



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

IDENTIFICACIÓN DE PÉPTIDOS CON POTENCIAL
ACTIVIDAD ANTIDIABÉTICA RESISTENTES A LA
DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL GENERADOS A
PARTIR DE LEGUMBRES PREPARADAS CON
DISTINTOS MÉTODOS DE COCCIÓN

Trabajo Fin de Grado

Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

AUTOR/A: Latorre Pérez, Juan Bautista

Tutor/a: Talens Oliag, Pau

Cotutor/a externo: MORA SOLER, LETICIA

Director/a Experimental: ARNAL SALINAS, MILAGROS

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023

Identificación de péptidos con actividad antidiabética resistentes a la digestión gastrointestinal generados a partir de legumbres preparadas con distintos métodos de cocción.

Resumen

Las legumbres son una fuente de proteínas, fibra, vitaminas del grupo B, minerales (hierro y zinc) y antioxidantes. Es un alimento sostenible medioambientalmente y uno de los ingredientes principales en muchas dietas.

Un consumo regular de legumbres ha demostrado tener beneficios tanto en la prevención como en la mejora de algunas enfermedades cardiovasculares, colesterol y diabetes. Aparte de un índice glucémico bajo y un alto contenido en fibra, se conoce la presencia de péptidos bioactivos que podrían tener un papel importante en la actividad hipoglucémica.

El objetivo de este trabajo fue identificar péptidos extraídos a partir de legumbres (soja, guisante, garbanzo y alubia) preparadas con diferentes métodos de cocción (convencional, a presión y microondas) que presenten actividad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa después de la digestión gastrointestinal.

Tras la digestión gastrointestinal se observó un aumento en el perfil de péptidos en todas las legumbres y tratamientos térmicos estudiados.

Las fracciones obtenidas tras separar por HPLC las muestras digeridas fueron analizadas para determinar la actividad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa. La fracción 2 correspondiente al grupo de péptidos más hidrofílicos, fue la responsable de la mayor actividad en todas las legumbres estudiadas, superando el 40 % de inhibición de la enzima α -glucosidasa, y llegando al 60% en las muestras de guisante y alubia tratadas con el método de cocción convencional.

El estudio *in silico* del potencial bioactivo de los péptidos identificados mostró que algunas de las secuencias obtenidas tenían un alto potencial para poder ejercer su actividad biológica en el organismo. En este sentido, las principales características de los péptidos identificados fueron su alta polaridad y anfipaticidad. Sin embargo, sería necesario sintetizar las secuencias para confirmar la actividad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa mediante ensayos *in vitro*.

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

Autor: Juan Bautista Latorre Pérez

Tutores: Pau Talens Oliag

Leticia Mora Soler

Milagros Arnal Salinas

Identification of peptides with antidiabetic activity resistant to gastrointestinal digestion generated from legumes prepared with different cooking methods.

Abstract

Legumes are a source of protein, fiber, B vitamins, minerals (iron and zinc) and antioxidants. It is an environmentally sustainable food and one of the main ingredients in many diets.

A regular consumption of legumes has been shown to have benefits both in the prevention and in the improvement of some cardiovascular diseases, cholesterol, and diabetes. Apart from a low glycemic index and a high fiber content, the presence of bioactive peptides is known that could play an important role in hypoglycemic activity.

The objective of this work was to identify peptides extracted from legumes (soybean, green pea, chickpea, and bean) prepared with different cooking methods (conventional, pressure and microwave) that present inhibitory activity of the α -glucosidase enzyme after gastrointestinal digestion.

After gastrointestinal digestion, an increase in the peptide profile was observed in all legumes and heat treatments studied.

The fractions obtained after separating the digested samples by HPLC were analysed to determine the inhibitory activity of the α -glucosidase enzyme. Fraction 2, corresponding to the group of most hydrophilic peptides, was responsible for the highest activity in all the legumes studied, exceeding 40% inhibition of the α -glucosidase enzyme, and reaching 60% in the green pea and navy bean samples treated with the conventional cooking method.

The *in silico* study of the bioactive potential of the identified peptides showed that some of the sequences obtained have a high potential to perform their biological activity in the organism. In this sense, the main characteristics of the identified peptides were their high polarity and amphipathicity. However, it would be necessary to synthesize the sequences to confirm the inhibitory activity of the α -glucosidase enzyme by *in vitro* assays.

Keywords: legumes, proteins, peptides, gastrointestinal digestion, antidiabetic activity.

Author: Juan Bautista Latorre Pérez
Supervisors: Pau Talens Oliag
Leticia Mora Soler
Milagros Arnal Salinas

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Las legumbres como alimento y su importancia nutricional	1
1.2 Péptidos bioactivos y efecto de la digestión gastrointestinal en su generación	3
1.3 La diabetes mellitus.....	4
2. OBJETIVOS	7
2.1 Objetivo general.....	7
2.2 Objetivos específicos	7
2.3 Plan de trabajo	7
3. MATERIALES Y MÉTODOS	8
3.1 Materiales y reactivos	8
3.2 Preparación de las legumbres	8
3.3 Digestión gastrointestinal <i>in vitro</i>	9
3.4 Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC)	9
3.5 Análisis de inhibición de la enzima α -glucosidasa	10
3.6 Identificación de péptidos por LC-MS/MS	11
3.7 Análisis <i>in-silico</i> de los péptidos identificados mediante espectrometría de masas ..	11
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	12
4.1 Comparación de los cromatogramas obtenidos tras el análisis por HPLC	12
4.2 Actividad inhibidora de la enzima α -glucosidasa de las distintas fracciones	19
4.3 Identificación de los péptidos y análisis <i>in silico</i>	24
5. CONCLUSIONES	30
6. BIBLIOGRAFÍA	31

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Codificación de las muestras según tipo de legumbre, tratamiento y fase de la digestión.	10
Tabla 2. Resultados de inhibición de la enzima α -glucosidasa en porcentaje obtenido en la fracción de péptidos colectada entre el min 2-3 de la extracción (denominada en el texto como fracción 2).	24
Tabla 3. Péptidos identificados por espectrometrías de masas en la fracción 2 tras la separación por HPLC. Muestra de soja (SB) guisante (GP), garbanzo (CP) y alubia (NB) tratadas con cocción convencional (C) y fase de digestión intestinal (i).	27
Tabla 4. Predicción in silico de la alergenicidad, toxicidad, probabilidad de penetración celular (PPC) y propiedades fisicoquímicas de los péptidos identificados con un Peptide Ranker Ratio (PRR) > 0,5.	29

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Cromatogramas de las diferentes fases de digestión de las muestras de soja en función del tratamiento de cocción empleado: convencional (a), presión (b) y microondas (c). 13
- Figura 2.** Cromatogramas de las diferentes fases de la digestión de las muestras de guisante en función del tratamiento de cocción empleado: convencional (a), presión (b) y microondas (c). .14
- Figura 3.** Cromatogramas de las diferentes fases de la digestión de las muestras de garbanzo en función del tratamiento de cocción empleado: convencional (a), presión (b) y microondas (c).
..... 15
- Figura 4.** Cromatogramas de las diferentes fases de la digestión de las muestras de alubias en función del tratamiento de cocción empleado: convencional (a), presión (b) y microondas (c). .16
- Figura 5.** Cromatogramas de las muestras cocidas y digeridas tras la fase intestinal en función de la legumbre empleada: soja (a), guisante (b), garbanzo (c) y alubia (d). 17
- Figura 6.** Cromatograma de las muestras de soja en las que se ha aplicado la fase de digestión intestinal en función del tratamiento de cocción empleado: convencional (a), presión (b) y microondas (c) y porcentaje de actividad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa. 20
- Figura 7.** Cromatograma de las muestras de guisante en las que se ha aplicado la fase de digestión intestinal en función del tratamiento de cocción empleado: convencional (a), presión (b) y microondas (c) y porcentaje de actividad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa. 21
- Figura 8.** Cromatograma de las muestras de garbanzo en las que se ha aplicado la fase de digestión intestinal en función del tratamiento de cocción empleado: convencional (a), presión (b) y microondas (c) y porcentaje de actividad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa. 22
- Figura 9.** Cromatograma de las muestras de alubia en las que se ha aplicado la fase de digestión intestinal en función del tratamiento de cocción empleado: convencional (a), presión (b) y microondas (c) y porcentaje de actividad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa. 23

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

- ADA: Asociación de diabetes americana
- ACN: Acetonitrilo
- B: Antes de la digestión
- C: Cocción convencional
- CP: Garbanzo
- DGI: digestión gastrointestinal in vitro
- DPP-IV: Dipeptidyl peptidase-4
- ECA: Enzima convertidora de angiotensina
- FAN: Factores antinutricionales
- FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.
- G: Fase gástrica
- GP: Guisante
- I: Fase intestinal
- IDF: Federación internacional de diabetes
- LC-MS/MS: Cromatografía líquida con espectrometría de masas
- M: Microondas
- MPTs: Modificaciones postraduccionales
- NB: Alubia
- P: Presión
- PSM: Coincidencia espectral de péptidos
- RP-HPLC: Cromatografía de fase inversa
- SB: Soja
- SGF: Fluido gástrico simulado
- SIF: Fluido intestinal simulado
- SSF: Fluido salival simulado
- TFA: Ácido trifluoroacético

1.INTRODUCCIÓN

1.1 Las legumbres como alimento y su importancia nutricional

Las legumbres son semillas que pertenecen a la familia vegetal *Fabaceae* o *Leguminosae*, el tercer grupo de plantas más numeroso del planeta. Su origen es de hace alrededor de 90 millones de años. Se consideran legumbres a las semillas secas, limpias, sanas y separadas de la vaina, como son los garbanzos, judías, lentejas, soja, habas o guisantes, entre otros. Dentro de esta denominación no se incluyen aquellos cultivos frescos como podrían ser los guisantes o las judías verdes ya que a este tipo de alimentos se les considera hortalizas (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 2016).

Las legumbres están presentes en numerosas recetas y forman parte de los hábitos alimenticios tradicionales de muchos países. Este grupo de alimentos resalta por sus beneficios nutricionales, bajo coste y fácil almacenamiento (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 2016).

Después de los cereales, las legumbres ocupan el segundo puesto como suministro alimentario para la agricultura mundial (Abbas y Ahmad, 2018). Existen desde hace millones de años y su domesticación podría ser más antigua que la del maíz. Es un alimento extendido por todo el planeta, en el que se incluyen regiones en condiciones climatológicas extremas de frío y calor. A diferencia de otras plantas, las leguminosas tienen la capacidad de aportar nitrógeno a su tierra de cultivo mejorando la fertilidad y condiciones del suelo, permitiendo un menor uso de agroquímicos (Courty et al., 2015).

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) anunció el 2016 como el Año Internacional de las Legumbres, con el objetivo de promover el valor y consumo de las legumbres, así como concienciar sobre sus beneficios tanto a nivel nutricional como ambiental. Este año Internacional de las Legumbres tuvo sus objetivos alineados con la Agenda 2030, buscando el desarrollo sostenible destinado a erradicar la desnutrición, la pobreza extrema y abordar el cambio climático, entre otros (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 2016).

Alrededor de 2.000 millones de personas viven con carencias de uno o más micronutrientes y unos 800 millones de personas sufren hambre crónica según la FAO. Estas cifras sorprenden al compararlas con los 500 millones de habitantes del planeta que padecen obesidad. En este sentido, las legumbres pueden ser una solución a estos problemas no solo porque aumentan significativamente la calidad y cantidad de los alimentos en muchas zonas, sino también porque pueden producirse de manera sostenible, eficiente y segura. Gracias a sus características nutricionales pueden ayudar a muchas personas que padecen sobrepeso a mejorar su alimentación. Además, muchas investigaciones han demostrado que la inclusión de legumbres en la dieta diaria tiene efectos beneficiosos en el control y la prevención de muchas enfermedades (Tharanathan y Mahadevamma, 2003) como la diabetes tipo II y las enfermedades cardiovasculares (Leterme y Muñoz, 2002).

Las legumbres son alimentos muy completos que, por lo general, incluyen todos los nutrientes. Dentro de su composición nutricional podemos destacar que son una gran fuente de proteínas, contienen entre un 19 % y un 36 %, lo que las convierte en la principal fuente de proteína vegetal para el hombre.

La calidad proteica de las legumbres es menor que la de origen animal ya que la composición en aminoácidos esenciales que presenta no es tan completa. Generalmente, las legumbres son ricas en lisina y leucina, pero deficientes en aminoácidos azufrados (metionina y cisteína) y triptófano. Por el contrario, los cereales son ricos en metionina y carentes de lisina. Por ello, estos dos alimentos son complementarios nutricionalmente para la obtención de proteínas vegetales de alto valor biológico (Vaz Patto, 2016).

Para mejorar la calidad nutricional de las legumbres se han realizado varios estudios, con soja, por ejemplo, para incrementar los contenidos de lisina y triptófano (Falco et al., 1995; Galili et al., 2002) o con alubias, para mejorar la deficiencia de metionina mediante la introducción de un transgén de la nuez de Brasil que codifica proteínas ricas en metionina (por ejemplo, albúmina 2S) (Aragao et al., 1999).

El macronutriente principal de las legumbres es el hidrato de carbono, se encuentra principalmente como almidón, seguido de oligosacáridos (rafinosa y estaquiosa), lo cual permite la liberación de glucosa en sangre paulatinamente debido a que son hidratos de carbono de digestión lenta. Respecto a la fibra presente en las legumbres, es conocida su producción de gases debido a la incapacidad de la flora de digerir la fibra insoluble, lo que también aumenta el tránsito intestinal. La fibra soluble, que es más abundante, se digiere a nivel del colon por la flora bacteriana, liberando diversos ácidos grasos de cadena corta como puede ser el butirato (FUNDACIÓN ESPAÑOLA DE LA NUTRICIÓN, 2017). Además, la fermentación de esta forma prebióticos beneficiosos para los microorganismos. Debido a la absorción de agua del colon humano, la dieta alta en fibra previene el problema del estreñimiento y también juega un papel importante en la protección contra el cáncer de colon, enfermedades cardiovasculares, obesidad, diabetes y otras enfermedades (Lee et al., 1992).

La grasa es uno de los macronutrientes menos presentes en las legumbres y al igual que los demás alimentos de origen vegetal no tiene colesterol. Presenta un elevado contenido de ácidos grasos poliinsaturados (ácido linoleico 18:2 n-6 y ácido α -linolénico 18:3 n-3) y monoinsaturados (ácido oleico, 18:1 n-9) (FUNDACIÓN ESPAÑOLA DE LA NUTRICIÓN, 2017).

Entre los minerales presentes en las legumbres se puede destacar el calcio, magnesio, potasio, fósforo, zinc y hierro. Muchos de estos minerales tienen un porcentaje de absorción menor que aquellos que se encuentran en alimentos de origen animal, por lo que hay que tener en cuenta que la combinación de determinados alimentos con las legumbres podría beneficiar o perjudicar en su absorción. El hierro hemo (de origen animal), es absorbido con mucha mayor eficiencia que el hierro no hemo, además de potenciar la absorción de este último (Gonzalez, 2005).

Con respecto a las vitaminas, es interesante su contenido en vitamina B1 (tiamina), B3 (niacina), B6 y folatos, este especialmente en los garbanzos (FUNDACIÓN ESPAÑOLA DE LA NUTRICIÓN, 2017).

El término antinutrientes se utiliza para calificar aquellos compuestos que afectan al valor nutritivo de ciertos alimentos, especialmente las semillas, al bloquear o inhibir la absorción de nutrientes que provienen generalmente de alimentos de origen vegetal (proteínas y minerales). Estos factores son de naturaleza variada y pueden ser tóxicos y causar efectos fisiológicos indeseados como flatulencia, distensión estomacal, afectaciones pancreáticas, aglutinación de glóbulos rojos, disminución en la asimilación de nutrientes, entre otros. Los factores antinutricionales (FAN) son generados por el metabolismo secundario de las plantas como defensa ante situaciones de peligro (Elizalde et al., 2009). Estos pueden clasificarse como termo estables y

termo lábiles y algunos ejemplos son los taninos, ácido fítico, saponinas, lectinas, inhibidores de tripsina y oligosacáridos como la rafinosa, estaquiosa y verbascosa (Avilés-Gaxiola et al., 2018).

Las legumbres en general son consumidas después del remojo y el tratamiento térmico, lo que reduce la concentración de taninos, ácido fítico y FAN solubles y termolábiles, como la fitohemaglutinina, los inhibidores de las proteasas y los oligosacáridos. Esto mejora la palatabilidad, digestibilidad y disponibilidad de algunos nutrientes (Barampama y Simard; 1994, Wu et al., 1996), aunque la digestibilidad de las proteínas en general sigue siendo baja (Márquez y Lajolo, 1991; Oliveira y Sgarbieri, 1986).

La resistencia o susceptibilidad a la digestión de las proteínas de las legumbres depende de las características estructurales de cada proteína (Deshpande y Damodaran, 1989; Yu, 2005). Además, otros constituyentes como los carbohidratos (glucoproteínas), pueden aumentar la resistencia de la proteína a la hidrólisis (Deshpande y Nielsen, 1987; Genovese y Lajolo, 1996).

Remojar las legumbres antes de cocinarlas reduce el tiempo de cocción (Taiwo y Akanbi, 1997) y permite que el agua se disperse en la fracción de proteína y los gránulos de almidón, lo que facilita su desnaturalización y gelatinización, respectivamente, y suaviza la textura de las legumbres (Siddiq y Uebersax, 2012).

En estudios anteriores se ha visto que, en garbanzos y lentejas, la ebullición y la cocción a presión no afectan la composición de azúcar (Vidal-Valverde et al., 1993). Sin embargo, el remojo en agua entre 12 y 14 horas de los garbanzos causó una reducción del contenido de sacarosa con una reducción puntual de la estaquiosa y la rafinosa (Egounlety y Aworh, 2003). El proceso de remojo también disminuyó los monosacáridos, disacáridos y oligosacáridos en las alubias (Vidal-Valverde et al., 1994). Por último, los tratamientos de procesado de legumbres redujeron los contenidos minerales en diferentes semillas de leguminosas (El-Adawy, 2002).

1.2 Péptidos bioactivos y efecto de la digestión gastrointestinal en su generación

Los péptidos bioactivos son secuencias de aminoácidos que se encuentran formando parte de una proteína pero que tras liberarse mediante hidrólisis química o enzimática pueden ejercer determinadas actividades biológicas en el organismo (Meisel, 1998).

Generalmente son péptidos de pequeño tamaño, entre 3 y 20 aminoácidos, que pueden atravesar el epitelio intestinal y llegar a los tejidos circundantes a través de la circulación sistémica, donde pueden ejercer funciones específicas a nivel gastrointestinal, sistémico y local (Pihlanto-Leppälä, 2000; Shahidi y Zhong, 2008). Entre estas actividades, los péptidos bioactivos pueden afectar al metabolismo celular y actuar como factores de crecimiento, reguladores vasculares, neurotransmisores e inductores hormonales (Robert y Zaloga, 1994). También pueden controlar las glándulas excretoras, regular la presión arterial, afectar al sueño, memoria, dolor y apetito. Pueden ejercer su efecto de forma local o en varios órganos una vez que han ingresado en el sistema circulatorio.

Para que los péptidos puedan ejercer su acción es necesario que sean biodisponibles, ya que deben ser liberados tras la acción de las enzimas gastrointestinales (pepsina y las proteasas intestinales), y deben poder atravesar el epitelio intestinal y a través de la circulación sanguínea llegar a los órganos diana (Korhonen y Pihlanto, 2003; Vermeirssen et al., 2004). En el caso de

los péptidos bioactivos antidiabéticos, concretamente los inhibidores de la α -glucosidasa y α -amilasa, deben ejercer la actividad durante la digestión para inhibir las enzimas, por lo su presencia es interesante en el tracto digestivo y no en la circulación sanguínea (Acquah et al., 2022)

Existe un interés de utilizar péptidos bioactivos naturales frente a los sintéticos, ya que los sintéticos pueden tener efectos secundarios sobre el organismo. Algunos de los péptidos naturales con actividad antidiabética encontrados en legumbres son LLSL, QQEG y NEGEAH que provienen de la alubia y tienen actividad inhibidora de la α -glucosidasa y α -amilasa o IAVPTGVA que proviene de la soja y tiene actividad inhibidora de la DPP-IV (Patil et al., 2020). A pesar de que los péptidos obtenidos de forma sintética pueden tener alta especificidad y gran actividad, en la práctica se observan casos con efectos secundarios notables. Péptidos antihipertensivos sintéticos inhibidores de la ECA (enzima convertidora de angiotensina), como el captopril y la enalapril, comúnmente empleados para tratar enfermedades cardíacas, pueden causar varios efectos secundarios como tos, alteración del gusto, sarpullido y angioedema (Alemán et al., 2011).

1.3 La diabetes mellitus

La diabetes mellitus es un trastorno en el cual la cantidad de glucosa en la sangre está por encima de los rangos saludables. Según la American Diabetes Association (ADA), los valores de glucemia deben mantenerse entre 70-130 mg/dL antes de comer, 90-180 mg/dL dos o tres horas después de comer y 80-140 mg/dL antes de irse a dormir. La diabetes mellitus es una condición crónica que ocurre cuando el páncreas no produce suficiente insulina, hormona que regula la concentración de glucosa en la sangre, o cuando el cuerpo no puede usar la que produce de manera efectiva. Un efecto común de la diabetes no controlada es la hiperglucemia, que con el tiempo puede dañar gravemente muchos órganos y sistemas del cuerpo, especialmente los nervios y los vasos sanguíneos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2020).

Según la Federación Internacional de la Diabetes (IDF), en 2021, 537 millones de adultos (20-79 años) padecían diabetes, es decir, 1 de cada 10. Se prevé que este número aumente a 643 millones para 2030 y 783 millones para 2045. Más de 3 de cada 4 adultos con diabetes viven en países de ingresos bajos y medios. La intolerancia a la glucosa es un importante problema de salud junto con la aparición de enfermedades cardiovasculares. En 2021, la diabetes fue responsable de 6,7 millones de muertes (FEDERACIÓN INTERNACIONAL DE LA DIABETES, 2021).

Existen diferentes tipos de diabetes. Además de la diabetes tipo 1 y 2, que son las más comunes en la población, están la diabetes gestacional, la tipo MODY y la tipo LADA. En la diabetes tipo 1 el sistema inmunitario del organismo destruye las células que liberan insulina, llegando a eliminar la producción de insulina del cuerpo con el tiempo, lo que requiere dosis diarias de la hormona y un control frecuente de la alimentación y glucosa sanguínea. Hoy en día, aún se desconoce la causa de este tipo de diabetes y no se sabe cómo prevenirla. La diabetes tipo 2 es causada por la incapacidad del cuerpo para usar la insulina de manera efectiva. Además, a medida que la diabetes tipo 2 empeora, es posible que el páncreas produzca cada vez menos insulina. Alrededor del 90 % de las personas con diabetes tienen diabetes tipo 2, principalmente debido al exceso de peso corporal y la falta de actividad física. Su control suele incluir una alimentación saludable, hacer ejercicio de forma regular y pérdida de peso.

La diabetes gestacional es parecida a la diabetes tipo 2, afecta a mujeres embarazadas que no padecen esta patología y se debe a la resistencia a la insulina debida al gran esfuerzo metabólico. La diabetes tipo MODY, se debe a una única mutación genética en el gen autosómico dominante lo que produce una alteración en la capacidad de generación de insulina a través del páncreas. Por último, la diabetes tipo LADA, se debe a que el sistema inmunológico de los pacientes ataca a las células que producen insulina en el páncreas, muy similar a la causa de la diabetes tipo 1 pero con un ataque a las células más lento (FEDERACIÓN ESPAÑOLA DE DIABETES, 2023). En muchos casos son necesarios medicamentos para la diabetes, tratamiento con insulina y control de la glucosa sanguínea (FEDERACIÓN INTERNACIONAL DE LA DIABETES, 2021).

Investigaciones recientes apuntan a que las legumbres pueden jugar un papel importante en la prevención y tratamiento de la diabetes mellitus (Campos-Vega et al., 2010). Estas nuevas terapias dietéticas se basan en estudios epidemiológicos que han demostrado que el consumo de tres o más porciones por semana de legumbres reduce entre un 20 y un 35 % el riesgo de padecer diabetes (Kirpich y Maryniuk, 2011). Además, diversos estudios de corta duración han demostrado que el consumo de legumbres en adultos diabéticos y no diabéticos reducía la elevación de los niveles de glucosa postprandial cuando se comparaba con la ingesta de alimentos ricos en almidón (Venn y Mann, 2004).

Los garbanzos son una de las legumbres ricas en almidón resistente y amilosa. Ambos componentes reducen la glucosa disponible en sangre, por lo que se reduce la necesidad de insulina (Osorio et al., 2008). Si el consumo de este tipo de glucopolisacárido de liberación lenta se mantiene en el tiempo, a medio plazo se puede conseguir una mayor tolerancia a la glucosa y una mejora de la resistencia a la insulina (Nestel et al., 2004). En resumen, el consumo de garbanzos reduce el índice glucémico y la respuesta de la insulina, lo que lleva a un mejor control de la diabetes tipo 2 y, por lo tanto, a una menor gravedad.

Por otro lado, estudios que utilizan proteína y fibra de soja han demostrado su papel en la reducción del azúcar en sangre y en la mejora de la respuesta efectiva a la insulina (Villegas et al., 2008), no solo por la fracción proteica sino también por la presencia de flavonoides. Las principales isoflavonas de la soja son la genisteína, la daidzeína y la glicitina, cuyas potentes acciones se conocen como inhibidores de la acción de la α -glucosidasa, una enzima importante en la digestión de los carbohidratos (Lee y Lee, 2001). Esta inhibición se ve incrementada por la baja digestibilidad de los carbohidratos de soja gracias a la presencia de fibra soluble y al alto contenido de amilosa y almidón resistente. Todos estos, combinados con una gran cantidad de ácidos grasos de cadena corta, evitan que aumenten los niveles de azúcar en la sangre, lo que da como resultado una respuesta de insulina reducida (Kwon et al., 2010).

Los medicamentos para la diabetes tienen posibles efectos secundarios, como pueden ser, el riesgo de bajada excesiva del nivel de azúcar en la sangre, problemas estomacales (gases, diarrea), riesgo de insuficiencia cardiaca, dolor de cabeza o fatiga entre otros. Por ello, es interesante la búsqueda de tratamientos y alternativas que puedan compaginarse como los péptidos bioactivos (Patil et al., 2020).

Los péptidos bioactivos antidiabéticos pueden ejercer funciones de inhibición de la enzima α -amilasa, α -glucosidasa y dipeptidil peptidasa-IV (DPP-IV). Los inhibidores de la α -amilasa minimizan la hidrólisis del enlace glucosídico (alfa-1,4) y ayudan a la digestión lenta de los carbohidratos y, por lo tanto, retrasan la absorción de glucosa y reducen el nivel de glucosa posprandial en la sangre (Jayaraj et al. 2013). Los inhibidores de la α -glucosidasa disminuyen la toxicidad de la glucosa (mejora la sensibilidad a la insulina), disminuyen la hiperglucemia

posprandial, aumentan la producción del péptido similar al glucagón-1 (GLP-1), por lo tanto, aumentan la secreción de insulina (Scheen 2003; Mooradian y Thurman 1999). La DPP-IV es una enzima proteasa que escinde la hormona GLP-1 minutos después de su secreción y la inactiva para su función biológica. Por lo tanto, la inhibición de DPP-IV tiene el potencial de revertir la condición hiperglucémica (Ahrén 2007). Algunos ejemplos de estos péptidos son el KLPGFNVLQPS que inhibe la α -glucosidasa y el KLPGFEAGVD que inhibe la α -amilasa, ambos obtenidos de la albumina, y el IPA VFIPAVFK que inhibe la DPP-IV obtenido de la β -lactoglobulina (Vilcacundo, 2017).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

El objetivo general del trabajo es el estudio del potencial antidiabético de los péptidos generados tras la digestión gastrointestinal simulada de legumbres (soja, guisante, garbanzo y alubia) preparadas con diferentes métodos de cocción (convencional, a presión y microondas).

2.2 Objetivos específicos

1. Obtención de los péptidos resistentes a la cocción y digestión gastrointestinal con actividad inhibidora de la enzima α -glucosidasa.
2. Separación y aislamiento de la fracción peptídica responsable de la actividad biológica.
3. Identificación y análisis *in silico* de las secuencias peptídicas para evaluar su potencial bioactivo.

2.3 Plan de trabajo

1. Remojo y cocción de las distintas legumbres (soja, guisante, garbanzo y alubia) de forma convencional, a presión y en microondas
2. Digestión gastrointestinal *in vitro* de las legumbres cocidas.
3. Obtención por HPLC del perfil peptídico de las legumbres cocidas antes de la digestión y tras la fase gástrica e intestinal.
4. Fraccionamiento por HPLC de las legumbres digeridas con fase gástrica e intestinal.
4. Análisis de la actividad inhibidora de la enzima α -glucosidasa de las fracciones obtenidas.
5. Identificación de la secuencia de los péptidos con actividad inhibidora de la α -glucosidasa mediante espectrometría de masas en tándem.
6. Análisis *in silico* de las secuencias identificadas para estudiar su potencial bioactivo.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales y reactivos

Las legumbres utilizadas fueron guisante verde (*Pisum sativum*), garbanzo (*Cicer Arietinum*), soja (*Glycine max*) y alubias blancas (*Phaseolus vulgaris*), compradas en un supermercado local (Madrid, España).

Para la simulación de la digestión gastrointestinal se utilizaron las enzimas α -amilasa y pancreatina de páncreas porcino, la pepsina de mucosa gástrica porcina, así como extracto de bilis bovina de Sigma-Aldrich, Co. (St. Louis, MO, EE. UU.).

Para la separación y colección de fracciones en HPLC se utilizó un filtro de nylon de 4 mm de Nationalscientific (Los ángeles, CA, EE.UU.) y para la preparación de las fases se emplearon Ácido trifluoroacético (TFA) de Sigma-Aldrich, Co. (St. Louis, MO, EE. UU.) y acetonitrilo (ACN) de Scharlau S.L. (Barcelona, España).

Para el análisis de la actividad inhibidora de la α -glucosidasa se emplearon los siguientes reactivos: NaH_2PO_4 y Na_2HPO_4 de panReac AppliChem (Barcelona, España) y α -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* y p-nitrophenyl- α -Dglucopyranoside (p-NPG) de Sigma-Aldrich, Co. (St. Louis, MO, EE. UU.).

Todos los reactivos y productos químicos empleados fueron de grado analítico.

3.2 Preparación de las legumbres

Las legumbres se dejaron en remojo durante la noche en agua destilada en una relación legumbres:agua de 1:5 (p/v).

Tras el remojo, se escurrió el agua y las semillas se sometieron a tres tipos diferentes de cocción doméstica: cocción convencional, a presión y microondas. Se cocinaron en una relación legumbres:agua destilada de 1:10 (p/v) hasta obtener una textura adecuada para el consumo. Para ello, en la cocción convencional, los guisantes y los garbanzos se cocinaron durante 120 min, la soja durante 180 min y las alubias blancas durante 40 min. En la cocción a presión, el tiempo se contabilizó a partir de la salida del vapor, por ello, las alubias blancas no necesitaron más tiempo, los garbanzos se cocinaron durante 5 min, los guisantes durante 2 minutos y la soja durante 10 minutos. Por último, en la cocción en microondas, las alubias blancas se cocinaron durante 30 min, los guisantes verdes y garbanzos durante 90 minutos y la soja durante 120 minutos. Para cada legumbre se realizaron tres lotes independientes.

Después de la cocción, se descartó el agua y las legumbres se trituraron con una batidora de mano Taurus Robot 300W (Taurus Group, S.L., Barcelona, España) para simular la masticación antes de la digestión gastrointestinal *in vitro*.

3.3 Digestión gastrointestinal *in vitro*

La digestión gastrointestinal *in vitro* (DGI) de las legumbres cocidas se realizó según el protocolo estandarizado INFOGEST (Brodkorb et al., 2019; Minekus et al., 2014). En primer lugar, se prepararon los fluidos digestivos (fluido salival simulado (SSF), fluido gástrico simulado (SGF) y fluido intestinal simulado (SIF)) como se describe en el protocolo armonizado (Brodkorb et al., 2019; Minekus et al., 2014) y a continuación se realizó la DGI. En resumen, para simular la fase oral, se mezclaron en una proporción 1:1 (p/v) 1,5 g de legumbre triturada con SSF que contenía α -amilasa (75 U/mL) y se incubó durante 2 min. Transcurrido el tiempo, la fase se detuvo disminuyendo el pH a 3 con HCl 1 M. Seguidamente, la fase gástrica se simuló añadiendo al bolo oral SGF que contenía pepsina (2000 U/mL) en una proporción 1:1 (v/v) y se incubó durante 120 min. Finalmente, se ajustó el pH a 7 con NaOH 1 M y se simuló la fase intestinal diluyendo el quimo gástrico en proporción 1:1 (v/v) con SIF que contenía pancreatina (basado en la actividad de tripsina para lograr 100 U/mL) y extracto de bilis (10 mM). Después de los 120 min, la digestión se detuvo en un baño a 100 °C durante 5 min seguido de un baño de hielo durante 10 min. Por último, las muestras digeridas se centrifugaron a 8000 rpm, 4 °C durante 10 min y los sobrenadantes se almacenaron a -20 °C hasta su análisis. Todo el protocolo de digestión se realizó a 37 °C con una agitación suave (40 rpm) y constante usando un agitador Intell-Mixer™ RM-2 (ELMI Ltd., Riga, Latvia) y una cámara de incubación Selecta (JP Selecta, SA, Barcelona, España). La DGI se realizó por duplicado y se utilizaron tubos independientes para cada una de las fases de la digestión (gástrica = oral + gástrica, intestinal = oral + gástrica + intestinal). Además, se obtuvieron muestras sin digerir mezclando las legumbres con agua destilada en proporción 1:1 (p/v), y muestras control que contenían únicamente los fluidos, las enzimas y sales biliares (sin muestra).

Las muestras se codificaron como legumbre + tipo de cocción + fase de digestión. Las legumbres se denominaron SB (soja del inglés soybean), GP (guisante verde del inglés green pea), CP (garbanzo del inglés chickpea) y NB (alubia blanca del inglés navy bean), el tipo de cocción como convencional (C), a presión (P) y microondas (M) y la fase de digestión como antes (del inglés before) de la digestión (b), gástrica (g) e intestinal (i). El conjunto de muestras que se empleó se describe según su codificación en la Tabla 1, para una mejor comprensión de las figuras del trabajo.

3.4 Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC)

Las muestras de legumbres cocidas antes y después de la digestión se analizaron por cromatografía de fase inversa (RP-HPLC) para obtener el perfil peptídico y fraccionarlas según su hidrofobicidad. Para ello, se utilizó un sistema HPLC Agilent 1100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE. UU.) con una columna Symmetry C18 (4,6 mm x 250 mm, 5 μ m) de Waters Co. (Milford, MA, EE. UU.). Como disolvente A se utilizó TFA en agua bidestilada (0,1 %, v/v) y como disolvente B TFA (0,085 %, v/v) en acetonitrilo ACN:dH₂O (60:40, v/v). Ambas fases móviles A y B se filtraron a través de un filtro de membrana de nailon de 4 mm y se desgasificaron antes de cualquier análisis.

Los péptidos se eluyeron primero con 100 % de disolvente A durante 2 min, seguido de un gradiente lineal de 0 a 50 % de disolvente B durante 50 min a un caudal de 1 mL/min. La separación se controló a una longitud de onda de 214 nm.

Para fraccionar las muestras se empleó un colector de fracciones (2110 Fraction Collector Instruction - Bio-Rad) el cual recogía las fracciones cada 2 minutos, por lo que se recolectaron un total de 26 fracciones de 2 mL (1mL/ min).

Tabla 1. Codificación de las muestras según tipo de legumbre, tratamiento y fase de la digestión.

	SB (SOJA)		
	b (ANTES DE LA DIGESTIÓN)	g (FASE GÁSTRICA)	i (FASE INTESTINAL)
C (CONVENCIONAL)	SBCb	SBCg	SBCi
P (PRESIÓN)	SBPb	SBPg	SBPi
M (MICROONDAS)	SBMb	SBMg	SBMi
	GP (GUISANTE)		
	b (ANTES DE LA DIGESTIÓN)	g (FASE GÁSTRICA)	i (FASE INTESTINAL)
C (CONVENCIONAL)	GPCb	GPCg	GPCi
P (PRESIÓN)	GPPb	GPPg	GPPi
M (MICROONDAS)	GPMb	GPMg	GPMi
	CP (GARBANZO)		
	b (ANTES DE LA DIGESTIÓN)	g (FASE GÁSTRICA)	i (FASE INTESTINAL)
C (CONVENCIONAL)	CPCb	CPCg	CPCi
P (PRESIÓN)	CPPb	CPPg	CPPi
M (MICROONDAS)	CPMb	CPMg	CPMi
	NB (ALUBIA)		
	b (ANTES DE LA DIGESTIÓN)	g (FASE GÁSTRICA)	i (FASE INTESTINAL)
C (CONVENCIONAL)	NBCb	NBCg	NBCi
P (PRESIÓN)	NBPb	NBPg	NBPi
M (MICROONDAS)	NBMb	NBMg	NBMi

3.5 Análisis de inhibición de la enzima α -glucosidasa

Para preparar las muestras para el análisis de inhibición de la α -glucosidasa, se liofilizaron las fracciones obtenidas por RP-HPLC en un liofilizador Coolsafe de Labogene (Lillerød, Dinamarca) y se resuspendieron en 200 μ L de fosfato de sodio (0,1 M, pH 6,8).

El análisis de inhibición se realizó en placa y se añadieron 50 μ L de muestra y 25 μ L de la enzima α -glucosidasa a una concentración de 0.5 U/mL en tampón fosfato de sodio (0,1 M, pH 6,8), se incubó 5 minutos a 25 °C y tras la incubación se añadieron 25 μ L de una disolución de p-nitrophenyl- α -Dglucopyranoside(p-NPG) 1,25 mM en tampón fosfato de sodio (0.1 M, pH 6.8). La mezcla se incubó 20 min a 37 °C y se midió la absorbancia a 405 nm en un lector de microplacas CLARIOstar Plus de BMG Labtech (Ortenberg, Alemania).

Las lecturas de las muestras se realizaron por triplicado y se utilizó como control positivo (CP) acarbosa 5 mg/mL y como control negativo (CN), tampón fosfato de sodio (0.1 M, pH 6.8).

El porcentaje de inhibición de las muestras se calculó mediante la ecuación 1:

$$\% \text{ Inhibición} = ((\text{Abs CN} - \text{Abs muestra}) / (\text{Abs CN})) * 100 \quad (1)$$

3.6 Identificación de péptidos por LC-MS/MS

Con el objetivo de identificar los péptidos presentes en las legumbres cocidas y digeridas, las fracciones con mayor actividad inhibidora de la α -glucosidasa tras la separación por RP-HPLC se analizaron con un espectrómetro de masas con ionización por nanoelectrospray (nanoESI) acoplada a un cuadrupolo-tiempo de vuelo (qTOF) TripleTOF® 5600+ (AB Sciex Instruments, MA, USA).

Para el análisis, las muestras se concentraron 5 veces y se inyectaron 5 μ L de cada muestra en una precolumna NanoLC C18-CL, 3 μ m 350 μ m x 0,5 mm (Eksigent) a un flujo de 3 μ L/min durante 5 minutos con 0,1 % de TFA como fase móvil. A continuación, los péptidos se inyectaron en una columna analítica (LC Column, C18-CL 3 μ m, 75 μ m x 12 cm, Nikkyo) equilibrada con 0,1 % de ácido fórmico y ACN (95:5, v/v). La elución se llevó a cabo con un gradiente lineal de 5 a 35 % de B en A durante 60 minutos (siendo la fase A 0,1% de TFA y la fase B ACN con 0,1% de TFA) con un flujo de 300 nL/min. Finalmente, la muestra se ionizó aplicando 2,8 kV en el electrospray. El análisis se realizó en modo dependiente de datos (DAD). Los escáneres Survey MS1 se realizaron de 350 a 1250 m/z para 250 milisegundos. La resolución del cuadrupolo se estableció en 'UNIT' para los experimentos MS2, los cuales se realizaron de 100 a 1500 m/z para 50 milisegundos en el modo de 'alta sensibilidad'. Se hizo uso de los siguientes criterios: carga de +1 a +5; intensidad mínima; 70 cuentas por segundo. Para la fragmentación después de cada scan se seleccionaron hasta 25 iones. La exclusión dinámica se estableció en 15 segundos. La sensibilidad del sistema se controló con 2 fmol de 6 proteínas (LC Packings).

Para el tratamiento de los resultados se utilizaron los parámetros por defecto de ProteinPilot v 4.5. y MascotDistiller v 2.7.1. La lista de picos se generó directamente de los archivos wiff del equipo de TripleTOF. El motor de búsqueda MASCOT v 2.6. se utilizó también con la base de datos UniProt.

Todas las bases de datos se consultaron sin especificidad de enzima.

3.7 Análisis *in-silico* de los péptidos identificados mediante espectrometría de masas

Para la caracterización de los péptidos obtenidos se emplearon distintas herramientas bioinformáticas. PeptideRanker (<http://distilldeep.ucd.ie/PeptideRanker/>), que da un ratio de 0 a 1 (PRR) e indica la probabilidad de que los péptidos sean bioactivos. Aquellos con un PRR superior a 0,5 se analizaron con los siguientes softwares. AllergenFP v1.0 (<http://ddg-pharmfac.net/AllergenFP/>) para predecir la alergenidad. CPPpre (<https://distilldeep.ucd.ie/CppPred/>) para evaluar la probabilidad de los péptidos de atravesar las células intestinales y ser absorbidos. Y, por último, ToxinPred (http://crdd.osdd.net/raghava/toxinpred/multi_submit.php) que predice la toxicidad y las propiedades fisicoquímicas como la hidrofobicidad, hidrofiliidad, impedimento estérico y anfipaticidad.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

4.1 Comparación de los cromatogramas obtenidos tras el análisis por HPLC.

Las figuras 1, 2, 3 y 4, presentan los cromatogramas obtenidos antes de la digestión y tras las fases de digestión (gástrica e intestinal) de las muestras de soja (figura 1), guisante (figura 2), garbanzo (figura 3) y alubia (figura 4), en función del tratamiento de cocción empleado (convencional, presión y microondas).

Con el objetivo de saber si las diferentes fases de digestión tienen relevancia a la hora de obtener péptidos se realizó una comparación con los cromatogramas de las muestras obtenidas. Para poder establecer las diferencias entre las distintas fases se compararon las diferentes legumbres y los tratamientos realizados. Para la separación de los péptidos se utilizó un HPLC de fase inversa donde se empleó una fase estacionaria apolar y una fase móvil de polaridad moderada. Por ello, los péptidos eluyeron en el cromatograma según su polaridad, obteniendo al principio los más polares y al final los más apolares.

Al comparar los cromatogramas, en las figuras 1, 2, 3 y 4, se observa un patrón que se repite en todas las legumbres y en todos los métodos de cocción. La absorbancia a 214 nm de las muestras antes de la digestión y después de la fase gástrica es significativamente más baja que la obtenida tras la digestión gastrointestinal. Así pues, las muestras de la fase gástrica+intestinal presentan un perfil con picos importantes en los minutos 2, 10, 15 y 23 que nos indican que hay mayor cantidad de determinados péptidos. La generación de péptidos tras la digestión intestinal se observa en diferentes alimentos como en la carne de vacuno, donde tras esta fase se produce una hidrólisis proteica y el perfil peptídico aumenta, efecto que se encuentra muy influenciado por el proceso de cocción y los tratamientos a los que se somete la carne (Yin et al., 2011).

Especialmente en las muestras de soja (figura 1), y para todos los tratamientos ensayados, hay una mayor concentración de péptidos en la fase gástrica entre los minutos 15 y 35 del cromatograma, siendo estos péptidos de características principalmente apolares, ya que eluyen a una concentración de fase móvil alta en acetonitrilo. Sin embargo, tras la digestión intestinal, la intensidad de los picos polares aumenta, posiblemente debido a la acción de las enzimas gástricas e intestinales, que han hidrolizado la fracción proteica de las muestras haciéndola más hidrosoluble. En las muestras de garbanzo (figura 3) también podemos ver esta mayor concentración en los péptidos en la fase gástrica, pero con una menor intensidad. En el caso del guisante y la alubia (figuras 2 y 4) el perfil de péptidos observado en la fase gástrica no es significativo.

Respecto al perfil de péptidos observado antes de la digestión, solo se puede resaltar una absorbancia a 214 nm de más de 200 mAU en las muestras de guisante y garbanzo (figuras 2 y 3) con los tratamientos de cocción convencional y cocción a presión, pero esta absorbancia sigue siendo muy baja comparada con los picos que presentan las otras muestras en los que se emplea la fase intestinal.

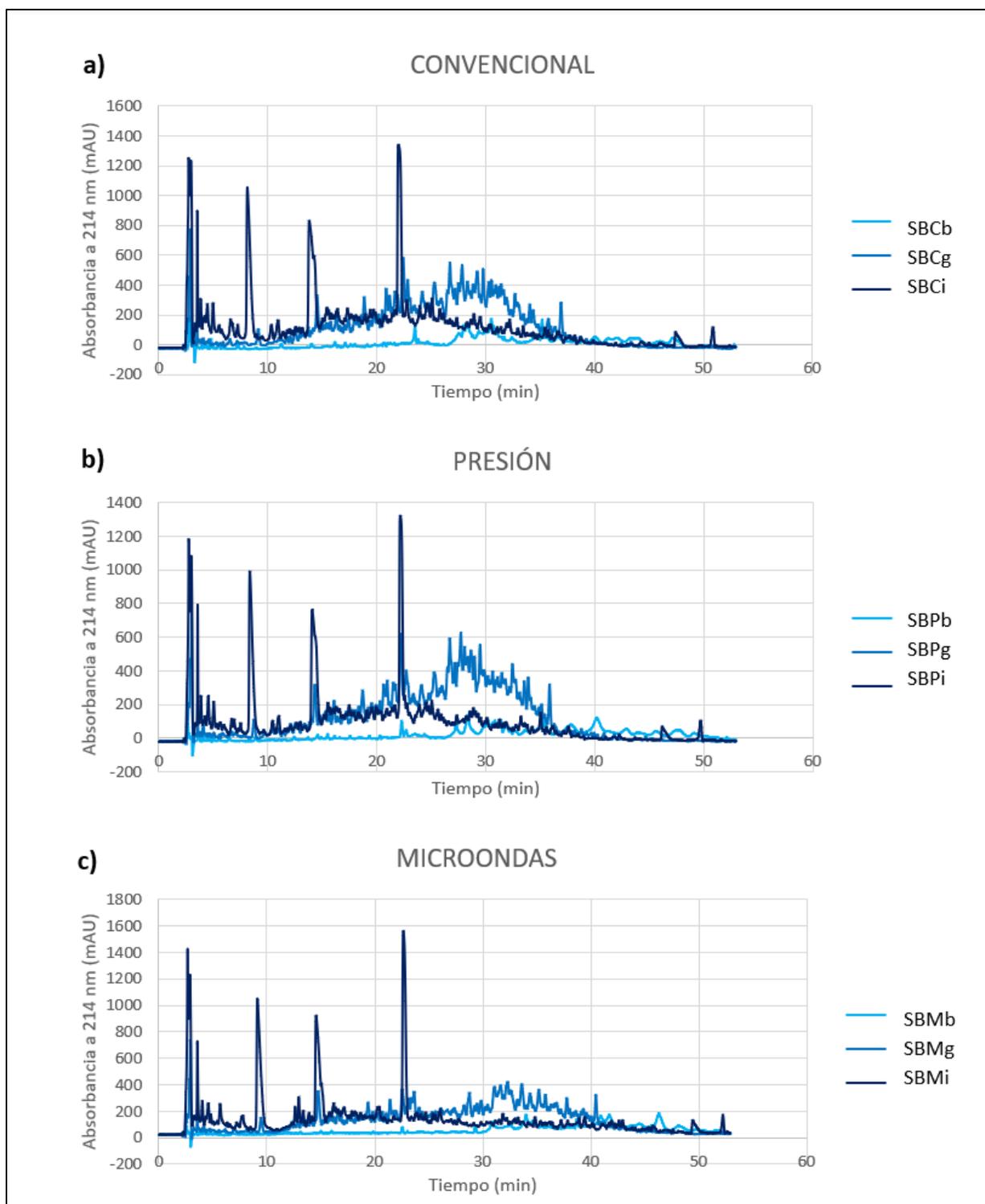


Figura 1. Cromatogramas de las diferentes fases de digestión de las muestras de soja en función del tratamiento de cocción empleado: convencional (a), presión (b) y microondas (c). SB: soja; C: cocción convencional; P: cocción a presión; M: cocción en microondas; b: antes de la digestión; g: tras digestión gástrica; i: tras digestión intestinal.

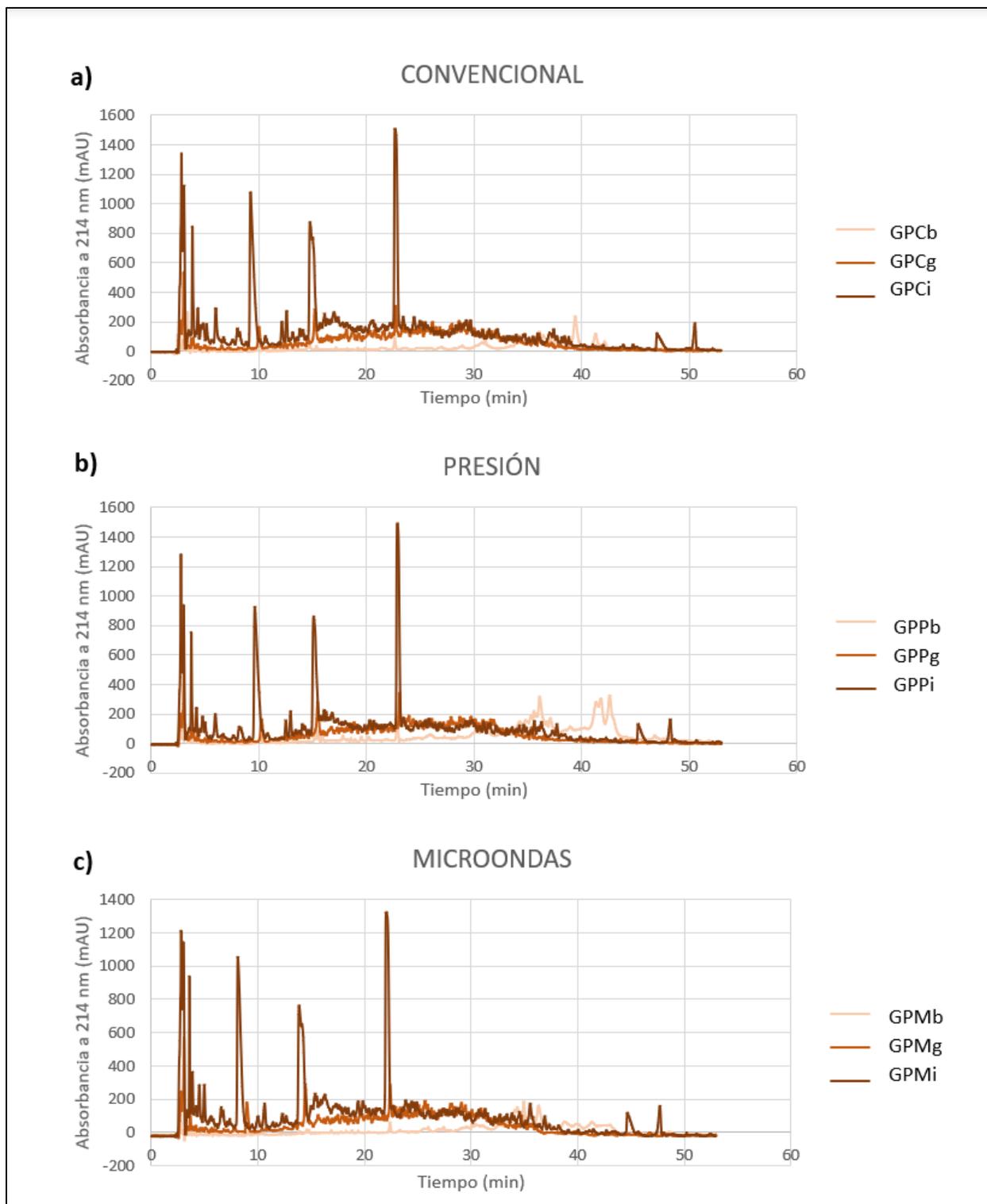


Figura 2. Cromatogramas de las diferentes fases de la digestión de las muestras de guisante en función del tratamiento de cocción empleado: convencional (a), presión (b) y microondas (c). GP: guisante; C: cocción convencional; P: cocción a presión; M: cocción en microondas; b: antes de la digestión; g: tras digestión gástrica; i: tras digestión intestinal.

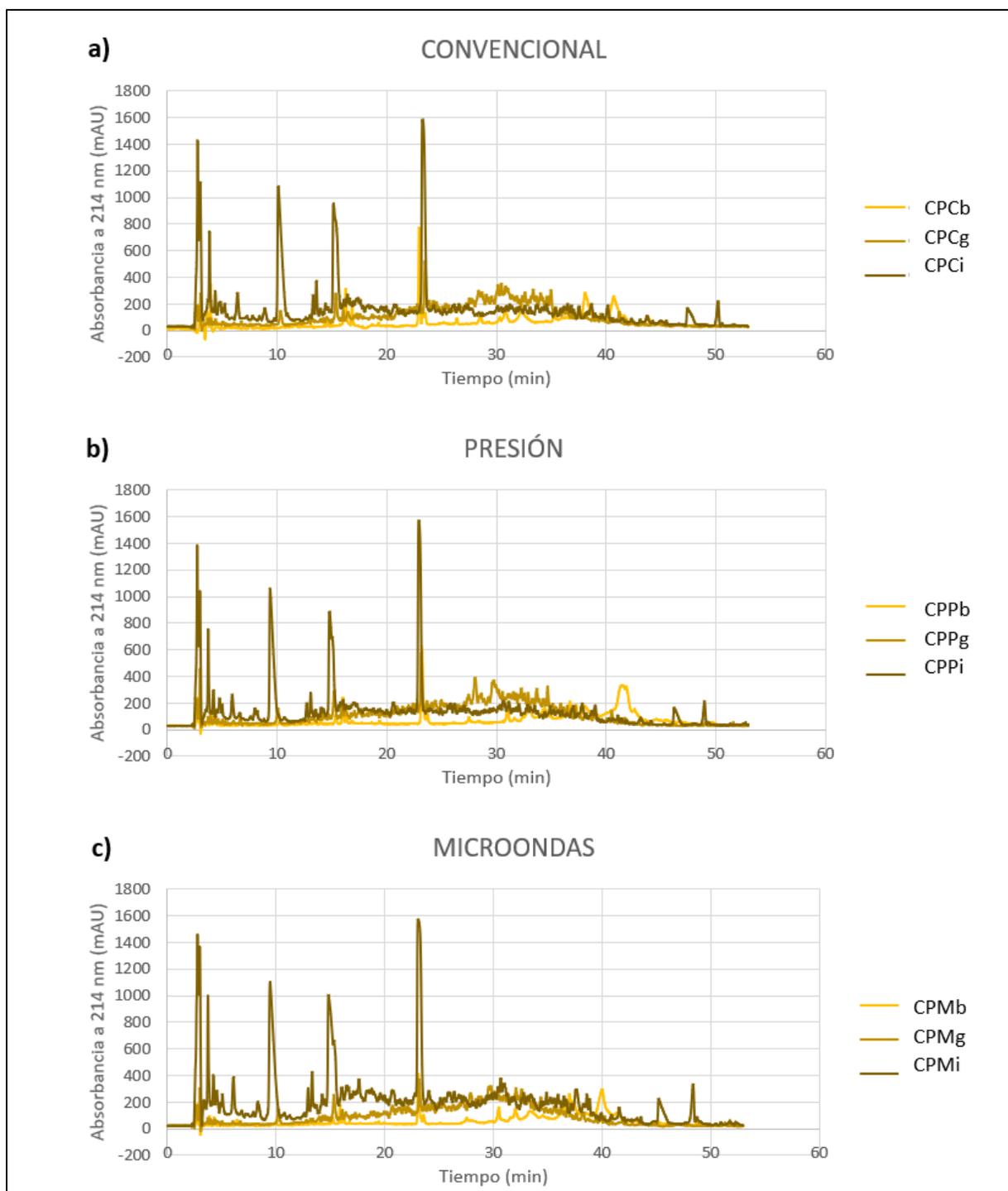


Figura 3. Cromatogramas de las diferentes fases de la digestión de las muestras de garbanzo en función del tratamiento de cocción empleado: convencional (a), presión (b) y microondas (c). CP: garbanzo; C: cocción convencional; P: cocción a presión; M: cocción en microondas; b: antes de la digestión; g: tras digestión gástrica; i: tras digestión intestinal.

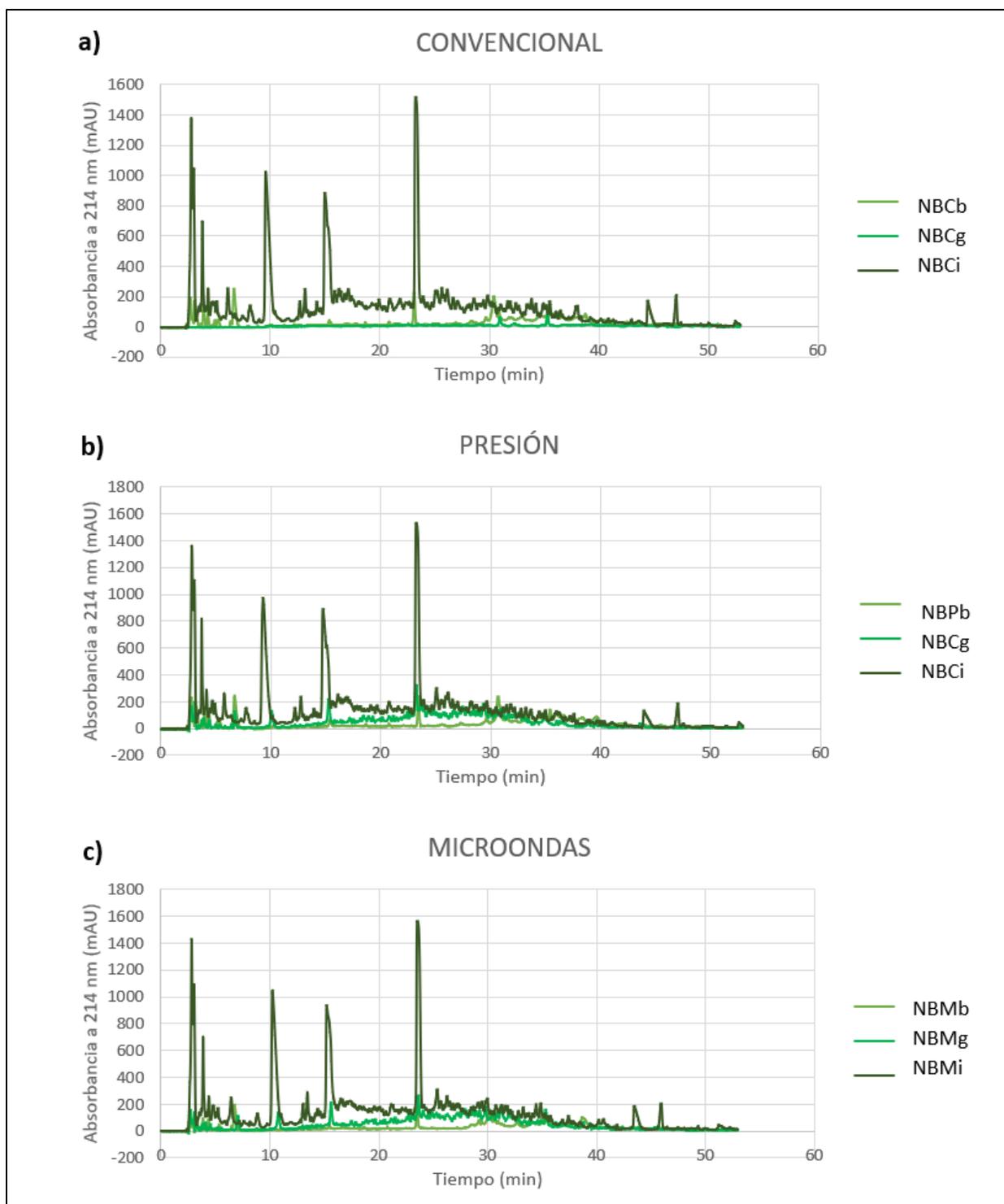


Figura 4. Cromatogramas de las diferentes fases de la digestión de las muestras de alubias en función del tratamiento de cocción empleado: convencional (a), presión (b) y microondas (c). NB: alubia; C: cocción convencional; P: cocción a presión; M: cocción en microondas; b: antes de la digestión; g: tras digestión gástrica; i: tras digestión intestinal.

Las fases intestinales son las más interesantes de analizar por espectrometría de masas ya que en esa fase es donde más cantidad de péptidos se generan. Las macromoléculas se degradan a moléculas más pequeñas que pueden ser luego absorbidas por el organismo o actuar simultáneamente durante la digestión (Vilcacundo, 2017).

En la figura 5 se muestra una comparación de las diferentes fases intestinales de cada legumbre donde se puede ver como en todos los tratamientos aplicados aparecen los 4 picos comentados anteriormente de mayor intensidad.

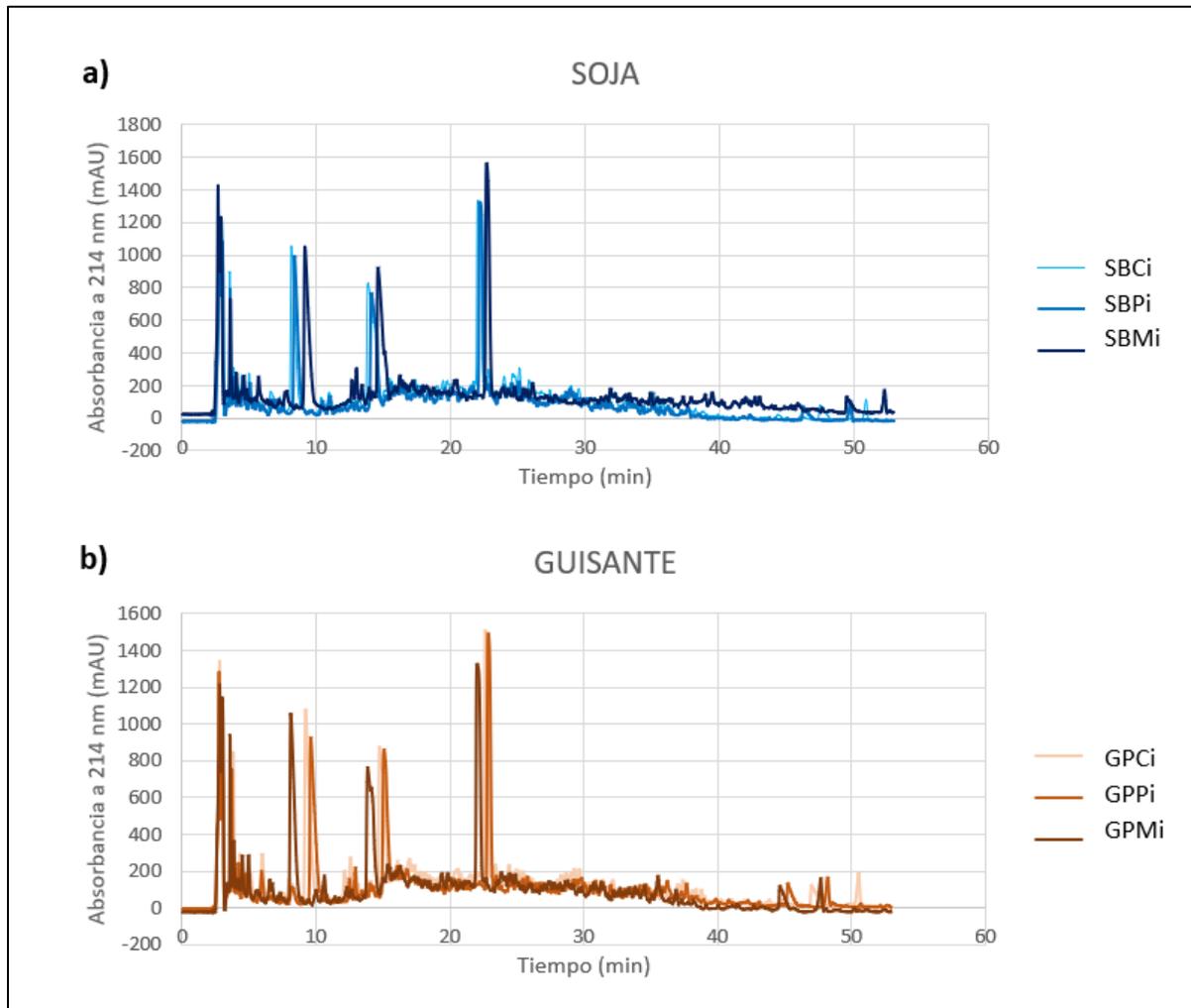


Figura 5. Cromatogramas de las muestras cocidas y digeridas tras la fase intestinal en función de la legumbre empleada: soja (a), guisante (b), garbanzo (c) y alubia (d).

SB: soja; GP: guisante; CP: garbanzo; NB: alubia; C: cocción convencional; P: cocción a presión; M: cocción en microondas; i: tras digestión intestinal.

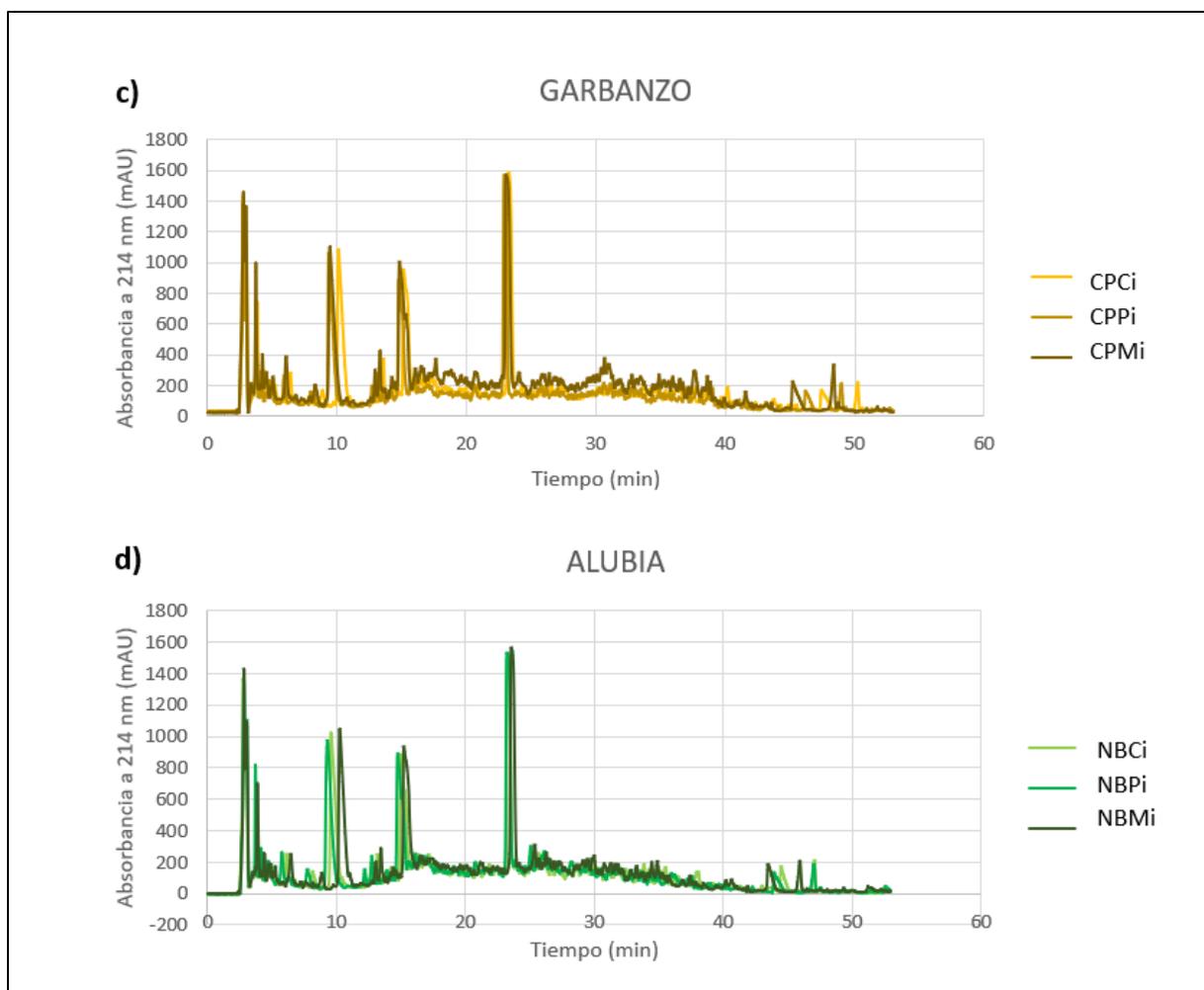


Figura 5 (continuación). Cromatogramas de las muestras cocidas y digeridas tras la fase intestinal en función de la legumbre empleada: soja (a), guisante (b), garbanzo (c) y alubia (d). SB: soja; GP: guisante; CP: garbanzo; NB: alubia; C: cocción convencional; P: cocción a presión; M: cocción en microondas; i: tras digestión intestinal.

Los 4 picos que presentan los cromatogramas de las muestras tras la digestión intestinal se encuentran en la primera mitad de la gráfica por lo que serán péptidos polares.

En la figura 5 se observa que en la soja con tratamiento en microondas aparecen picos de mayor tamaño que con los tratamientos de cocción convencional y cocción a presión. Sin embargo, estas diferencias no son tan notables en el caso del resto de legumbres. En el caso del guisante, las principales diferencias se observan en el tratamiento en microondas donde los últimos picos presentan menor intensidad. También hay un desplazamiento y menor intensidad en el tratamiento a presión en el pico 2. Por último, en el garbanzo y la alubia, los picos se mantienen con la misma intensidad en los 3 tratamientos térmicos y no parece haber diferencias entre ninguno de los 4 picos.

Tras la separación cromatográfica, se determinó la actividad inhibidora de la enzima α -glucosidasa de las muestras a las que se le realizó la fase intestinal. Se fraccionaron las muestras

según la polaridad que presentaban, colectando 26 fracciones de cada muestra. Además de por la cantidad de péptidos generados, hay evidencia de que, tras la fase intestinal de algunas legumbres como la soja, se generan una gran cantidad de péptidos con potencial bioactivo (Capriotti et al. 2015).

La absorbancia obtenida en las diferentes fracciones del cromatograma no necesariamente ha de ir correlacionada con la actividad biológica. Es posible que péptidos minoritarios sean más activos que otros que se encuentran en mayores cantidades, ya que la actividad biológica dependerá del contenido en aminoácidos, estructura, y características fisicoquímicas (Pihlanto y Korhonen, 2003).

4.2 Actividad inhibidora de la enzima α -glucosidasa de las distintas fracciones

Las figuras 6, 7, 8 y 9 presentan los cromatogramas de las muestras de legumbres en las que se ha aplicado la fase de digestión intestinal en función del tratamiento de cocción empleado (convencional, presión y microondas) y el porcentaje de actividad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa. Para todas las legumbres, la fracción 2 del cromatograma, que se corresponde a los minutos 2 y 3 de elución, es la que presenta un mayor porcentaje de actividad inhibitoria de la enzima. El resto de las fracciones analizadas han dado porcentajes de inhibición por debajo de 20 %. A pesar de tener tres picos con un contenido de péptidos importante, estos no tienen un efecto de inhibición significativo sobre la enzima α -glucosidasa.

El pico que se encuentra en la fracción 2 corresponde con la fracción más polar de la muestra, ya que eluye al principio del cromatograma, indicando que la mayor actividad biológica se encuentra en los péptidos más hidrofílicos. Los valores de porcentaje de inhibición de la enzima α -glucosidasa de la fracción 2 se muestran en la tabla 2.

La polaridad de un péptido afecta a su actividad biológica, ya que afecta en su capacidad para interactuar con otros compuestos cargados, como los receptores de membrana, las enzimas o las moléculas de señalización. Sin embargo, la polaridad no es el único factor que determina la actividad biológica de un péptido. Otros aspectos como la secuencia de aminoácidos, la estructura secundaria, la estabilidad y la especificidad de interacción, también son esenciales para determinar su actividad biológica. La relación entre la polaridad y la actividad biológica de un péptido específico dependerá de su contexto y función biológica particular. Todos los péptidos con posible actividad antidiabética encontrados en las muestras analizadas son hidrofílicos.

Todas las muestras analizadas tienen altos porcentajes de inhibición en la fracción 2 correspondiente a los minutos 2 y 3 del cromatograma. La muestra con mayor porcentaje de inhibición en la fracción 2 es el guisante tratado con cocción convencional con un 62,73 % de inhibición. También se observa como la alubia tratada con cocción convencional se encuentra prácticamente en el mismo valor de inhibición de 62,58 %.

La muestra con el menor porcentaje de inhibición en el min 2-3 es el guisante con tratamiento en microondas (36.95 %), la cual destaca sobre las otras ya que todas sobrepasan el 43 % de inhibición.

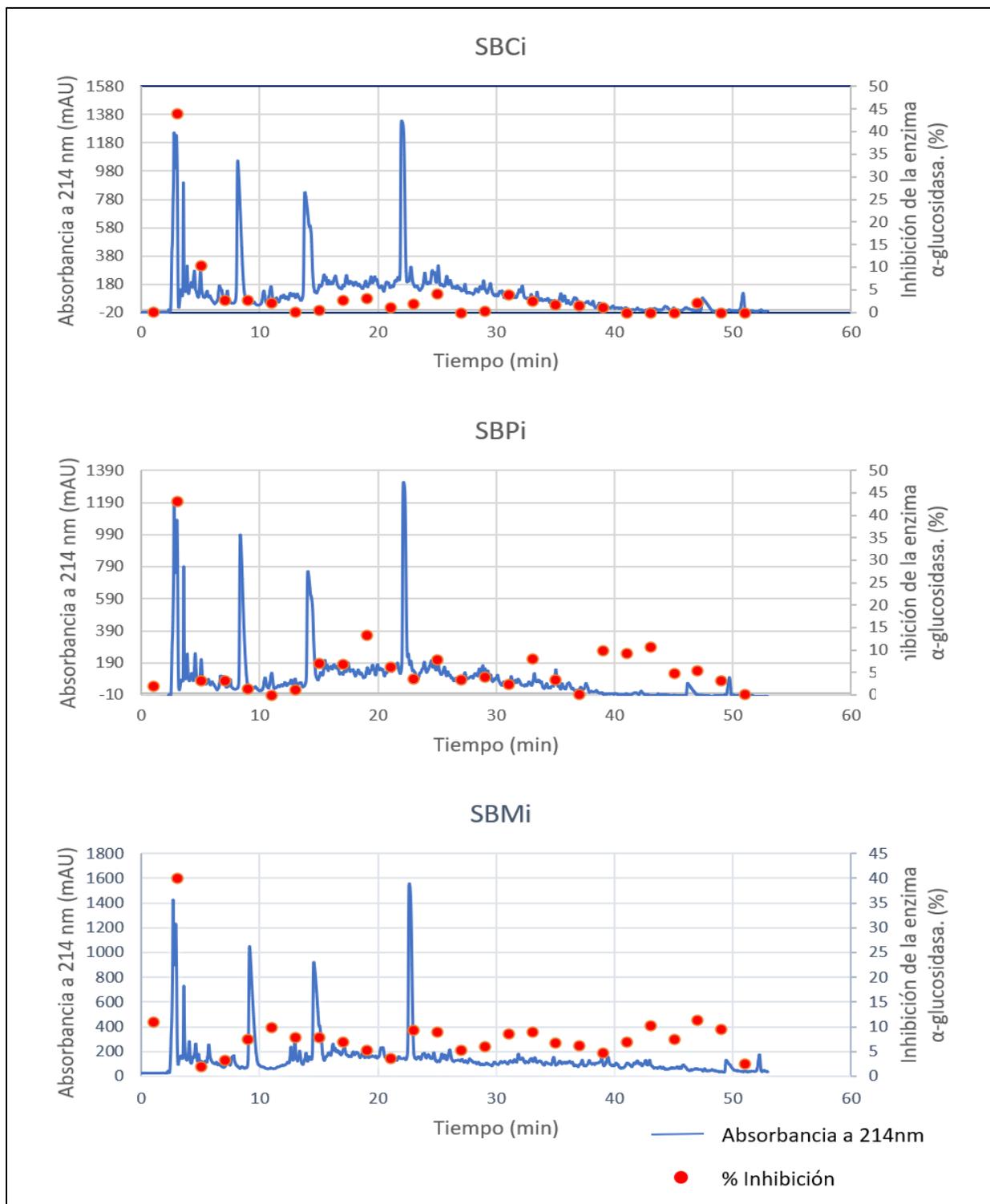


Figura 6. Cromatograma de las muestras de soja en las que se ha aplicado la fase de digestión intestinal en función del tratamiento de cocción empleado: convencional (a), presión (b) y microondas (c) y porcentaje de actividad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa.

SB: soja; C: cocción convencional; P: cocción a presión; M: cocción en microondas; i: tras digestión intestinal.

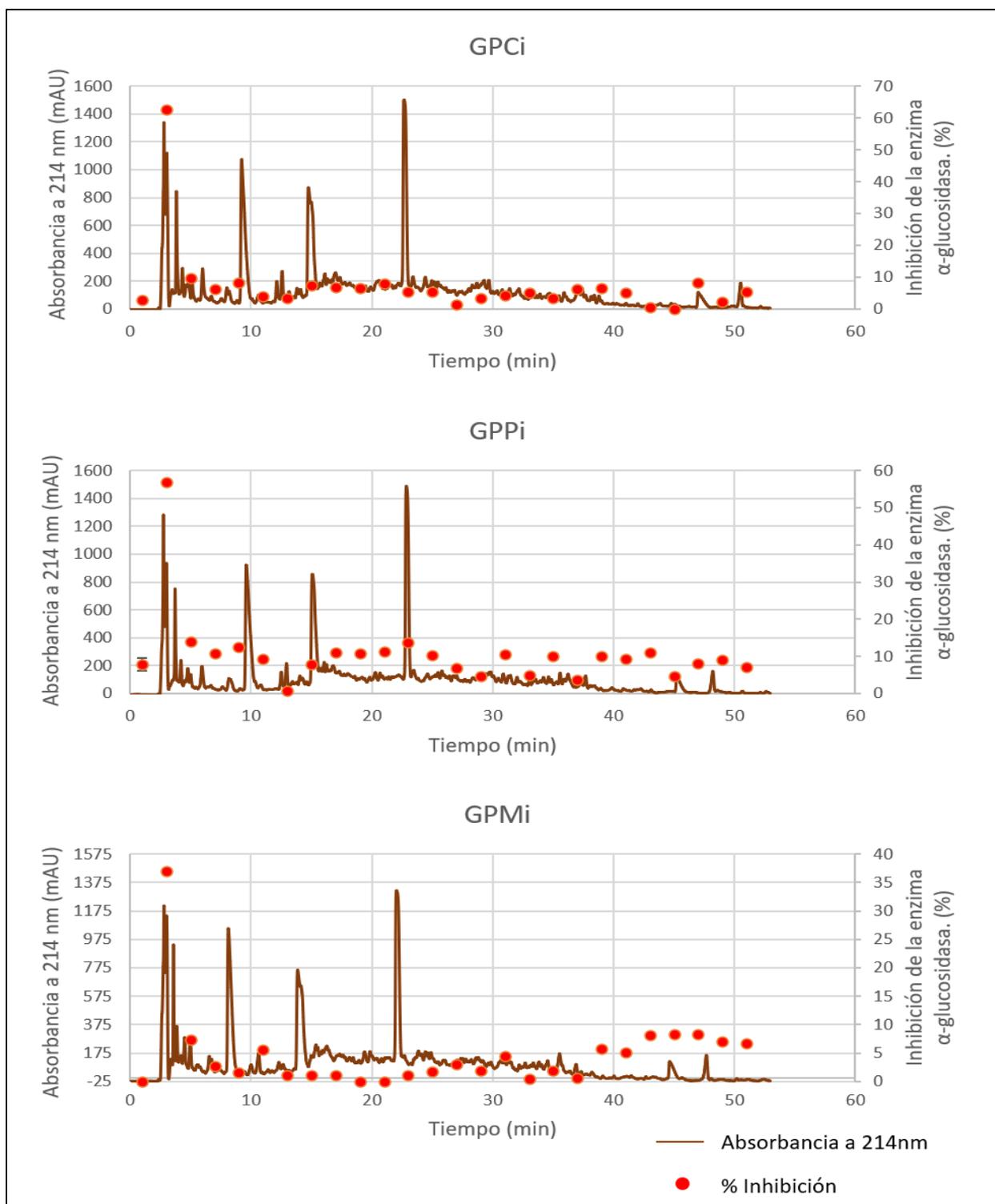


Figura 7. Cromatograma de las muestras de guisante en las que se ha aplicado la fase de digestión intestinal en función del tratamiento de cocción empleado: convencional (a), presión (b) y microondas (c) y porcentaje de actividad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa. GP: guisante; C: cocción convencional; P: cocción a presión; M: cocción en microondas; i: tras digestión intestinal.

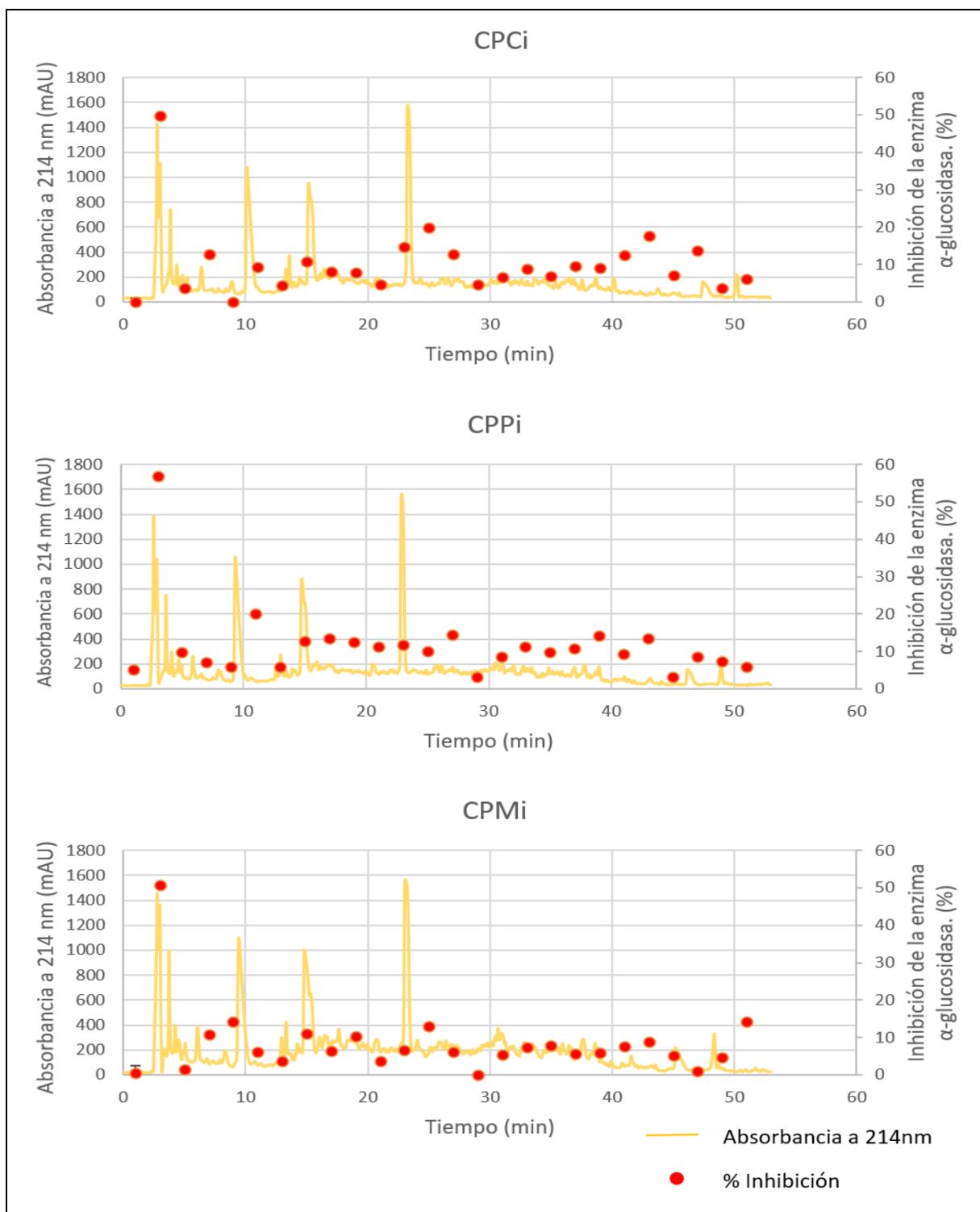


Figura 8. Cromatograma de las muestras de garbanzo en las que se ha aplicado la fase de digestión intestinal en función del tratamiento de cocción empleado: convencional (a), presión (b) y microondas (c) y porcentaje de actividad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa. CP: garbanzo; C: cocción convencional; P: cocción a presión; M: cocción en microondas; i: tras digestión intestinal.

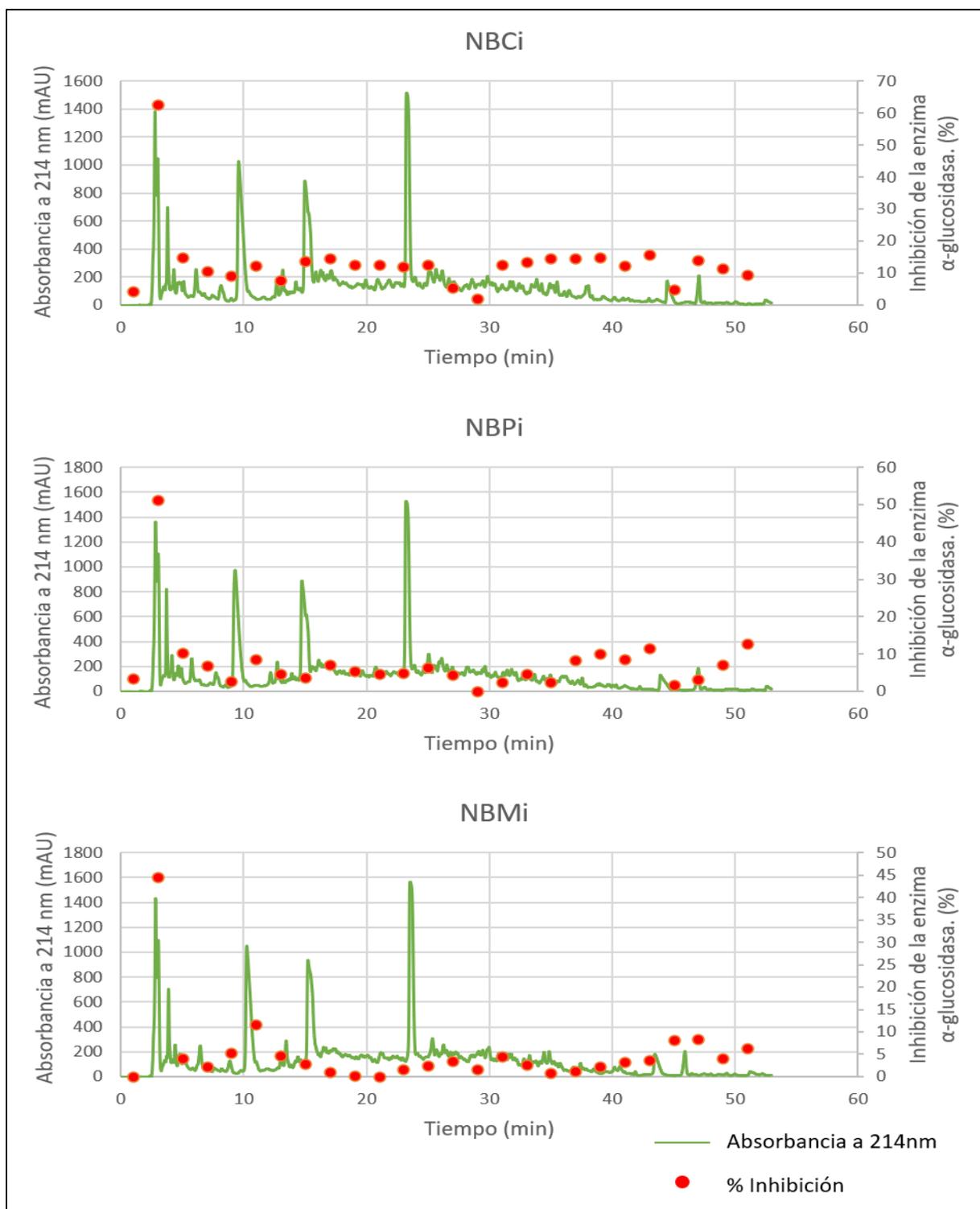


Figura 9. Cromatograma de las muestras de alubia en las que se ha aplicado la fase de digestión intestinal en función del tratamiento de cocción empleado: convencional (a), presión (b) y microondas (c) y porcentaje de actividad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa.

NB: alubia; C: cocción convencional; P: cocción a presión; M: cocción en microondas; i: tras digestión intestinal.

Tabla 2. Resultados de inhibición de la enzima α -glucosidasa en porcentaje obtenido en la fracción de péptidos colectada entre el min 2-3 de la extracción (denominada en el texto como fracción 2).

Muestra	% Inhibición
SBCi	43,98
SBPi	43,24
SBMi	40,1
GPCi	62,73
GPPi	56,89
GPMi	36,95
CPCi	49,82
CPPi	57
CPMi	50,79
NBCi	62,58
NBPi	51,16
NBMi	44,45

SB: soja; GP: guisante; CP: garbanzo; NB: alubia; C: cocción convencional; P: cocción a presión; M: cocción en microondas; i: tras digestión intestinal.

Las muestras de soja, guisante y alubia siguen un patrón en las que dentro de una misma legumbre la muestra con mayor porcentaje de inhibición es la muestra con cocción convencional, seguido por el tratamiento a presión y por último el tratamiento en microondas. Este no es el caso del garbanzo, donde la muestra con mayor porcentaje de inhibición es la tratada a presión seguida por la cocida en microondas, y por último la cocida de forma convencional.

Con el fin de determinar e identificar los péptidos potencialmente responsables de la actividad inhibidora de la enzima α -glucosidasa, se analizaron las fracciones 2 de las muestras por espectrometría de masas y se estudiaron las secuencias obtenidas mediante metodologías *in silico*.

Para la espectrometría de masas se seleccionó una muestra de cada legumbre y fueron las tratadas con cocción convencional las elegidas ya que tenían los mejores valores de inhibición en la mayoría de las muestras.

4.3 Identificación de los péptidos y análisis *in silico*

En la tabla 3 se observan los péptidos identificados por espectrometría de masas en la fracción 2 de la separación por HPLC de las muestras de legumbres tratadas por cocción convencional y fase de digestión intestinal. La tabla incluye el código de acceso en la base de datos de proteínas UniProt (prot_acc), el valor de masa/carga del péptido identificado (m/z)(pep_mz), la masa molecular calculada a partir del valor experimental m/z (pep_mr), la carga del péptido observada z (pep_z), y la masa molecular calculada a partir de la secuencia peptídica (calc_mr).

El 'pep_score' nos indica los péptidos identificados que presentan una mayor confianza. Este valor está relacionado con el peptide-spectrum match (PSM), probabilidad de que la coincidencia haya ocurrido por casualidad. Cuanto más alto sea el pep-score, más evidencia de que la coincidencia no ocurrió por casualidad. Los péptidos que se observan en la tabla son aquellos con un valor superior a 25. La secuencia peptídica se indica en código de letras. Cada letra representa los aminoácidos presentes en el péptido. La 'var_mod' indica las modificaciones postraduccionales (MPTs) observadas en determinados aminoácidos del péptido. La oxidación es la principal MPT observada. En la mayoría de los casos se ha oxidado la metionina, seguidos del triptófano y la histidina.

En la tabla 4 se muestran los resultados obtenidos tras estudiar *in silico* las secuencias identificadas incluyendo únicamente aquellas con un PRR superior a 0,5. En las 4 muestras de legumbres que se analizaron se han encontrado péptidos con un valor superior al umbral de 0,5. Se encontraron 4 péptidos en las muestras de soja y 3 en las muestras de guisante, garbanzo y alubia con un tamaño entre 7 y 22 aminoácidos. Destacando GSVGFMKVNLSALAMCLIAGPR de la muestra de garbanzo y PRASGFIDVADGCC de la muestra de alubia en los cuales podemos ver un valor superior a 0,8, lo cual nos indica una alta probabilidad de bioactividad.

En la siguiente columna de la tabla 4 se muestra la predicción de alergenicidad de los péptidos, de la cual destacan los tres péptidos del guisante con posibilidad de ser alergénicos en personas sensibles. Este dato es interesante cuando el objetivo es la obtención de péptidos naturales para utilizarlos como bioactivos en alimentos funcionales o similares, ya que se requeriría un estudio en mayor profundidad de estos potenciales alergénicos antes de poder incorporarlos. En el caso de las otras legumbres también encontramos QACLLPT en el caso de la soja y PRMYPVN en el garbanzo con esta predicción de alergenicidad.

El CPP nos indica la probabilidad de que el péptido pase a través de la membrana celular, y se calcula con la herramienta web CPPpred. Los valores, que van de 0 a 1, indican la probabilidad de que el péptido penetre en la célula y predice el grado de eficiencia de absorción. Cualquier péptido con un valor de CPP superior a 0,5 se considera que tiene una alta probabilidad de poder pasar a través de la membrana celular. Los valores obtenidos en todos los casos han sido menores a 0,5 lo cual nos indica una baja probabilidad de penetración a través de la membrana celular. Sin embargo, esta propiedad adquiere una mayor importancia en péptidos con potencial actividad antimicrobiana, ya que en ese caso sí sería esencial que fuesen capaces de entrar en la célula microbiana para poder ejercer su función. En el caso de péptidos con potencial antidiabético, concretamente en los inhibidores de la enzima α -glucosidasa, esta característica tiene una menor importancia, ya que los péptidos deberían ejercer su función en el propio tracto gastrointestinal.

Los valores teóricos calculados de impedimento estérico y tamaño lateral son valores relacionados directamente con las propiedades de anfipaticidad de los péptidos. Los péptidos anfipáticos poseen un extremo hidrofílico, y otro que es hidrófobo, permitiendo la formación de micelas, lo cual les confiere buenas propiedades para ser utilizados como bioactivos. Los scores deberían ser superiores a 0,5 para conferir al péptido unas buenas características de anfipaticidad, lo cual se confirma en todos los péptidos identificados.

Los valores de hidrofobicidad e hidrofiliidad obtenidos en los péptidos de mayor PRR se corresponden con péptidos polares, lo cual coincide con los valores más altos de actividad biológica detectados en la Fracción 2 del cromatograma (Figuras 6, 7, 8 y 9) ya que los valores

de hidrofiliidad son altos y los de hidrofobicidad están cerca de 0. La estructura, la carga general y la hidrofobicidad/hidrofiliidad de cualquier péptido bioactivo dependen de la naturaleza de los aminoácidos y sus secuencias en el esqueleto del péptido junto con los terminales N y C. La relación entre la estructura y la actividad biológica de los péptidos bioactivos aún no está confirmada, pero es un factor importante en su actividad (Li y Yu 2015). Los péptidos obtenidos de las semillas de *Cannabis sativa* L. (cáñamo) contienen aminoácidos hidrofóbicos (Pro y Leu), aminoácidos esenciales y aminoácidos de cadena ramificada en su estructura y se ha reportado que tienen actividad inhibidora de la α -glucosidasa (Ren et al. 2016). La mayoría de los péptidos obtenidos se han identificado como no tóxicos.

Tabla 3. Péptidos identificados por espectrometrías de masas en la fracción 2 tras la separación por HPLC.

Muestra	^a prot_acc	^b pep_mz	^c pep_mr	^d pep_z	^e calc_mr	^f pep_score	Secuencia peptídica	^g var_mod
SBCi	ANM15_ARATH	373,20	744,40	2	744,38	55,09	QACLLPT	
SBCi	BCAL2_ARATH	627,30	1878,87	3	1878,89	41,61	FPLMHYDLLEQCLPL	Oxidation (HW)
SBCi	ARFV_ORYSJ	396,84	1187,50	3	1187,49	40,73	HACAGGMVQMPA	Oxidation (M)
SBCi	PSA2_ORYSI	571,78	1141,54	2	1141,50	40,72	ETAAVMQEFT	Oxidation (M)
SBCi	MRS25_ARATH	677,21	2028,61	3	2028,75	39,03	MDDDDDMAEMYLTEKK	Oxidation (M)
SBCi	CFA46_CHLRE	400,15	798,29	2	798,34	35,63	PPAGAEED	
SBCi	CIPKL_ORYSJ	400,22	798,42	2	798,48	33,79	GRVAIRQ	
SBCi	FB55_ARATH	480,30	1437,87	3	1437,73	33,28	SMVLSPKRHKHC	Oxidation (M)
SBCi	CML20_ARATH	289,15	864,42	3	864,36	32,92	MVEEADR	Oxidation (M)
SBCi	LAC15_ARATH	475,31	1422,91	3	1422,80	32	SQFPGPIIKVHKG	Oxidation (HW)
SBCi	Y1054_ORYSJ	367,16	732,30	2	732,31	31,57	VPATECN	
SBCi	CP29A_ARATH	426,23	1275,66	3	1275,59	31,53	RGFGFVTMSTAA	Dioxidation (M)
SBCi	NDRP1_ARATH	263,61	525,21	2	525,23	29,76	HGGGAGA	
SBCi	EIN4_ARATH	485,27	968,53	2	968,47	29,23	PKSHGQTQS	
SBCi	CDP1_ARATH	385,23	768,44	2	768,41	28,7	GLPRTPE	
SBCi	SPL6_ORYSJ	853,86	2558,56	3	2558,43	28,68	HLGKGHVVLGVPSIHPVITDGVKP	Oxidation (HW)
SBCi	C82A2_SOYBN	721,44	1440,87	2	1440,74	27,83	EFLSPSRVEQLH	
SBCi	TAF1_ORYSJ	713,36	1424,70	2	1424,61	27,76	HMEVFSPGTKNM	Oxidation (M)
SBCi	WRK68_ARATH	343,19	684,37	2	684,33	27,24	GSASRAH	
SBCi	PRL1_ARATH	511,23	1020,45	2	1020,50	26,7	PANVSSYQR	
SBCi	AMT22_ORYSJ	250,15	747,42	3	747,36	26,61	SGGYVIH	Oxidation (HW)
SBCi	COMT1_CLABR	444,23	1329,67	3	1329,65	26,28	KNCYAALPEHGK	
SBCi	HEM21_ARATH	377,18	752,34	2	752,32	25,72	TCLCGEK	
SBCi	Y1054_ORYSJ	398,16	1191,45	3	1191,54	25,71	DIGQGNTYPD	

^aprot_acc: datos de código de acceso de proteínas en UniProt; ^bpep_mz: valor de masa/carga; ^cpep_mr: masa molecular; ^dpep_z: carga observada; ^ecalc_mr: masa molecular calculada a partir de la secuencia peptídica; ^fpep_score: confianza, coincidencia de espectro peptídico; ^gvar_mod: modificaciones postraduccionales.

SB: soja; GP: guisante; CP: garbanzo; NB: alubia; C: cocción convencional; i: tras digestión intestinal.

Tabla 3 (continuación). Péptidos identificados por espectrometrías de masas en la fracción 2 tras la separación por HPLC.

Muestra	^a prot_acc	^b pep_mz	^c pep_mr	^d pep_z	^e calc_mr	^f pep_score	Secuencia peptídica	^g var_mod
SBCi	SBT3A_ARATH	604,26	1206,50	2	1206,47	25,07	GFAMMSGTSMAT	Oxidation (M)
GPCi	ATP1_ARATH	347,18	692,34	2	692,28	28,79	GGLSMND	
GPCi	GGP1_ARATH	265,14	792,39	3	792,46	28,72	KILGICF	
GPCi	MB3R4_ARATH	249,11	744,30	3	744,34	28,19	LNGQAEN	
GPCi	KPRO_MAIZE	259,09	774,25	3	774,32	27,93	CNIHGLC	Oxidation (HW)
GPCi	SDN4_ARATH	846,54	2536,59	3	2536,38	26,98	RIPHLSSEELKKDLALKFFP	2 Oxidation (HW)
GPCi	PP354_ARATH	349,13	1044,38	3	1044,46	26,72	GLIDMYSKC	Oxidation (M)
GPCi	RGA_ARATH	497,16	1488,46	3	1488,59	26,51	MMMVKKEEDGGGN	2 Oxidation (M)
GPCi	ATPI_OEDCA	690,96	1379,91	2	1379,80	26,22	TLLANSDLKPLPV	
GPCi	HIP34_ARATH	550,76	1099,51	2	1099,60	25,98	KLSKSGKHAE	Oxidation (HW)
GPCi	FUT1_ARATH	786,49	2356,45	3	2356,24	25,14	YRRRSSPIRTTTGGSKSVNFS	
CPCi	Y1614_ARATH	511,22	1530,63	3	1530,76	35,33	LASNGSRVELLDGN	
CPCi	IYO_ARATH	757,01	2268,00	3	2268,11	34,19	GSVGFMDKVNSALAMCLIAGPR	2 Oxidation (M)
CPCi	CHT5B_MEDTR	446,76	891,51	2	891,43	26,82	PRMYPVN	Oxidation (M)
CPCi	AB8B_ARATH	416,93	1247,78	3	1247,66	25,72	QPVYALSIGGMI	
CPCi	AB7B_ARATH	757,00	2267,99	3	2268,20	25,6	PLIVGTGGAMTYIMSKKAQRV	Oxidation (M)
CPCi	OBP2A_ARATH	660,42	1978,23	3	1978,03	25,08	SLKTSRVGIMGPEKNSM	Oxidation (M)
NBCi	NU4C_VITVI	345,18	1032,52	3	1032,46	32,58	DEMGGIAIPM	
NBCi	NEAP2_ARATH	1027,84	3080,51	3	3080,45	28,26	NESVSGEKQNFWDTSQFKIVVMSMLI	Oxidation (M)
NBCi	STC_RICCO	540,76	1079,51	2	1079,60	27,29	KLSMLFGGVL	Oxidation (M)
NBCi	GDL5_ARATH	505,16	1512,47	3	1512,62	26,88	PRASGFIDVADGCC	
NBCi	MVD2_ARATH	311,84	932,50	3	932,54	26,88	PGKGPIVLH	Oxidation (HW)
NBCi	UBC24_ARATH	344,23	1029,68	3	1029,62	25,86	LPKAAIGFIT	
NBCi	AP4E_ARATH	615,66	1843,95	3	1843,93	25,84	FHRKSPSSVSHLVSNF	Oxidation (HW)

^aprot_acc: datos de código de acceso de proteínas en UniProt; ^bpep_mz: valor de masa/carga; ^cpep_mr: masa molecular; ^dpep_z: carga observada; ^ecalc_mr: masa molecular calculada a partir de la secuencia peptídica; ^fpep_score: confianza, coincidencia de espectro peptídico; ^gvar_mod: modificaciones postraduccionales.

SB: soja; GP: guisante; CP: garbanzo; NB: alubia; C: cocción convencional; i: tras digestión intestinal.

Tabla 4. Predicción in silico de la alergenicidad, toxicidad, probabilidad de penetración celular (PPC) y propiedades fisicoquímicas de los péptidos identificados con un Peptide Ranker Ratio (PRR) > 0,5.

Muestra	Secuencia peptídica	PRR	Alergenicidad	CPP	Impedimento estérico	Toxicidad	Hidrofobicidad	Tamaño lateral	Hidropaticidad	Anfipaticidad	Hidrofilia	Carga
SBCi	QACLPT	0,6397	Alérgeno	0,3707	0,54	No tóxico	0,06	0,54	0,87	0,18	-0,76	0
SBCi	SQFPGPIIKVHKG	0,6297	No alérgeno	0,0949	0,57	No tóxico	-0,06	0,57	-0,25	0,77	-0,12	2,5
SBCi	FPLMHYDLLEQCLPL	0,6180	No alérgeno	0,1278	0,55	No tóxico	0,07	0,55	0,53	0,26	-0,69	-1,5
SBCi	HACAGGMVQMPA	0,5116	No alérgeno	0,1471	0,57	No tóxico	0,08	0,57	0,57	0,23	-0,57	0,5
GPCi	CNIHGLC	0,7739	Alérgeno	0,0715	0,56	No tóxico	0,07	0,56	0,89	0,21	-0,84	0,5
GPCi	KILGICF	0,7683	Alérgeno	0,0860	0,66	No tóxico	0,24	0,66	1,97	0,52	-0,84	1
GPCi	GLIDMYSKC	0,5632	Alérgeno	0,0746	0,66	No tóxico	-0,04	0,66	0,31	0,41	-0,21	0
CPCi	GSVGFMDKVNLSALAMCLIAGPR	0,8318	No alérgeno	0,1678	0,63	No tóxico	0,02	0,63	0,69	0,28	-0,28	1
CPCi	QPVYALSIGGMI	0,7146	No alérgeno	0,0753	0,63	No tóxico	0,2	0,63	1,06	0,1	-0,88	0
CPCi	PRMYPVN	0,5834	Alérgeno	0,2035	0,62	No tóxico	-0,25	0,62	-0,91	0,35	-0,27	1
NBCi	PRASGFIDVADGCC	0,8140	No alérgeno	0,0817	0,63	Tóxico	-0,05	0,63	0,53	0,16	-0,03	-1
NBCi	KLSMLFGGVL	0,7040	No alérgeno	0,2297	0,63	No tóxico	0,2	0,63	1,48	0,37	-0,74	1
NBCi	LPKAAIGFIT	0,5675	No alérgeno	0,1332	0,59	No tóxico	0,19	0,59	1,26	0,37	-0,63	1

SB: soja; GP: guisante; CP: garbanzo; NB: alubia; C: cocción convencional; i: tras digestión intestinal.

5. CONCLUSIONES

La generación de péptidos se vio principalmente influenciada por la acción de las enzimas gastrointestinales. El efecto de la digestión intestinal sobre el perfil peptídico fue similar en todas las legumbres y tratamientos empleados, aunque el cocinado con microondas afectó de forma positiva a la generación de péptidos en soja, y de forma negativa en el caso del guisante.

Tras la digestión gastrointestinal, se observó una importante actividad inhibidora de la enzima α -glucosidasa en todas las muestras de la fracción 2 tras la separación por HPLC. Los tratamientos que resultaron en una mayor actividad inhibidora fueron la cocción convencional, seguido por la cocción a presión y en microondas en el caso de la soja, guisante y alubia. Sin embargo, en el caso del garbanzo, fue la cocción a presión la que tuvo mayor efectividad.

Se identificaron péptidos con potencial actividad inhibidora de la enzima α -glucosidasa en las cuatro legumbres, soja, guisante, garbanzo y alubia, tras la digestión gastrointestinal. Las principales características de estos péptidos fueron su alta polaridad y anfipaticidad, relacionada con sus valores de impedimento estérico y tamaño lateral. Sin embargo, sería necesario sintetizar las principales secuencias para confirmar la actividad inhibidora de la enzima α -glucosidasa mediante ensayos *in vitro*.

6. BIBLIOGRAFÍA

- ABBAS, Y., AHMAD, A. (2018). Impact of processing on nutritional and antinutritional factors of legumes: a Review. *Food Science and Technology*, 19(2), 199-215.
- ACQUAH, C., DZUVOR, C. K., TOSH, S., & AGYEI, D. (2022). Anti-diabetic effects of bioactive peptides: recent advances and clinical implications. *Food Science and Nutrition*, 62(8), 2158-2171.
- AHRÉN, B. (2007) Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors: clinical data and clinical implications. *Diabetes Care*, 30,1344–1350.
- ALEMÁN, A., PÉREZ-SANTÍN, E., BORDENAVE-JUCHEREAU, S., ARNAUDIN, I., GÓMEZGUILLÉN, M.C., MONTERO P. (2011). Squid gelatine hydrolysates with antihypertensive, anticancer and antioxidant activity. *Food Research International*, 44, 1044–1051.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, (2020). <<https://diabetes.org/>> [Consultado: 10 de junio 2023].
- ARAGÃO F.J.L., BARROS L.M.G., DE SOUSA M.V., GROSSI DE SÁ M.F., ALMEIDA E.R.P., GANDER E.S., RECH E.L. (1999). Expression of a methionine-rich storage albumin from the Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K., Lecythidaceae) in transgenic bean plants (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae). *Genetics and Molecular Biology*, 22, 445-449.
- 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.
- BARAMPAMA, Z., RONALD, E., SIMARD. (1994) Oligosaccharides, antinutritional factors, and protein digestibility of dry beans as affected by processing. *Journal of Food Science*, 59, 833-838.
- 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.
- CAMPOS-VEGA, R., LÓARCA-PIÑA, G., & OOMAH, B.D. (2010). Minor components of pulses and their potential impact on human health. *Food Research International*, 43, 461-482.
- CAPRIOTTI A.L., CARUSO G., CAVALIERE C., SAMPERI R., VENTURA S., CHIOZZI R.Z., & LAGANÀ A. (2015). Identification of potential bioactive peptides generated by simulated gastrointestinal digestion of soybean seeds and soy milk proteins. *Journal of Food Composition and Analysis*, 44, 205-213.
- COSTA DE OLIVEIRA, A., SGARBIERI, V.C. (1986) Effect of diets containing dry beans (*Phaseolus vulgaris*, L.) on the rat excretion of endogenous nitrogen. *J Nutr*, 116(12), 2387-92.
- 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.
- DESHPANDE, S.S., DAMODARAN, S. (1989) .Structure–digestibility relationship of legume 7S proteins. *The Journal of Food Science*, 54, 108-113.

- DESHPANDE, S. S., NIELSEN, S. S. (1987) *In vitro* digestibility of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L) proteins: The role of heat-stable protease inhibitor. *The Journal of Food Science*, 52, 1330-1334.
- EGOUNLETY, M., AWORH, O. (2003) Effect of soaking, dehulling, cooking and fermentation with *Rhizopus oligosporus* on the oligosaccharides, trypsin inhibitor, phytic acid and tannins of soybean (*Glycine max* Merr.), cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) and groundbean (*Macrotyloma geocarpa* Harms). *Journal of Food Engineering*, 56, 249-254.
- EL-ADAWY, T.A. (2002) Nutritional composition and antinutritional factors of chickpeas (*Cicer arietinum* L.) undergoing different cooking methods and germination. *Plant Foods for Human Nutrition*, 57, 83-97.
- ELIZALDE, A., PISMAG, Y., CHAPARRO, D. (2009). Antinutritional factors in eatable seeds. *Bioteconología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 7, 45-54.
- FALCO, S.C., GUIDA, T., LOCKE, M., MAUVAIS, J., SANDERS, C., WARD, R.T., WEBBER, P. (1995) Transgenic canola and soybean seeds with increased lysine. *Biotechnology (N Y)*, 13(6), 577-82.
- FEDERACIÓN INTERNACIONAL DE LA DIABETES, (2021). <<https://idf.org/>> [Consultado: 10 de junio 2023].
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (2016). Legumbres: semillas nutritivas para un futuro sostenible. <<http://www.fao.org/3/i5528s/i5528s.pdf>> [Consultado: 10 de mayo 2023].
- FUNDACIÓN ESPAÑOLA DE LA NUTRICIÓN, (2017). Informe sobre Legumbres, Nutrición y Salud. <<https://www.fen.org.es/storage/app/media/imgPublicaciones/informe-legumbres-nutricion-y-saludvw.pdf>> [Consultado: 10 de mayo 2023].
- GALILI, G., GALILI, S., LEWINSOHN, E., TADMOR Y. (2002) Genetic, molecular, and genomic approaches to improve the value of plant foods and feeds. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21, 167-204.
- GENOVESE, M.I., LAJOLO. F.M. (1996) Effect of bean (*Phaseolus vulgaris*) albumins on phaseolin *in vitro* digestibility, role of trypsin inhibitors. *Journal of Food Biochemistry*, 20, 275-294.
- GONZÁLEZ, R. (2005). Biodisponibilidad del hierro. *Revista Costarricense de Salud Pública*, 14(26), 6-12.
- JAYARAJ, S., SURESH, S., KADEPPAGARI, R.K. (2013) Amylase inhibitors and their biomedical applications. *Starch-Stärke* 65, 535–542.
- KIRPITCH, A., MARYNIUK, M.D. (2011). The 3 R's of Glycemic Index: Recommendations, Research, and the Real World. *Clinical Diabetes*, 29, 155 - 159.
- KORHONEN, H.J., PIHLANTO, A. (2003). Food-derived bioactive peptides--opportunities for designing future foods. *Current pharmaceutical design*, 9 (16), 1297-308.
- KWON, D.Y., DAILY, J.W., KIM, H.J., & PARK, S. (2010). Antidiabetic effects of fermented soybean products on type 2 diabetes. *Nutrition research*, 30 (1), 1-13.

- LEE, D., LEE, S., (2001) Genistein, a soy isoflavone, is a potent α -glucosidase inhibitor. *FEBS Letters*, 501, 84-86.
- LEE, C., PROSKY, L., DE VRIES, J.W. (1992) Determination of Total, Soluble, and Insoluble Dietary Fiber in Foods—Enzymatic-Gravimetric Method, *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 75 (3), 395–416.
- LETERME, P., MUÑOZ, L.C. (2002) Factors influencing pulse consumption in Latin America. *British journal of Nutrition*, 88(25), 1-4.
- LI, Y., YU, J. (2015) Research progress in structure-activity relationship of bioactive peptides. *J Med Food*, 18, 147–156.
- MÁRQUEZ, M.L., LAJOLO, F.M. (1991). In vivo digestibility of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins: The role of endogenous protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 1211-1215.
- MEISEL, H. (1998) Overview on milk protein-derived peptides. *Int Dairy J*, 8, 363-373.
- MINEKUS, M., ALMINGER, M., ALVITO, P., 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.
- MOORADIAN, A.D., THURMAN, J.E. (1999) Drug therapy of postprandial hyperglycaemia. *Drugs*, 57, 19–29.
- NESTEL, P.J., CEHUN, M., CHRONOPOULOS, A. (2004). Effects of long-term consumption and single meals of chickpeas on plasma glucose, insulin, and triacylglycerol concentrations 1 – 3. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79 (3), 390-395.
- OSORIO-DÍAZ, P., AGAMA-ACEVEDO, E., MENDOZA-VINALAY, M., TOVAR, J., BELLO-PÉREZ, L.A. (2008) Pasta adicionada con harina de garbanzo: composición química, digestibilidad in vitro del almidón y predicción del índice glucémico. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 6(1), 6-12.
- PATIL, S.P., GOSWAMI, A., KALIA, K., ABHIJEET S. (2020). Plant-Derived Bioactive Peptides: A Treatment to Cure Diabetes. *Int J Pept Res Ther*, 26, 955–968.
- PATTO, M.V. (2016) Grain legume protein quality: a hot subject. *Arbor-ciencia Pensamiento Y Cultura*, 192, 314.
- PIHLANTO, A., KORHONEN, H. (2003) Bioactive peptides and proteins. *Adv Food Nut Res*, 47, 175-276.
- PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A. (2000). Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides. *Trends Food Sci Technol*, 11, 347-356.
- REN, Y., LIANG, K., JIN, Y., ZHANG, M., CHEN, Y., WU, H., LAI, F. (2016) Identification and characterization of two novel α -glucosidase inhibitory oligopeptides from hemp (*Cannabis sativa* L.) seed protein. *J Funct Foods*, 26, 439–450.
- ROBERT P.R., ZALOGA G.P. (1994) Dietary bioactive peptides. *New Horizons*, 2, 237-243.

- SCHEEN, A.J. (2003) Is there a role for α -glucosidase inhibitors in the prevention of type 2 diabetes mellitus? ,*Drugs* 63, 933–951.
- SHAHIDI A, ZHONG B. (2008) Bioactive peptides. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 91, 914-931.
- SIDDIQ, M., UEBERSAX, M.A. (2012) Dry Beans and Pulses Production, Processing, and Nutrition: *Wiley Online Library*. 409 pp.
- TAIWO, K., AKANBI, C., AJIBOLA, O. (1997) The effects of soaking and cooking time on the cooking properties of two cowpea varieties. *Journal of food engineering*, 33, 337-46.
- THARANATHAN, R., MAHADEVAMMA, S. (2003) Grain legumes-a boon to human nutrition. *Trends in Food Science & Technology*, 14, 507-18.
- VENN, B.J., MANN, J.I. (2004) Cereal grains, legumes and diabetes. *Eur J Clin Nutr*, 58(11),1443-61.
- VERMEIRSEN, V., VAN CAMP, J., VERSTRAETE, W. (2004) Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Br J Nutr*, 92(3), 357-66.
- VIDAL-VALVERDE, C., FRIAS, J., ESTRELLA, I., GOROSPE, M.J., RUIZ, R., BACON J. (1994) Effect of processing on some antinutritional factors of lentils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(10), 2291–2295.
- VIDAL-VALVERDE, C., FRÍAS, J., VALVERDE, S. (1993) Changes in the carbohydrate composition of legumes after soaking and cooking. *Journal of the American Dietetic Association*, 93, 547-50.
- VILACUNDO, R. (2017). Liberación de péptidos multifuncionales durante la digestión gastrointestinal simulada de proteínas de quinua (*chenopodium quinoa willd.*) y amaranto (*amaranthus caudatus*). Tesis doctoral en ciencias de la alimentación. Universidad autónoma de Madrid facultad de ciencias. Departamento de Química Física Aplicada. 300 pp.
- VILLEGAS, R., GAO, Y.T., YANG, G., LI, H.L., ELASY, T.A., ZHENG, W., SHU, X.O. (2008) . Legume and soy food intake and the incidence of type 2 diabetes in the Shanghai Women's Health Study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 87, 162–167.
- WU, W., WILLIAMS, W.P., ELIZABETH KUNKEL, M., ACTON, J.C., HUANG, Y., WARDLAW, F.B. AND GRIMES, L.W. (1996), Thermal effect on net protein ratio of red kidney beans (*Phaseolus vulgaris* L). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 71, 491-495.
- YIN, Y., ZHOU, L., PEREIRA, L., ZHANG, J., ZHANG, W. (2011). Insights into Digestibility and Peptide Profiling of Beef Muscle Proteins with Different Cooking Methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 68(48), 14243–14251.
- YU, P. (2005). Protein secondary structures (α -helix and β -sheet) at a cellular level and protein fractions in relation to rumen degradation behaviours of protein: A new approach. *British Journal of Nutrition*, 94, 655-665.