.

Parámetro		Soja		
		Cocción convencional	Cocción a presión	Cocción en microondas
Extrusión inversa	Fuerza máx. (N)	21 ± 3 ^a	19 ± 2 ^a	23 ± 4 ^a
	AUC (N·mm)	543 ± 50 ^a	512 ± 57 ^a	606 ± 100 ^a
LAOS	G' _{LVR} (Pa)	39757 ± 8421 ^a	35077 ± 1051 ^a	45944 ± 11974 ^a
	σ _{LVR} (Pa)	158,5 ± 0,0 ^a	114,7 ± 15,8 ^b	158,5 ± 0,0 ^a
	Punto de flujo (Pa)	1151 ± 375 ^a	1180 ± 0,0 ^a	1488 ± 291 ^a
SAOS	G* (Pa)	41955 ± 8676 ^a	36905 ± 1435 ^a	48645 ± 11802 ^a
	G' (Pa)	40860 ± 8655 ^a	35955 ± 1435 ^a	47490 ± 11922 ^a
	G'' (Pa)	9489 ± 1105 ^a	8330 ± 182 ^a	10445 ± 729 ^a
	η* (Pa·s)	6678 ± 1381 ^a	5874 ± 228 ^a	7743 ± 1877 ^a
	δ (°)	13,20 ± 1,23 ^a	13,05 ± 0,23 ^a	12,68 ± 2,24 ^a
	Tan δ	0,235 ± 0,023 ^a	0,232 ± 0,004 ^a	0,225 ± 0,041 ^a
Parámetro		Lenteja		
		Cocción convencional	Cocción a presión	Cocción en microondas
Extrusión inversa	Fuerza máx. (N)	2,16 ± 0,14 ^b	1,08 ± 0,13 ^b	7,12 ± 1,58 ^a
	AUC (N·mm)	48 ± 2 ^b	26 ± 4 ^b	163 ± 31 ^a
LAOS	G' _{LVR} (Pa)	4722 ± 982 ^b	2869 ± 85 ^b	24300 ± 7071 ^a
	σ _{LVR} (Pa)	17,7 ± 3,2 ^b	15,5 ± 0,0 ^b	47,1 ± 0,0 ^a
	Punto de flujo (Pa)	59,1 ± 10,9 ^b	46,3 ± 0,0 ^b	300,6 ± 76,0 ^a
SAOS	G* (Pa)	5159 ± 1086 ^b	3125 ± 90 ^b	25975 ± 7573 ^a
	G' (Pa)	5090 ± 1078 ^b	3073 ± 86 ^b	25750 ± 7594 ^a
	G'' (Pa)	839 ± 136 ^b	569 ± 26 ^b	3350 ± 316 ^a
	η* (Pa·s)	821 ± 173 ^b	497 ± 14 ^b	4134 ± 1205 ^a
	δ (°)	9,41 ± 0,46 ^a	10,48 ± 0,19 ^a	7,63 ± 1,54 ^a
	Tan δ	0,166 ± 0,008 ^a	0,185 ± 0,003 ^a	0,134 ± 0,027 ^a
Parámetro		Guisante		
		Cocción convencional	Cocción a presión	Cocción en microondas
Extrusión inversa	Fuerza máx. (N)	61 ± 2 ^a	43 ± 5 ^b	67 ± 7 ^a
	AUC (N·mm)	1696 ± 77 ^a	1119 ± 98 ^b	1827 ± 179 ^a
LAOS	G' _{LVR} (Pa)	115464 ± 14617 ^{ab}	84243 ± 14930 ^b	132086 ± 1720 ^a
	σ _{LVR} (Pa)	251,2 ± 0,0 ^a	158,5 ± 0,0 ^b	158,5 ± 0,0 ^b
	Punto de flujo (Pa)	1645 ± 85 ^a	1485 ± 141 ^a	1735 ± 212 ^a
SAOS	G* (Pa)	124400 ± 15698 ^{ab}	87735 ± 14927 ^b	137082 ± 1671 ^a
	G' (Pa)	122850 ± 15910 ^{ab}	86580 ± 15344 ^b	135750 ± 1768 ^a
	G'' (Pa)	19320 ± 523 ^a	13905 ± 1393 ^b	18628 ± 441 ^a
	η* (Pa·s)	19795 ± 2496 ^{ab}	13960 ± 2376 ^b	21815 ± 275 ^a
	δ (°)	9,03 ± 1,40 ^a	9,34 ± 2,53 ^a	7,8 ± 0,3 ^a
	Tan δ	0,159 ± 0,025 ^a	0,165 ± 0,045 ^a	0,137 ± 0,005 ^a

Los parámetros de textura representan: fuerza máxima y área bajo la curva (AUC).

Los parámetros viscoelásticos de los ensayos oscilatorios de gran amplitud (LAOS) representan: valor del módulo elástico en LVR (G'_{LVR}), valor de esfuerzo en LVR (σ_{LVR}) y punto de flujo.

Los parámetros viscoelásticos de los ensayos oscilatorios de pequeña amplitud (SAOS) representan: módulo complejo (G*), módulo elástico (G'), módulo viscoso (G''), viscosidad compleja (η*), ángulo de fase (δ) y tangente del ángulo de fase (Tan δ).

Diferentes letras indican diferencias significativas entre los métodos de cocción dentro de la misma legumbre ($p < 0,05$).

El comportamiento viscoelástico de las pastas de legumbres también fue evaluado, y los resultados de las pruebas LAOS y SAOS, para caracterizar las propiedades viscoelásticas no lineales y lineales, respectivamente, se presentan en la Tabla 3. Se realizó la prueba LAOS para comparar el comportamiento viscoelástico de las pastas y establecer los límites de la LVR, región en la que los módulos viscoelásticos son constantes e independientes del esfuerzo aplicado. Los cambios en el módulo elástico (G') y el módulo viscoso (G'') a medida que aumenta el esfuerzo se muestran en la Figura 4, observándose valores más altos de G' que de G'' durante la LVR en las tres pastas de legumbres. Esto demuestra una gran contribución del componente elástico a las propiedades viscoelásticas de las muestras, y por tanto un comportamiento tipo gel (Campo-Deaño *et al.*, 2010). En un estudio realizado por Alvarez *et al.* (2017) en hummus de garbanzo, el comportamiento elástico de la muestra fue atribuido a los cambios conformacionales que se producen durante la cocción, tales como la gelatinización del almidón y la coagulación o agregación de proteínas, aunque además se debe tener en cuenta la influencia de los diferentes compuestos de la formulación como la fibra. Respecto a los valores de G'_{LVR} y σ_{LVR} , estos indican rigidez y elasticidad, respectivamente. En las pastas de soja, los diferentes métodos de cocción no implicaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en la rigidez, en cambio la cocción a presión supuso una disminución en la elasticidad con respecto a SOC y SOM. Para la lenteja LEM fue el que presentó mayor rigidez y elasticidad, mientras que en las pastas de guisante GUP presentó la estructura menos rígida y GUC la más elástica. El punto de flujo indica la ruptura de la estructura interna y el momento en que la pasta empieza a fluir ($G' = G''$). Para las pastas de soja y guisante, los diferentes métodos de cocción no implicaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en el punto de flujo. En cambio, en la lenteja, el mayor valor se presentó en LEM, siendo la única pasta que presentó diferencias significativas entre los métodos de cocción ($p < 0,05$).

Los resultados obtenidos de la prueba SAOS también se muestran en la Tabla 3. La soja no presentó diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los diferentes métodos de cocción en las propiedades viscoelásticas lineales, mientras que LEM, GUC y GUM presentaron los valores más altos en G^* , G' y η^* , respecto a la misma pasta pero diferente cocción, lo que indicaría una estructura más rígida. Estos resultados coinciden con los obtenidos en el ensayo de extrusión inversa. La tangente del ángulo de fase es un parámetro que ayuda a definir el comportamiento físico de las muestras. Todas las pastas de legumbres presentaron valores comprendidos entre 0,1 y 1, lo que indica un comportamiento de gel débil. Cabe destacar que una mayor contribución de las propiedades elásticas es importante en la palatabilidad y obtención de una textura suave, lo que puede estar asociado con propiedades más prometedoras para una deglución agradable (Cho y Yoo, 2015).

Las características reológicas del producto dependen de la composición y de las posibles interacciones entre los componentes de la matriz alimentaria (Alvarez *et al.*, 2017). También el procesamiento del producto tiene gran influencia, de modo que las modificaciones microestructurales de las legumbres durante el remojo, la cocción y la trituración van a determinar el comportamiento reológico de las pastas. Este comportamiento tiene un impacto directo durante el procesamiento oral y la digestión gastrointestinal, ya que está relacionado con la percepción oral, la rotura de la estructura del alimento durante la masticación, el sabor y aroma, o la liberación de nutrientes (Fischer y Windhab, 2011). Así, el interés por comprender la relación entre la microestructura y los atributos reológicos de los alimentos puede ayudar a minimizar los defectos en la textura y a la optimización de procesos para el desarrollo de productos (Ahmed *et al.*, 2017).

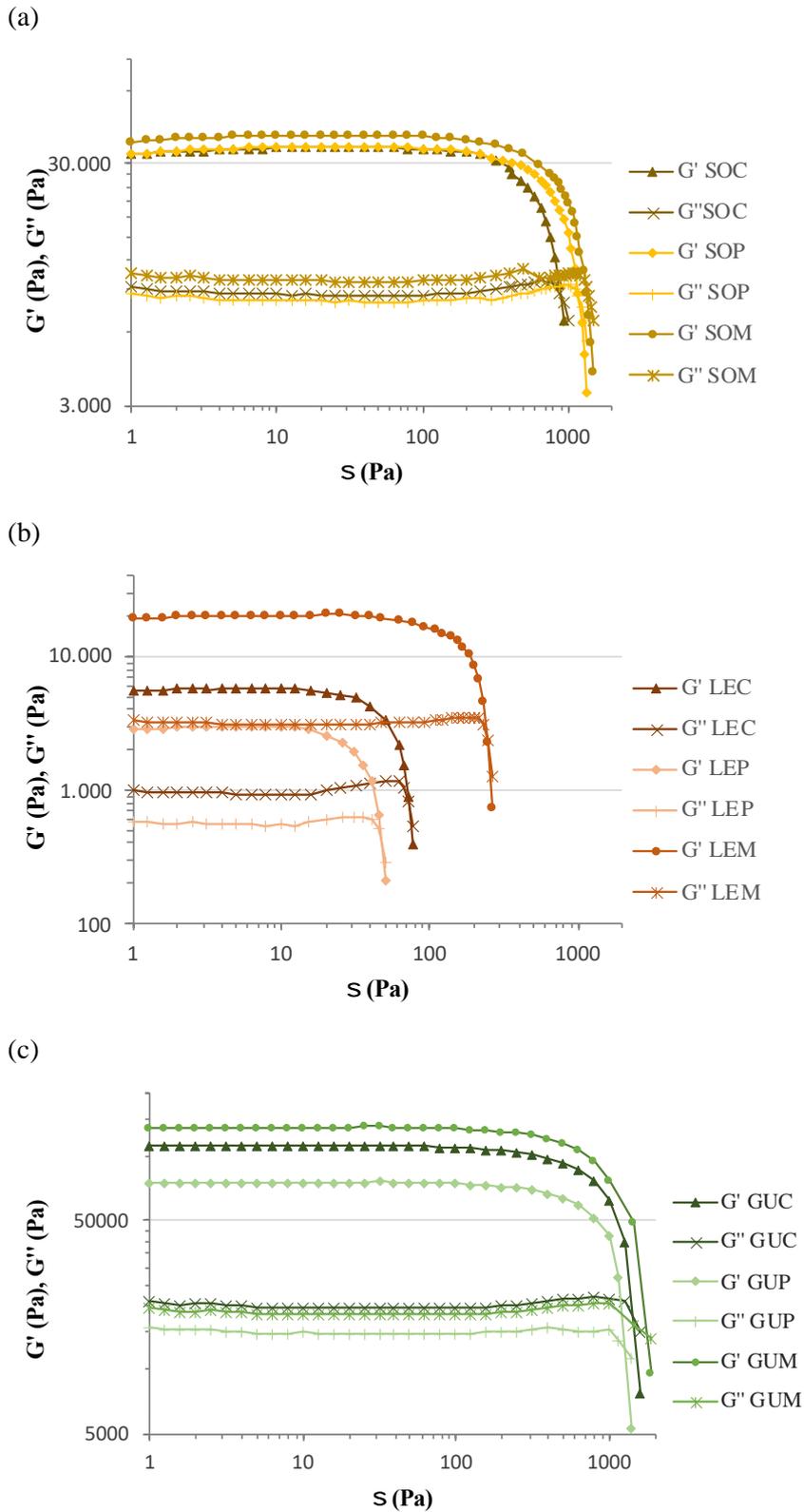


Figura 4. Cambios en el módulo elástico (G') y módulo viscoso (G'') según el esfuerzo aplicado para las pastas de (a) soja, (b) lenteja y (c) guisante obtenidas tras los diferentes métodos de cocción.

4.2 Digestibilidad proteica de las pastas de legumbres

Los diferentes tipos de procesado como pueden ser el remojo, distintos métodos de cocción, o trituración de las legumbres afectan tanto a la estructura como a la funcionalidad y digestibilidad de las proteínas y por tanto a la disponibilidad y la utilización de las proteínas en la dieta (Drulyte y Orlien, 2019). Los procesos de remojo y cocción pueden reducir o incluso inactivar los FAN, pero además afectarán a la matriz alimentaria y estructura de las proteínas, haciéndolas más susceptibles al ataque de las enzimas digestivas (Akande y Fabiyi, 2010; Torres *et al.*, 2016). Por su parte, durante la trituración se rompen las barreras físicas constituidas por las paredes celulares, lo que provoca la liberación de los compuestos celulares y ofrece una mayor superficie de contacto entre los nutrientes y las enzimas digestivas.

El efecto de los distintos métodos de cocción y la digestión gastrointestinal de las pastas de legumbres sobre la digestibilidad de las proteínas se evaluó mediante la determinación del contenido total de proteínas solubles, los péptidos solubles en TCA y los grupos amino libres. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4. El contenido de proteínas solubles en las muestras antes de la digestión (tras remojar, cocinar y triturar las legumbres) tomó valores entre 3,15 y 15,04 mg/g, con diferencias significativas entre los métodos de cocción ($p < 0,05$). Estos valores sugieren una baja biodisponibilidad de proteínas principalmente en SOM, LEM y GUP, dentro de su respectiva legumbre, lo que puede explicarse por la lixiviación de proteínas solubles al agua de remojo y de cocción. Además, la cocción provoca la desnaturalización de las proteínas, implicando una reagrupación de las moléculas ya desplegadas y la formación de nuevos complejos, lo que conlleva una disminución de su solubilidad (Jamdar *et al.*, 2017; Le Gall *et al.*, 2005).

La digestión de las proteínas comienza en el estómago, donde las proteínas se desnaturalizan por el pH ácido, y son hidrolizadas por la acción de la enzima pepsina dando lugar a péptidos relativamente grandes y algunos aminoácidos. En el intestino delgado, son principalmente las enzimas tripsina y quimotripsina las que continúan la digestión de proteínas, generando péptidos de menor tamaño y aminoácidos libres (Joye, 2019). En general, los resultados obtenidos indicaron que el contenido de proteínas solubles descendió significativamente ($p < 0,05$) después de la fase oral y gástrica, en comparación con las muestras antes de la digestión, y esta disminución coincidió con un aumento de péptidos solubles en TCA y de grupos amino libres (Tabla 4). La disminución del contenido de proteínas en la fase oral, donde la enzima α -amilasa inicia la hidrólisis del almidón, pero no tiene lugar degradación proteica, puede atribuirse a interacciones de las proteínas con la enzima formando complejos o agregados que disminuirían la solubilidad de las proteínas (Crosara *et al.*, 2018). Además, cabe destacar que la fracción soluble en TCA al 5 % solamente contendría péptidos de menos de 10 residuos y aminoácidos libres (Chen *et al.*, 2010), por lo que los resultados de este ensayo no reflejan la presencia de péptidos más grandes liberados en la fase gástrica. En la fase intestinal, en todas las muestras se observó un aumento significativo ($p < 0,05$) del contenido de proteínas solubles en comparación con las fases previas, así como un aumento en el contenido de péptidos solubles en TCA y grupos amino libres. Los valores de péptidos solubles oscilaron entre 33,75 y 81,56 mg/g, mientras que el contenido de grupos amino libres estuvo entre 40,14 y 165,28 mg/g, dependiendo del tipo de pasta y método de cocción. Estos resultados evidencian una mejora en la digestibilidad proteica de las pastas de legumbres durante la digestión gastrointestinal. Jamdar *et al.* (2017) obtuvieron resultados similares para siete legumbres entre las que se encontraban la lenteja y el guisante, evidenciando una disminución del contenido de proteínas solubles tras el remojo y la cocción, pero un aumento tras la digestión gastrointestinal simulada.

Tabla 4. Contenidos de proteínas solubles, péptidos, grupos amino libres y fenoles totales en las pastas de soja, lenteja y guisante tras los diferentes métodos de cocción obtenidos antes y durante la digestión gastrointestinal simulada.

		Soja		
	Fase de digestión	Cocción convencional	Cocción a presión	Cocción en microondas
Proteínas solubles (mg/g)	Antes	15,04 ± 0,62 ^{Aa}	12,71 ± 1,48 ^{Ab}	9,62 ± 0,55 ^{Bc}
	Oral	1,03 ± 0,46 ^{Cb}	1,46 ± 0,66 ^{Cb}	3,39 ± 0,33 ^{Da}
	Gástrica	1,48 ± 0,23 ^{Cb}	2,75 ± 1,17 ^{Cb}	5,88 ± 0,40 ^{Ca}
	Intestinal	9,23 ± 1,04 ^{Bb}	7,67 ± 0,46 ^{Bb}	23,05 ± 2,42 ^{Aa}
Péptidos solubles en TCA (mg/g)	Antes	8,31 ± 0,25 ^{Ca}	8,19 ± 0,16 ^{Ca}	7,83 ± 0,00 ^{Ca}
	Oral	5,92 ± 0,02 ^{Db}	7,87 ± 0,53 ^{Ca}	7,94 ± 0,00 ^{Ca}
	Gástrica	24,36 ± 0,69 ^{Bc}	33,45 ± 0,39 ^{Bb}	39,63 ± 0,98 ^{Ba}
	Intestinal	73,13 ± 0,46 ^{Aa}	80,08 ± 3,17 ^{Aa}	81,56 ± 5,04 ^{Aa}
Grupos amino libres (mg/g)	Antes	2,50 ± 0,02 ^{Cb}	2,52 ± 0,03 ^{Cb}	3,38 ± 0,09 ^{Ca}
	Oral	6,00 ± 0,09 ^{Ca}	3,82 ± 0,02 ^{Cb}	6,00 ± 0,11 ^{Ca}
	Gástrica	40,41 ± 1,24 ^{Bb}	41,78 ± 0,34 ^{Bab}	44,02 ± 0,05 ^{Ba}
	Intestinal	128,76 ± 5,48 ^{Ab}	148,96 ± 13,59 ^{Aab}	165,28 ± 10,59 ^{Aa}
Fenoles totales (mg/g)	Antes	1,16 ± 0,02 ^{Ba}	1,09 ± 0,02 ^{Bb}	1,07 ± 0,01 ^{Cb}
	Oral	0,84 ± 0,07 ^{Ba}	0,61 ± 0,00 ^{Cb}	0,94 ± 0,06 ^{Ca}
	Gástrica	3,87 ± 0,35 ^{Aa}	3,81 ± 0,17 ^{Aa}	4,16 ± 0,12 ^{Aa}
	Intestinal	-	0,23 ± 0,19 ^{Db}	1,63 ± 0,27 ^{Ba}

		Lenteja		
	Fase de digestión	Cocción convencional	Cocción a presión	Cocción en microondas
Proteínas solubles (mg/g)	Antes	9,09 ± 0,77 ^{Aa}	8,71 ± 0,60 ^{Aa}	7,17 ± 0,64 ^{Ab}
	Oral	1,13 ± 0,10 ^{Ba}	1,31 ± 0,15 ^{Ca}	1,23 ± 0,09 ^{Ca}
	Gástrica	0,26 ± 0,14 ^{Ba}	0,38 ± 0,13 ^{Ca}	0,33 ± 0,19 ^{Ca}
	Intestinal	8,87 ± 0,79 ^{Aa}	7,33 ± 1,36 ^{Ba}	2,83 ± 0,71 ^{Bb}
Péptidos solubles en TCA (mg/g)	Antes	2,76 ± 0,20 ^{Cb}	3,20 ± 0,05 ^{Ba}	3,21 ± 0,02 ^{Ca}
	Oral	1,35 ± 0,08 ^{Db}	1,02 ± 0,04 ^{Bc}	1,88 ± 0,04 ^{Da}
	Gástrica	11,53 ± 0,12 ^{Bb}	14,05 ± 0,00 ^{Bb}	13,78 ± 0,11 ^{Ba}
	Intestinal	77,93 ± 0,28 ^{Aa}	52,55 ± 11,22 ^{Ab}	41,64 ± 0,25 ^{Ab}
Grupos amino libres (mg/g)	Antes	2,86 ± 0,05 ^{Cb}	3,03 ± 0,01 ^{Cb}	3,73 ± 0,08 ^{Ca}
	Oral	6,20 ± 0,08 ^{Ca}	6,63 ± 0,21 ^{Ca}	6,43 ± 0,24 ^{Ca}
	Gástrica	30,97 ± 0,55 ^{Ba}	25,08 ± 0,97 ^{Bb}	29,71 ± 0,33 ^{Ba}
	Intestinal	74,90 ± 4,55 ^{Aa}	40,13 ± 7,00 ^{Ab}	73,95 ± 11,56 ^{Aa}
Fenoles totales (mg/g)	Antes	0,56 ± 0,00 ^{Cb}	0,64 ± 0,02 ^{Ba}	0,63 ± 0,01 ^{Ba}
	Oral	0,59 ± 0,05 ^{Cb}	0,77 ± 0,01 ^{Ba}	0,54 ± 0,04 ^{Bb}
	Gástrica	3,16 ± 0,01 ^{Aa}	3,00 ± 0,22 ^{Aa}	2,95 ± 0,21 ^{Aa}
	Intestinal	2,21 ± 0,60 ^{Ba}	-	-

Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre fases (antes de la digestión, oral, gástrica e intestinal) dentro de una misma legumbre y método de cocción ($p < 0,05$).

Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre métodos de cocción (convencional, a presión, en microondas) dentro de la misma legumbre y fase ($p < 0,05$).

Tabla 4 continuación.

	Fase de digestión	Guisante		
		Cocción convencional	Cocción a presión	Cocción en microondas
Proteínas solubles (mg/g)	Antes	6,28 ± 0,41 ^{Ba}	3,15 ± 0,25 ^{Bb}	5,82 ± 0,19 ^{Ba}
	Oral	3,76 ± 0,31 ^{Ca}	1,18 ± 0,17 ^{Cc}	2,23 ± 0,17 ^{Cb}
	Gástrica	0,79 ± 0,10 ^{Da}	0,67 ± 0,00 ^{Ca}	0,88 ± 0,24 ^{Da}
	Intestinal	8,16 ± 1,04 ^{Aa}	9,05 ± 1,31 ^{Aa}	9,07 ± 0,79 ^{Aa}
Péptidos solubles en TCA (mg/g)	Antes	2,58 ± 0,03 ^{Cb}	2,27 ± 0,13 ^{Cc}	3,79 ± 0,09 ^{Ca}
	Oral	1,26 ± 0,05 ^{Cb}	2,64 ± 0,11 ^{Ca}	2,49 ± 0,14 ^{Ca}
	Gástrica	5,02 ± 0,42 ^{Bc}	11,02 ± 0,72 ^{Ba}	7,86 ± 0,41 ^{Bb}
	Intestinal	33,75 ± 0,79 ^{Ac}	59,76 ± 4,21 ^{Aa}	45,05 ± 2,29 ^{Ab}
Grupos amino libres (mg/g)	Antes	2,06 ± 0,06 ^{Dc}	3,61 ± 0,02 ^{Ca}	3,26 ± 0,04 ^{Db}
	Oral	4,62 ± 0,25 ^{Cb}	5,89 ± 0,08 ^{Ca}	6,17 ± 0,02 ^{Ca}
	Gástrica	17,18 ± 0,72 ^{Ba}	19,84 ± 2,86 ^{Ba}	17,31 ± 0,10 ^{Ba}
	Intestinal	61,11 ± 1,19 ^{Ab}	74,00 ± 5,47 ^{Aa}	51,77 ± 0,76 ^{Ab}
Fenoles totales (mg/g)	Antes	0,59 ± 0,02 ^{Bb}	0,71 ± 0,01 ^{Ca}	0,71 ± 0,01 ^{Ba}
	Oral	0,59 ± 0,04 ^{Ba}	0,68 ± 0,00 ^{Ca}	0,65 ± 0,05 ^{Ba}
	Gástrica	1,87 ± 0,09 ^{Ab}	2,30 ± 0,08 ^{Aa}	1,84 ± 0,05 ^{Ab}
	Intestinal	0,31 ± 0,04 ^{Cb}	1,15 ± 0,22 ^{Ba}	-

Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre fases (antes de la digestión, oral, gástrica e intestinal) dentro de una misma legumbre y método de cocción ($p < 0,05$).

Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre métodos de cocción (convencional, a presión, en microondas) dentro de la misma legumbre y fase ($p < 0,05$).

El método de cocción influyó en la digestión de las proteínas, así como en la generación de péptidos y aminoácidos, de forma diferente en cada pasta de legumbre y en cada etapa de la digestión. Al final de la digestión el contenido de proteínas fue de 2,5 a 3 veces mayor en SOM que en SOC y SOP, mientras que no se presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los métodos de cocción en cuanto a los péptidos solubles en TCA. El contenido de grupos amino libres sí presentó diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los distintos métodos, siendo SOP y SOM los que presentaron valores más altos. En la pasta de lenteja, tanto el contenido de proteínas solubles como el de péptidos solubles en TCA tras la fase intestinal presentó una tendencia similar entre las muestras cocinadas ($LEC \geq LEP \geq LEM$), en cambio, el contenido de grupos amino libres fue menor en LEP que en LEC y LEM. Por último, la pasta de guisante no presentó diferencias significativas ($p > 0,05$) en el contenido de proteínas según el método de cocción, pero en cambio, tanto para los péptidos solubles como para los grupos amino libres la cocción a presión supuso un aumento significativo en sus contenidos con respecto a los otros tipos de cocción. Estos resultados indican que los diferentes métodos de cocción modifican la estructura de las proteínas y la matriz de las legumbres de manera diferente en cada una de ellas, influyendo por tanto en la cinética de la hidrólisis de las proteínas durante la digestión gastrointestinal. La estructura de la matriz de los alimentos tiene un gran impacto en la digestión de las proteínas, así como en la naturaleza de los péptidos liberados. Cabe destacar que la relación entre el tipo de procesado y la digestibilidad de las legumbres puede variar no solo entre especies de legumbres, sino también dentro de una misma especie, además de que existen una amplia variedad de parámetros como la temperatura, el tiempo, el tamaño de partícula o el contenido en humedad que pueden modificar el efecto del procesado sobre la digestibilidad (Torres *et al.*, 2016).

Las legumbres son una buena fuente de compuestos fenólicos, los cuales son determinantes para el color, gusto y sabor de los alimentos. Además, desempeñan un papel importante en muchos procesos fisiológicos y metabólicos por su capacidad de captación de radicales libres, pero pueden interactuar con proteínas modificando su biodisponibilidad (Giusti *et al.*, 2019). En el presente estudio se evaluó la cantidad de fenoles totales de las pastas de legumbres antes y durante la digestión gastrointestinal, y los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4. Se obtuvieron valores bajos, comprendidos entre 0,54 y 1,16 mg/g en la cantidad de fenoles totales para todas las muestras antes de la digestión y después de la fase oral, mientras que se observó un incremento de entre 2,5 y 6,25 veces, dependiendo del tipo de pasta y método de cocción empleado, tras la fase gástrica. Los bajos valores obtenidos en las muestras remojadas, cocidas y trituradas antes de la digestión se pueden atribuir a la pérdida de compuestos fenólicos solubles en agua durante el remojo y la cocción. Además, los compuestos fenólicos se ven afectados durante la cocción por fenómenos como la degradación térmica, la ruptura de enlaces covalentes, la liberación parcial de fenoles libres y la interacción de ácidos fenólicos con macromoléculas en la matriz alimentaria (Nicolás-García *et al.*, 2021). Como se puede observar en la Tabla 4, todas las muestras a excepción de SOP presentaron diferencias no significativas ($p > 0,05$) entre los valores obtenidos antes del comienzo de la digestión y los obtenidos tras la fase oral. Esto se debe a que la corta duración de la fase oral impide la interacción entre los compuestos fenólicos y los componentes de la saliva artificial. Por lo tanto, el impacto de la fase oral sobre la liberación de compuestos fenólicos se podría considerar insignificante. El aumento significativo que se produjo después de la fase gástrica podría deberse a que el pH ácido potenciaría la abundancia de las formas no disociadas de los compuestos fenólicos, cambio que promueve la difusión desde la matriz a la fase acuosa como consecuencia de la reducción de las interacciones iónicas, así como a la exposición de los polifenoles hidrosolubles de la estructura de la legumbre debido a la acción de la pepsina sobre las proteínas (Cárdenas-Castro *et al.*, 2020; Bohn, 2014). Tras la fase intestinal se produjo un descenso significativo del contenido de fenoles totales respecto a la fase gástrica, lo que podría ser consecuencia de la inestabilidad de los compuestos fenólicos cuando se exponen a pH alcalinos del medio intestinal o a la formación de micelas mixtas solubles en agua, proceso que se da principalmente en polifenoles apolares y que tiene como resultado una baja bioaccesibilidad (Soriano Sancho *et al.*, 2015; Bohn, 2014).

Los compuestos fenólicos pueden interactuar con las proteínas de forma reversible a través de enlaces no covalentes (puentes de hidrógeno, enlaces hidrofóbicos y fuerzas de Van der Waals) y de forma no reversible mediante enlaces covalentes, dependiendo del tamaño y estructura de los compuestos fenólicos y de la secuencia de aminoácidos de las proteínas. Estas interacciones pueden provocar cambios en la estructura de las proteínas (formación de complejos, despliegue y precipitación), así como cambios en las propiedades fisicoquímicas, reduciendo su valor nutricional y funcional. Además, pueden modificar la solubilidad, estabilidad térmica y digestibilidad de las proteínas, así como reducir la bioactividad de los compuestos fenólicos (Ozidal *et al.*, 2013; Czubinski y Dwiecki, 2016). Los compuestos fenólicos también pueden interactuar con enzimas digestivas como la pepsina y la tripsina a través de interacciones no covalentes, influyendo en su actividad enzimática y por tanto en la digestibilidad proteica. La composición de aminoácidos, tamaño molecular y estructura de las enzimas, el número y posición de grupos hidroxilos y presencia de glicosilación en los compuestos fenólicos, así como el pH, la temperatura y tiempo de incubación son factores que influyen en estas interacciones (Cirkovic Velickovic y Stanic-Vucinic, 2017; Martinez-Gonzalez *et al.*, 2017). Finalmente, cabe decir que el reactivo de Folin-Ciocalteu puede reaccionar con proteínas, carbohidratos, aminoácidos, vitaminas y otros compuestos no fenólicos, lo que puede provocar que la medición de compuestos

fenólicos por dicho ensayo de como resultado una sobreestimación alta del contenido en fenoles (Everette *et al.*, 2010). En vista de los resultados de proteólisis y de los compuestos fenólicos obtenidos, es probable que los compuestos fenólicos interactuaran con las proteínas en las primeras fases de la digestión gastrointestinal, pero se necesitarían más estudios para evaluar estas posibles interacciones y sus cambios durante el proceso.

4.3 Actividad antioxidante de las pastas de legumbres

La capacidad antioxidante de las pastas de legumbres se determinó antes de la digestión y durante la digestión gastrointestinal *in vitro* (tras las fases oral, gástrica e intestinal) mediante los métodos DPPH, RP y ABTS, ya que no existe un ensayo estandarizado para determinar la capacidad antioxidante total de una muestra. Las diferentes metodologías para evaluar la actividad antioxidante se clasifican en dos grupos en función de las reacciones químicas implicadas: los métodos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) que miden la capacidad de un antioxidante para estabilizar el radical libre mediante la donación de un hidrógeno, son reacciones independientes del pH y del disolvente; y los métodos basados en la transferencia de electrones (SET) que miden la capacidad de un antioxidante para reducir el radical libre mediante la transferencia de un electrón, se trata de reacciones dependientes del pH. El método del poder reductor del hierro se basa en el mecanismo SET, mientras que los métodos de DPPH y ABTS son metodologías que pueden actuar con ambos mecanismos, HAT y SET (Prior *et al.*, 2005). Estudiar la evolución de la actividad antioxidante durante la digestión gastrointestinal *in vitro* permite ver cómo influyen las enzimas digestivas en la liberación de compuestos antioxidantes, tanto péptidos bioactivos como compuestos fenólicos unidos a proteínas, aumentando su biodisponibilidad para que interactúen con especies reactivas de oxígeno.

En la Figura 5 se muestra los resultados obtenidos para el ensayo DPPH. En las pastas de SO y LE se produjo un aumento significativo ($p < 0,05$) de la actividad antioxidante después de la digestión en comparación con las pastas sin digerir. En ambas pastas, los valores más altos de actividad antioxidante fueron los correspondientes a la cocción convencional y a presión, llegando a valores de 17 mmol TE/g en LEP y LEC. Sin embargo, en la pasta de guisante digerida se produjo un descenso significativo ($p < 0,05$) en comparación con las pastas sin digerir, con una reducción de 4 veces para GUP. Cabe mencionar que la pasta de LE fue la única que mostró un incremento de actividad antioxidante conforme avanzaba la digestión, mientras que las pastas de SO y GU no mostraron actividad tras la fase oral y gástrica. Dawidowicz *et al.* (2012) indicaron que la matriz alimentaria, así como el tipo y la cantidad de solvente utilizado en la reacción, el contenido de agua y concentración de hidrógeno podría influenciar en la cantidad de DPPH sin reaccionar, lo que provocaría diferencias en la estimación de la actividad antioxidante. Además, muchos antioxidantes pueden reaccionar lentamente con los radicales DPPH o incluso no interactuar debido a la inaccesibilidad estérica, lo que es un factor determinante en la reacción (Prior *et al.*, 2005). La acción de las enzimas intestinales probablemente mejoró la accesibilidad de los compuestos a los radicales del DPPH más que la acción de la pepsina gástrica, lo que podría deberse a la disminución del tamaño de las moléculas (debido a la acción enzimática o las condiciones del pH) (Mtolo *et al.*, 2017). Esto explicaría el aumento de la actividad antioxidante después de la digestión gastrointestinal (Figura 5).

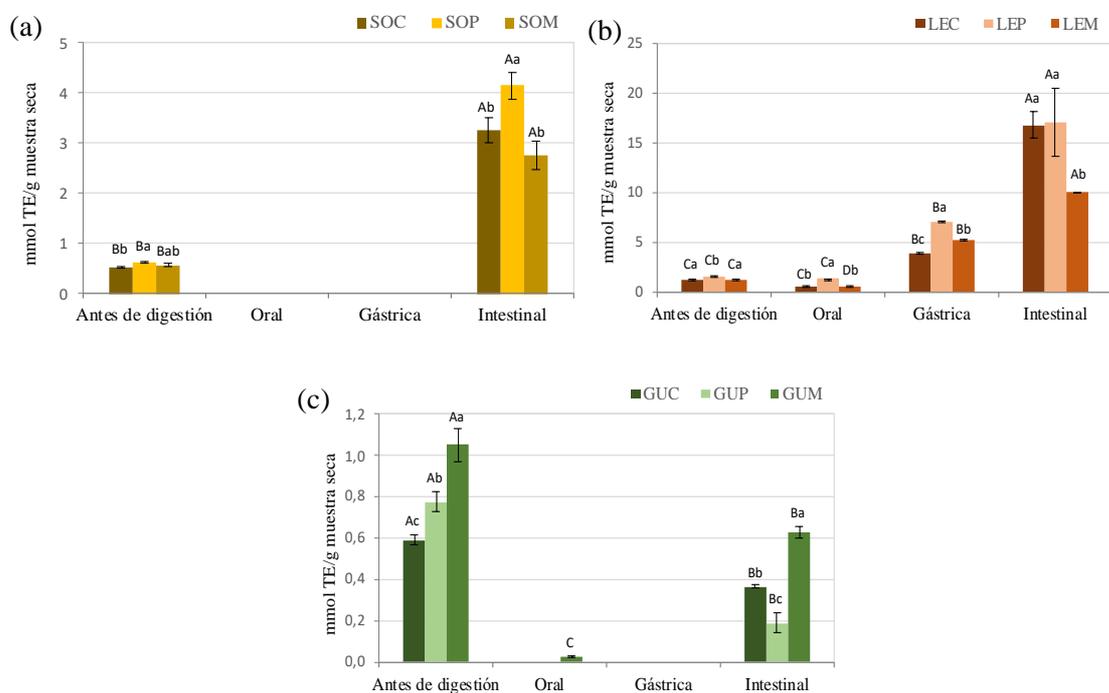


Figura 5. Actividad antioxidante medida por el método de captación del radical DPPH de las pastas de (a) soja, (b) lenteja y (c) guisante tras los diferentes métodos de cocción obtenida antes y durante la digestión gastrointestinal simulada.

Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre fases (antes de la digestión, oral, gástrica e intestinal) dentro de una misma legumbre y método de cocción ($p < 0,05$), mientras que las letras minúsculas indican diferencias significativas entre métodos de cocción (convencional, a presión, en microondas) dentro de la misma legumbre y fase ($p < 0,05$).

Los resultados obtenidos por el método RP se muestran en la Figura 6. Se observó que en las tres pastas de legumbres se produjo un aumento significativo ($p < 0,05$) de la actividad antioxidante al final de la digestión, con valores comprendidos entre 1,5 y 17 $\mu\text{mol TE/g}$. Esto sugiere que los péptidos y los aminoácidos libres generados durante la digestión podrían ser buenos donantes de electrones. El mayor incremento en la actividad antioxidante entre muestras digeridas y las no digeridas se produjo en la pasta de LE, con un aumento de entre 5,5 y 11 veces, dependiendo del método de cocción. Este incremento fue especialmente mayor que el obtenido por Jamdar *et al.* (2017), en cuyo estudio los valores se duplicaron y se atribuyó la actividad antioxidante principalmente a los compuestos fenólicos en lugar de a los péptidos generados durante la digestión. Los diferentes métodos de cocción a los que se sometieron las legumbres también dan lugar a diferencias en los compuestos liberados durante la digestión y en los resultados de la actividad antioxidante. En el método RP, las muestras SOP, LEC, GUC y GUP mostraron los valores más altos después de la fase intestinal (Figura 6), lo que indica una tendencia similar en SO y LE a los resultados obtenidos por el método DPPH (Figura 5). Esto se debe a que ambos ensayos, DPPH y RP, se correlacionan bien con la hidrofobicidad de los péptidos, aunque el ensayo RP está libre de las influencias del disolvente y las propiedades estéricas de los péptidos (Liao *et al.*, 2016).

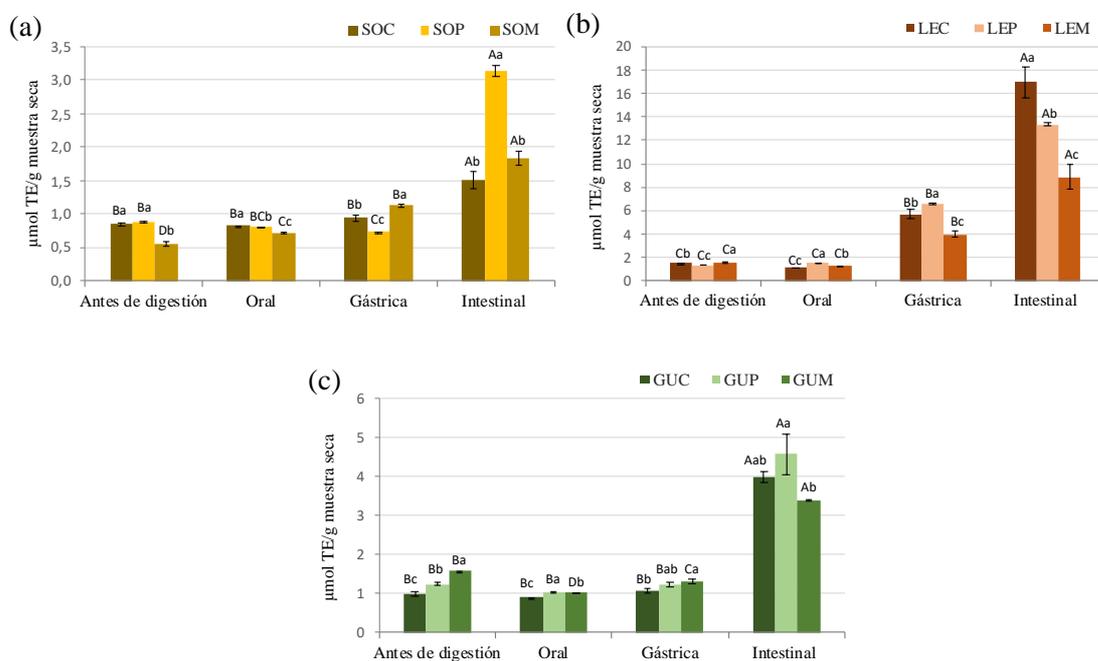


Figura 6. Actividad antioxidante medida por el método del poder reductor del hierro de las pastas de (a) soja, (b) lenteja y (c) guisante tras los diferentes métodos de cocción obtenida antes y durante la digestión gastrointestinal simulada.

Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre fases (antes de la digestión, oral, gástrica e intestinal) dentro de una misma legumbre y método de cocción ($p < 0,05$), mientras que las letras minúsculas indican diferencias significativas entre métodos de cocción (convencional, a presión, en microondas) dentro de la misma legumbre y fase ($p < 0,05$).

El método ABTS se usa para determinar la actividad antioxidante tanto de compuestos lipofílicos como hidrófilos (Jamdar *et al.*, 2017). Los resultados obtenidos del ensayo ABTS para las pastas de legumbres se muestran en la Figura 7. En las tres pastas se observó un aumento significativo ($p < 0,05$) de la actividad antioxidante después de la fase gástrica, más de 10 veces superior para el caso de LE. Esto concuerda con el notable aumento en la cantidad de compuestos fenólicos observado (Tabla 4), por lo que la actividad antioxidante de la fase gástrica podría atribuirse principalmente a los compuestos fenólicos. En el estudio de Ketnawa y Ogawa (2019) se atribuyó la actividad antioxidante de la soja tanto a los compuestos fenólicos como a los péptidos bioactivos, sugiriendo además que los cambios estructurales que se producen durante la digestión por la acción de la pepsina podrían favorecer la captura de los radicales libres ABTS. Al final de la digestión, se mantuvo la actividad antioxidante para todas las muestras excepto para SO y LEP, en las cuales se produjo un descenso significativo ($p < 0,05$). Esto podría deberse a una degradación de los compuestos fenólicos tras la fase intestinal, por lo que en estos casos los péptidos y los aminoácidos libres podrían ser los responsables de la actividad antioxidante. La acción de la pepsina en la fase gástrica y posteriormente de la tripsina y quimotripsina en la fase intestinal aumentaría el número de escisiones sobre el enlace peptídico conduciendo a la acumulación de péptidos más cortos (tripéptidos y dipéptidos) y aminoácidos libres. Estos compuestos son más hidrofílicos que los péptidos de mayor tamaño lo que provoca que sean capaces de reaccionar más fácilmente con el $ABTS^{+}$ soluble (Zhu *et al.*, 2008). En la pasta de LE, el aumento en la actividad captadora de radicales ABTS después de la digestión en comparación con las muestras no digeridas (Figura 7b) fue casi el doble que el descrito por Jamdar *et al.* (2017), quien también correlacionó la actividad antioxidante con el contenido de péptidos

generados después de la digestión. Si comparamos entre los métodos de cocción dentro de la misma fase y tipo de legumbre, en general SOP mostró los valores más bajos de actividad antioxidante, GUP presentó los valores más altos, mientras que en LE el método de cocción utilizado no influyó significativamente ($p > 0,05$) en la actividad antioxidante. También cabe señalar que muchos autores consideran el ensayo Folin-Ciocalteu como una medida de la capacidad antioxidante más que un ensayo para determinar el contenido fenólico total, ya que este ensayo se basa en la transferencia de electrones para medir la capacidad reductora de un antioxidante. De hecho, algunos estudios han demostrado una fuerte correlación entre los ensayos Folin-Ciocalteu y ABTS (Everette *et al.*, 2010; Prior *et al.*, 2005). En el presente estudio ambos ensayos mostraron una tendencia similar tras la fase gástrica pero no tras la última fase de la digestión gastrointestinal *in vitro*.

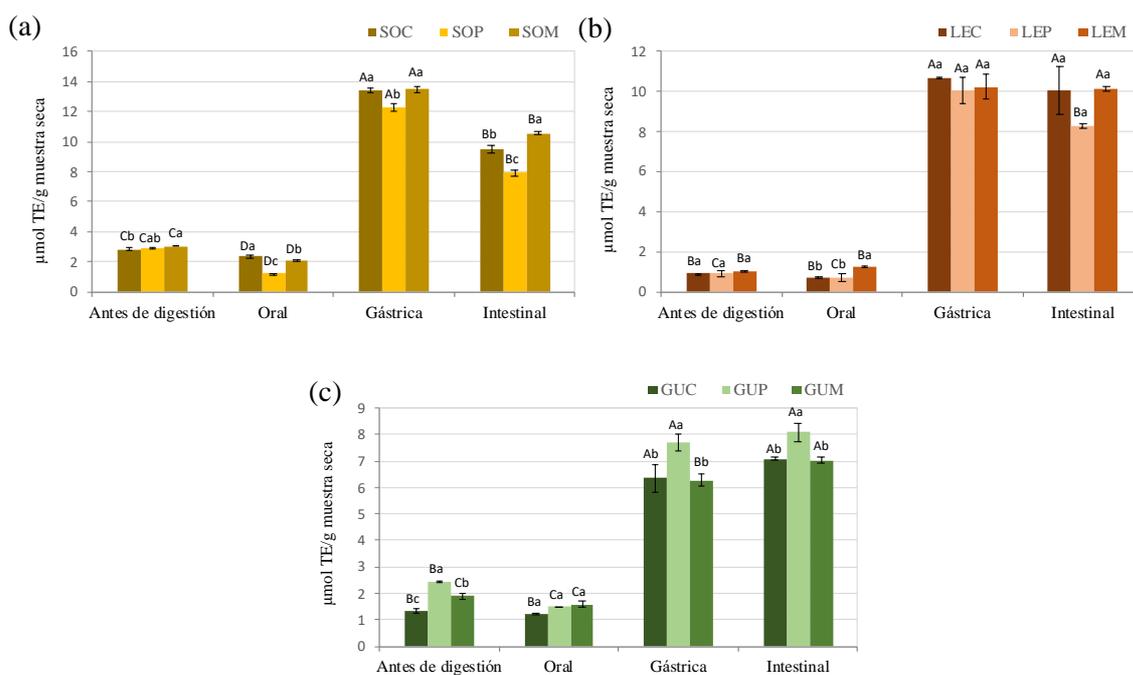


Figura 7. Actividad antioxidante medida por el método de captación del radical ABTS de las pastas de (a) soja, (b) lenteja y (c) guisante tras los diferentes métodos de cocción obtenida antes y durante la digestión gastrointestinal simulada.

Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre fases (antes de la digestión, oral, gástrica e intestinal) dentro de una misma legumbre y método de cocción ($p < 0,05$), mientras que las letras minúsculas indican diferencias significativas entre métodos de cocción (convencional, a presión, en microondas) dentro de la misma legumbre y fase ($p < 0,05$).

Es difícil comparar los resultados obtenidos por los diferentes ensayos de medida de actividad antioxidante, ya que son diferentes en términos de sustratos, condiciones de reacción, mecanismos, cinética y métodos de cuantificación (Huang *et al.*, 2005). Sin embargo, se requiere la utilización de varios métodos para caracterizar la actividad antioxidante total de una muestra, ya que las diferencias en la estructura y las propiedades del compuesto antioxidante, como la solubilidad, el potencial de ionización y la energía de disociación del enlace, son las responsables de determinar el mecanismo dominante (HAT y SET) en el sistema (Prior *et al.*, 2005).

Durante la digestión gastrointestinal, la acción de las enzimas digestivas y las condiciones de pH producen la hidrólisis de proteínas y péptidos, la liberación de aminoácidos y compuestos fenólicos, y la exposición de grupos internos de las moléculas. Esto puede afectar a la cantidad, tamaño y características fisicoquímicas de estos compuestos, repercutiendo en su capacidad antioxidante. El tamaño de los péptidos es un factor importante para determinar su actividad, ya que se ha descrito que predominantemente los péptidos antioxidantes tienen entre 2 y 6 aminoácidos (Sarmadi y Ismail, 2010), pero también influye en la capacidad para atravesar la barrera intestinal y ejercer su acción *in vivo*. La fracción de péptidos solubles en TCA al 5 % mide la fracción de péptidos de menos de 10 aminoácidos, por lo que incluiría los péptidos potencialmente antioxidantes. Además, la composición en aminoácidos, la estructura, la hidrofobicidad, y las propiedades estéricas y electrónicas de los péptidos tienen una gran influencia sobre su actividad antioxidante (Zou *et al.*, 2016). Por ello, se necesitan más estudios para caracterizar e identificar los péptidos responsables de la actividad antioxidante observada en las pastas de legumbres, así como para evaluar las interacciones entre los compuestos antioxidantes y la matriz, ya que pueden provocar cambios en la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de los compuestos bioactivos.

5. CONCLUSIONES

Las pastas de legumbres preparadas a partir de soja, lenteja y guisante mostraron diferencias significativas en sus propiedades fisicoquímicas según el método de cocción utilizado. En general, el contenido de humedad fue mayor en las muestras cocidas a presión, excepto en soja donde no se observaron diferencias significativas entre métodos. Los valores más altos en contenido de sólidos solubles, luminosidad y tonalidad se observaron en las muestras cocinadas en microondas, excepto para los atributos de color en el caso del guisante.

Los análisis de textura y comportamiento viscoelástico indicaron que las pastas de legumbres, a excepción de la soja, presentaron diferencias significativas según el método de cocción utilizado. Todas las muestras mostraron un predominio de las propiedades elásticas sobre las viscosas y un comportamiento de gel débil. Además, las muestras cocinadas con microondas presentaron una estructura más rígida.

La cocción seguida de la digestión gastrointestinal *in vitro* mejoró la digestibilidad de las proteínas y la actividad antioxidante de las legumbres, pero la magnitud fue diferente dependiendo de la fase de la digestión, el tipo de legumbre y el método de cocción. De forma general, los valores más altos en contenido de proteínas, péptidos y grupos amino libres al final de la digestión se observaron en el caso de la soja tras el cocinado en microondas, en la lenteja tras la cocción convencional y en el guisante tras la cocción a presión. Respecto a la actividad antioxidante, los mayores valores se obtuvieron en la soja tras la cocción a presión con los ensayos DPPH y RP, en la lenteja tras la cocción convencional con los tres ensayos, y en el guisante tras la cocción a presión con los ensayos RP y ABTS. Esta actividad podría atribuirse en mayor medida a los péptidos y los aminoácidos libres liberados durante la digestión que a los compuestos fenólicos, ya que el contenido de estos desciende tras la fase intestinal.

Con este trabajo se ha podido ampliar el conocimiento sobre las propiedades fisicoquímicas, digestibilidad proteica y actividad antioxidante de diferentes pastas de legumbres para un futuro diseño de alimentos ricos en proteínas. Sin embargo, establecer una conclusión sobre que método de cocción es mejor para cada tipo de legumbre estudiada no es sencillo. Se necesitarían más estudios para poder elucidar los efectos del procesado sobre la estructura de la matriz alimentaria y de las interacciones entre los componentes durante la digestión gastrointestinal, así como identificar los compuestos bioactivos responsables de la actividad antioxidante observada.

6. BIBLIOGRAFÍA

- AACC (2000), Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists, The American Association of Cereal Chemists, Inc., St Paul, MN.
- ABBAS, Y. & AHMAD, A. (2018). Impact of processing on nutritional and antinutritional factors of legumes: a Review. *Annals. Food Science and Technology*, 19(2), 199-215.
- ADLER-NISSEN, J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27(6), 1256-1262.
- AGUILERA, J. M. (2019). The food matrix: implications in processing, nutrition and health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(22), 3612-3629.
- AHMED, J.; PTASZEK, P. & BASU, S. (2017). Food Rheology: Scientific Development and Importance to Food Industry. *Advances in Food Rheology and Its Applications*, 1-4
- AKANDE, K. & FABIYI, E. (2010). Effect of Processing Methods on Some Antinutritional Factors in Legume Seeds for Poultry Feeding. *International Journal of Poultry Science*, 9(10), 996-1001.
- ALVAREZ, M. D.; FUENTES, R.; GUERRERO, G. & CANET, W. (2017). Characterization of commercial Spanish hummus formulation: Nutritional composition, rheology, and structure. *International Journal of Food Properties*, 20(4), 845-863.
- AVILÉS-GAXIOLA, S.; CHUCK-HERNÁNDEZ, C. & SERNA SALDÍVAR, S. O. (2018). Inactivation Methods of Trypsin Inhibitor in Legumes: A Review. *Journal of Food Science*, 83(1), 17-29.
- BERSUDER, P.; HOLE, M. & SMITH, G. (1998). Antioxidants from a heated histidine-glucose model system. I: Investigation of the antioxidant role of histidine and isolation of antioxidants by high-performance liquid chromatography. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(2), 181-187.
- BHANDARI, D.; RAFIQ, S.; GAT, Y.; GAT, P.; WAGHMARE, R. & KUMAR, V. (2020). A Review on Bioactive Peptides: Physiological Functions, Bioavailability and Safety. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 26(1), 139-150.
- BHATTARAI, R. R.; DHITAL, S., WU, P.; CHEN, X. D. & GIDLEY, M. J. (2017). Digestion of isolated legume cells in a stomach-duodenum model: Three mechanisms limit starch and protein hydrolysis. *Food and Function*, 8(7), 2573-2582.
- BOHN, T. (2014). Dietary factors affecting polyphenol bioavailability. *Nutrition Reviews*, 72(7), 429-452.
- BOYE, J.; ZARE, F. & PLETCH, A. (2010). Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. *Food Research International*, 43(2), 414-431.
- BRADFORD, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.

- BRODKORB, A.; EGGER, L.; ALMINGER, M.; ALVITO, P.; ASSUNÇÃO, R.; BALLANCE, S.; BOHN, T.; *et al.* (2019). INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, 14 (4), 991-1014.
- CAMPO-DEAÑO, L.; TOVAR, C. A. & BORDERÍAS, J. (2010). Effect of several cryoprotectants on the physicochemical and rheological properties of suwari gels from frozen squid surimi made by two methods. *Journal of Food Engineering*, 97(4), 457-464.
- CÁRDENAS-CASTRO, A. P.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; BELLO-PÉREZ, L. A.; TOVAR, J. & SÁYAGO-AYERDI, S. G. (2020). Bioaccessibility of phenolic compounds in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) after *in vitro* gastrointestinal digestion: A comparison of two cooking procedures. *Cereal Chemistry*, 97(3), 670–680.
- CHÁFER, M. (2000). Deshidratación osmótica de corteza de naranja (Valencia Late) y Mandarina (Satsuma). Tesis Doctoral. Universitat Politècnica de València. Valencia.
- CHEN, C. C.; SHIH, Y. C.; CHIOU, P. W. S. & YU, B. (2010). Evaluating nutritional quality of single stage- and two stage-fermented soybean meal. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 23(5), 598-606.
- CHO, H. M. & YOO, B. (2015). Rheological Characteristics of Cold Thickened Beverages Containing Xanthan Gum–Based Food Thickeners used for Dysphagia Diets. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 115(1), 106–111.
- CILLA, A.; BOSCH, L.; BARBERÁ, R. & ALEGRÍA, A. (2018). Effect of processing on the bioaccessibility of bioactive compounds – A review focusing on carotenoids, minerals, ascorbic acid, tocopherols and polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis*, 68, 3–15.
- CIRKOVIC VELICKOVIC, T. D. & STANIC-VUCINIC, D. J. (2017). The Role of Dietary Phenolic Compounds in Protein Digestion and Processing Technologies to Improve Their Antinutritive Properties. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(1), 82–103.
- COURTY, P. E.; SMITH, P.; KOEGEL, S.; REDECKER, D. & WIPF, D. (2014). Inorganic Nitrogen Uptake and Transport in Beneficial Plant Root-Microbe Interactions. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34(1–3), 4–16.
- CROSARA, K. T. B.; ZUANAZZI, D.; MOFFA, E. B.; XIAO, Y.; MACHADO, M. A. D. A. M. & SIQUEIRA, W. L. (2018). Revealing the Amylase Interactome in Whole Saliva Using Proteomic Approaches. *BioMed Research International*, 2018, 10–16.
- CZUBINSKI, J. & DWIECKI, K. (2016). A review of methods used for investigation of protein-phenolic compound interactions. *International Journal of Food Science & Technology*, 52(3), 573–585.
- DAWIDOWICZ, A. L.; WIANOWSKA, D. & OLSZOWY, M. (2012). On practical problems in estimation of antioxidant activity of compounds by DPPH method (Problems in estimation of antioxidant activity). *Food Chemistry*, 131(3), 1037-1043.
- DONLAO, N. & OGAWA, Y. (2018). Impacts of processing conditions on digestive recovery of polyphenolic compounds and stability of the antioxidant activity of green tea infusion during *in vitro* gastrointestinal digestion. *LWT- Food Science and Technology*, 89, 648-656.

- DRULYTE, D. & ORLIEN, V. (2019). The Effect of Processing on Digestion of Legume Proteins. *Foods*, 8(6), 224.
- EVERETTE, J. D.; BRYANT, Q. M.; GREEN, A. M.; ABBEY, Y. A.; WANGILA, G. W. & WALKER, R. B. (2010). Thorough Study of Reactivity of Various Compound Classes toward the Folin–Ciocalteu Reagent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(14), 8139–8144.
- FAO. 2016. Legumbres: semillas nutritivas para un futuro sostenible.<<http://www.fao.org/3/i5528s/i5528s.pdf>> [Consultado: 15 de mayo 2021].
- FAO. 2021. Día Mundial de las Legumbres.<<https://www.un.org/es/observances/world-pulses-day>> [Consultado: 15 de mayo 2021].
- FISCHER, P. & WINDHAB, E. J. (2011). Rheology of food materials. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 16(1), 36-40.
- GILANI, G. S.; COCKELL, K. A. & SEPEHR, E. (2005). Effects of Antinutritional Factors on Protein Digestibility and Amino Acid Availability in Foods. *Journal of AOAC International*, 88(3), 967-987.
- GILANI, G.S.; XIAO, C.W. & COCKELL, K. A. (2012). Impact of Antinutritional Factors in Food Proteins on the Digestibility of Protein and the Bioavailability of Amino Acids and on Protein Quality. *British Journal of Nutrition*, 108(S2), 315-332.
- GIUSTI, F.; CAPUANO, E.; SAGRATINI, G. & PELLEGRINI, N. (2019). A comprehensive investigation of the behaviour of phenolic compounds in legumes during domestic cooking and *in vitro* digestion. *Food Chemistry*, 285, 458–467.
- GUO, Q.; YE, A.; BELLISSIMO, N.; SINGH, H. & ROUSSEAU, D. (2017). Modulating fat digestion through food structure design. *Progress in Lipid Research*, 68, 109-118.
- GÜZEL, D. & SAYAR, S. (2012). Effect of cooking methods on selected physicochemical and nutritional properties of barlotto bean, chickpea, faba bean, and white kidney bean. *Journal of Food Science and Technology*, 49(1), 89-95.
- HUANG, D.; Boxin, O.U. & PRIOR, R. L. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841–1856.
- HUR, S. J.; LIM, B. O.; DECKER, E. A. & MCCLEMENTS, D. J. (2011). In vitro human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, 125(1), 1-12.
- JAMDAR, S. N.; DESHPANDE, R. & MARATHE, S. A. (2017). Effect of processing conditions and *in vitro* protein digestion on bioactive potentials of commonly consumed legumes. *Food Bioscience*, 20, 1–11.
- JOHANSEN, J. S.; HARRIS, A. K.; RYCHLY, D. J. & ERGUL, A. (2005). Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: Linking basic science to clinical practice. *Cardiovascular Diabetology*, 4(1), 1-11
- JOYE, I. (2019). Protein Digestibility of Cereal Products. *Foods*, 8(6), 1-14.

- KAMRAN, F. & REDDY, N. (2018). Bioactive peptides from legume: Functional and nutraceutical potential. *Recent Advances in Food Safety – RadvFoodSci*, 1(3), 134-149.
- KARAS, M.; JAKUBCZYK, A.; SZYMANOWSKA, U.; ZŁOTEK, U. & ZIELIŃSKA, E. (2017). Digestion and bioavailability of bioactive phytochemicals. *International Journal of Food Science & Technology*, 52(2), 291-305.
- KETNAWA, S. & OGAWA, Y. (2019). Evaluation of protein digestibility of fermented soybeans and changes in biochemical characteristics of digested fractions. *Journal of Functional Foods*, 52, 640-647.
- KUMAR, A., AGARWAL, D. K., KUMAR, S., REDDY, Y. M., CHINTAGUNTA, A. D., SARITHA, K. V., PAL, G., & KUMAR, S. P. J. (2019). Nutraceuticals derived from seed storage proteins: Implications for health wellness. *Biocatalysis and Agricultural*, 17, 710-719.
- LE GALL, M.; GUÉGUEN, J.; SÉVE, B. & QUILLIEN, L. (2005). Effects of Grinding and Thermal Treatments on Hydrolysis Susceptibility of Pea Proteins (*Pisum sativum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(8), 3057–3064.
- LIAO, W.; GU, L.; ZHENG, Y.; ZHU, Z.; ZHAO, M.; LIANG, M. & REN, J. (2016). Analysis of the quantitative structure-activity relationship of glutathione-derived peptides based on different free radical scavenging systems. *MedChemComm*, 7(11), 2083-2093.
- MARCONI, E.; RUGGERI, S.; CAPPELLONI, M.; LEONARDI, D. & CARNOVALE, E. (2000). Physicochemical, Nutritional, and Microstructural Characteristics of Chickpeas (*Cicer arietinum* L.) and Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) Following Microwave Cooking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(12), 5986-5994.
- MARGIER, M.; GEORGÉ, S.; HAFNAOUI, N.; REMOND, D.; NOWICKI, M.; DU CHAFFAUT, L.; AMIOT, M. J. & REBOUL, E. (2018). Nutritional composition and bioactive content of legumes: Characterization of pulses frequently consumed in France and effect of the cooking method. *Nutrients*, 10(11), 1-12.
- MARTÍN-CABREJAS, M. Á. (Ed.). (2019). Legumbres: calidad nutricional, procesamiento y posibles beneficios para la salud (Vol. 8) 1-18. *Real Sociedad de Química*.
- MARTINEZ-GONZALEZ, A. I.; DÍAZ-SÁNCHEZ, Á. G.; ROSA, L. A.; VARGAS-REQUENA, C. L.; BUSTOS-JAIMES, I. & ALVAREZ-PARRILLA, E. (2017). Polyphenolic compounds and digestive enzymes: *In vitro* non-covalent interactions. *Molecules*, 22(4), 669.
- MINEKUS, M.; ALMINGER, M.; ALVITO, P.; I, S.; BOHN, T.; BOURLIEU, C.; CARRIÈRE, F.; BOUTROU, R.; *et al.* (2014). A standardized static *in vitro* digestion method suitable for food-an international consensus. *Food Function*, 5(6), 1113-1124.
- MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN. Últimos datos de consumo alimentario. Informe del consumo de alimentación en España 2019. <<https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-tendencias/panel-de-consumo-alimentario/ultimos-datos/default.aspx>> [Consultado: 15 de mayo 2021]

- MTOLO, M.; GERRANO, A. & MELLEM, J. (2017). Effect of simulated gastrointestinal digestion on the phenolic compound content and *in vitro* antioxidant capacity of processed Cowpea (*V. unguiculata*) cultivars. *CyTA - Journal of Food*, 15(3), 391–399.
- MUZQUIZ, M.; VARELA, A.; BURBANO, C.; CUADRADO, C.; GUILLAMÓN, E. & PEDROSA, M. M. (2012). Bioactive compounds in legumes: pronutritive and antinutritive actions. Implications for nutrition and health. *Phytochemistry Reviews*, 11(2-3), 227-244.
- NICOLÁS-GARCÍA, M.; PERUCINI-AVENDAÑO, M.; JIMÉNEZ-MARTÍNEZ, C.; PEREA-FLORES, M. D. J.; GÓMEZ-PATIÑO, M. B.; ARRIETA-BÁEZ, D. & DÁVILA-ORTIZ, G. (2021). Bean phenolic compound changes during processing: Chemical interactions and identification. *Journal of Food Science*, 86(3), 643–655.
- OGAWA, Y.; DONLAO, N.; THUENGTUNG, S.; TIAN, J.; CAI, Y.; REGINIO, F. C.; KETNAWA, S.; YAMAMOTO, N. & TAMURA, M. (2018). Impact of food structure and cell matrix on digestibility of plant-based food. *Current Opinion in Food Science*, 19, 36-41.
- OZDAL, T.; CAPANOGLU, E. & ALTAY, F. (2013). A review on protein–phenolic interactions and associated changes. *Food Research International*, 51(2), 954–970.
- PARCA, F.; KOCA, Y. O. & UNAY, A. I. (2018). Nutritional and Antinutritional Factors of Some Pulses Seed and Their Effects on Human Health. *International Journal of Secondary Metabolite*, 5(4), 331-342.
- PERALES ENJAMIO, L.; ALONSO RODRIGUEZ, P.; GASPAR VALERO, T.; MORENO RUIZ, E.; AVILA TORRES, J. M. & MOREIRAS VARELA, G. (2013). Informe sobre Legumbres Nutrición y Salud. *Fundación Española de la Nutrición*, 100.
- PRIOR, R. L.; WU, X. & SCHAICH, K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290–4302.
- RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M. & RICE-EVANS, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- SÁ, A. G. A.; MORENO, Y. M. F. & CARCIOFI, B. A. M. (2019). Food processing for the improvement of plant proteins digestibility. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(20), 3367-3386.
- SARMADI, B. H. & ISMAIL, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides*, 31(10), 1949-1956.
- SINGH, B.; SINGH, J. P.; KAUR, A. & SINGH, N. (2017). Phenolic composition and antioxidant potential of grain legume seeds: A review. *Food Research International*, 101, 1-16
- SORIANO SANCHO, R. A.; PAVAN, V. & PASTORE, G. M. (2015). Effect of *in vitro* digestion on bioactive compounds and antioxidant activity of common bean seed coats. *Food Research International*, 76, 74–78.

- SUNGSINCHAI, S.; NIAMNUY, C.; WATTANAPAN, P.; CHAROENCHAITRAKOOL, M. & DEVAHASTIN, S. (2019). Texture Modification Technologies and Their Opportunities for the Production of Dysphagia Foods: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(6), 1898-1912.
- TALENS, P.; CASTELLS, M. L.; VERDÚ, S.; BARAT, J. M. & GRAU, R. (2021). Flow, viscoelastic and masticatory properties of tailor made thickened pea cream for people with swallowing problems. *Journal of Food Engineering*, 292, 110265.
- TORRES, J.; RUTHERFURD, S. M.; MUÑOZ, L. S.; PETERS, M. & MONTOYA, C. A. (2016). The impact of heating and soaking on the *in vitro* enzymatic hydrolysis of protein varies in different species of tropical legumes. *Food Chemistry*, 194, 377–382.
- TSAI, S.Y; HUANG, S.J. & MAU, J.L. (2006). Antioxidant properties of methanolic extracts from *Agrocybe cylindracea*. *LWT – Food Science and Technology*, 39(4), 379-387.
- VAGADIA, B. H.; VANGA, S. K. & RAGHAVAN, V. (2017). Inactivation methods of soybean trypsin inhibitor – A review. *Trends in Food Science and Technology*, 64, 115-125.
- VAZ PATTO, M. C. (2016). Grain legume protein quality: A hot subject. *Arbor: Ciencia, pensamiento y cultura*, 192 (779), 5.
- ZHU, L.; CHEN, J.; TANG, X. & XIONG, Y. L. (2008). Reducing, radical scavenging, and chelation properties of *in vitro* digests of alcalase-treated zein hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (10), 2714-2721.
- ZOU, T. B.; HE, T. P.; LI, H. B.; TANG, H. W. & XIA, E. Q. (2016). The Structure-Activity Relationship of the Antioxidant Peptides from Natural Proteins. *Molecules*, 21(1), 1-14.