



Universidad de Valladolid

Facultad de Medicina

GRADO EN NUTRICIÓN HUMANA Y DIETÉTICA

2017-2018

TRABAJO FIN DE GRADO:

**Alteraciones en el perfil proteínico de la seta
Calvatia gigantea debidas al cocinado y a la
digestión**

Tutora: Dña. Pilar Jiménez López

Autora: Iris Omil Rabanal

1 RESUMEN

Este trabajo es un estudio experimental para conocer el perfil proteínico del hongo superior comestible *Calvatia gigantea* antes y después de someterlo a digestiones *in vitro*, siendo de gran interés por la cantidad de problemas digestivos que actualmente ocasiona la ingestión de setas comestibles. Este problema no es general, lo que nos lleva a pensar que un péptido o proteína que resista la temperatura de cocción y las digestiones puedan ser la causa de estos problemas en personas susceptibles, bien por déficit de alguna enzima o algún cambio en los alelos de algún cromosoma como ocurre en la intolerancia al gluten. Tras llevar a cabo digestión completa de la seta en estado crudo y cocinada, observamos que hay bandas de péptidos o proteínas que resisten y algunas podrán ser las causantes de malas digestiones en pacientes sensibles.

Nutricionalmente los hongos comestibles tienen grandes cantidades de agua, alrededor de un 90%, de hidratos de carbono y de proteínas. Por el contrario su contenido en lípidos es bajo por lo que son muy recomendables para llevar a cabo dietas hipocalóricas. Contienen minerales como hierro o calcio y vitaminas del grupo B y vitamina C.

En la *Calvatia gigantea* destaca su alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados por lo que podría definirse como un alimento potenciador de la salud, puesto que son esenciales para el buen funcionamiento del organismo. Se les atribuye efectos hipocolesterolémicos, cardioprotectores e hipotensores. También posee un gran contenido en hidratos de carbono, proteínas y sustancias bioactivas otorgándole, estas últimas, propiedades antibióticas, antivirales, antitumorales, entre otras. Entre estas sustancias bioactivas resaltamos la calvacina, potente mucoproteína que inhibe la proliferación de células tumorales de algunos tipos de cáncer.

La *Calvatia gigantea* podemos encontrarla en dos estados diferentes. Cuando su interior se encuentra con tonalidades similares a las exteriores, blanca o levemente amarillenta, puede consumirse, mientras que si por el contrario, encontramos su interior con tonalidades marrones no puede ser consumida, pues es indicativo de que empieza a pudrirse.

Gastronómicamente no es una variedad muy usada pero puede consumirse tanto cruda en ensalada, tras macerarla adecuadamente, como asada, salteada, empanada o frita.

Palabras clave: digestión, medicinal, nutricional, propiedad, proteína, seta, toxicología.

2 ÍNDICE

1	RESUMEN	2
2	ÍNDICE	3
3	INTRODUCCIÓN.....	4
3.1	Definición, ciclo vital y morfología de las setas.	4
3.2	Propiedades nutricionales.	7
3.3	Compuestos bioactivos.....	8
3.4	Hongos medicinales	8
3.5	Aplicaciones medicinales de los hongos.....	9
3.6	Propiedades medicinales de los hongos en enfermedades derivadas de una mala alimentación.....	12
3.7	<i>Calvatia gigantea</i>	13
4	JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	15
4.1	Justificación.....	15
4.2	Objetivos.	17
5	MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
5.1	Materiales.....	19
5.2	Métodos.	20
6	RESULTADOS	26
6.1	Método del Biuret.	26
6.2	Electroforesis.....	27
7	DISCUSIÓN	31
8	CONCLUSIONES.....	32
9	BIBLIOGRAFÍA.....	33
10	ANEXOS	37
	Anexo 1. Informe del Instituto Nacional de Toxicología: año 2016.	37
	Anexo 2. Métodos: procedimientos.	39

3 INTRODUCCIÓN

3.1 Definición, ciclo vital y morfología de las setas.

Los hongos, considerados organismos vivos completos, con autonomía propia, pertenecen al reino Fungi, uno de los grupos de organismos más heterogéneos. Son eucariontes, con organización talofítica y heterótrofos. Además, según su forma de vida y de reproducción, pueden ser parásitos o simbioses.

Las setas o macromicetos son una parte del hongo que, en ciertas fases de su vida desarrollan fructificaciones macroscópicas, es decir, el fruto de los mismos.

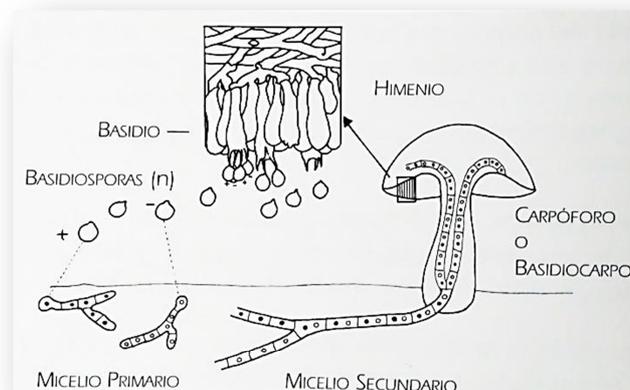


Figura 1. Ciclo de la vida de un macromiceto.

La espora, femenina o masculina, germina gracias a unas condiciones determinadas de humedad y temperatura, dando lugar al micelio primario o monocariótico, en el que cada una de las esporas contiene un solo núcleo. Este podrá ser femenino o masculino, en función de la espora que lo haya originado. Para que surja el micelio secundario o dicariótico, tienen que aparearse uno primario femenino y otro masculino.

El micelio secundario contendrá dos núcleos por célula, a diferencia del primario y será el encargado de llevar a cabo las funciones vitales, vegetativas, contactando con raíces de plantas o absorbiendo las sustancias nutritivas del medio para madurar hasta convertirse en el cuerpo fructífero o carpóforo.

En él, tras la fusión nuclear y la meiosis, se formarán esporas que serán posteriormente liberadas y transportadas por el viento, insectos, lluvia, etc., e iniciarán de nuevo el ciclo.

Es muy importante conocer la fisiología de las setas, para comprender, en todo momento, a que parte de las mismas nos referimos. Destacan, principalmente, dos partes de las mismas, el pie y el sombrero, pero algunas, como la que trataremos en el presente trabajo, carecen de pie por lo que se denominan cuerpos fructíferos únicos. En la figura 2, podemos observar todas y cada una de las partes que podemos encontrar en la morfología de estos hongos superiores.



Figura 2. Morfología de las setas.

- **Aguijón:** pequeñas púas, rígidas y punzantes, que se encuentran en el himenio de algunas setas.
- **Anillo:** resto membranoso del velo parcial que queda rodeando al pie después de abrirse al sombrero.
- **Cutícula:** también denominada pellis, membrana que recubre el sombrero y el pie del carpóforo, compuesta por una o varias capas.
- **Escama:** placa adherida a la cutícula del sombrero procedente de la desintegración del velo general. Escama saliente del plano de la cutícula, tanto en el sombrero como en el pie.
- **Estrías o estriaciones:** surcos más o menos profundos que se encuentran en el borde del sombrero o en la superficie del pie. Cuando son muy pronunciados, se dice que el borde es tuberculado.
- **Hifa:** célula alargada, elemento constituyente del cuerpo de los hongos, que puede ser septada (con tabiques) o aseptada (sin tabiques).
- **Himenio:** capa fértil, que comprende las láminas, poros, aguijones, etc. de los hongos. En los Basidiomicetos está compuesto de basidios, basidiolos y cistidios. En los Ascomicetos, por ascas y paráfisis, todos verticalmente yuxtapuestos. También se denomina tecio.

- **Lámina:** también llamada limbo, repliegue del himenio que da lugar a tabiques que van desde el borde del sombrero hasta el pie y que son portadores de basidios. Si no llega hasta el pie, recibe el nombre de lamélula.
- **Margen:** borde o zona periférica.
- **Micelio:** parte vegetativa o talo del hongo, formada por una densa serie de filamentos ramificados o hifas que se entremezclan entre sí, de estructura y composición variables. Puede ser de formas muy diversas.
- **Pie:** parte del carpóforo que sostiene el sombrero o el himenio. También llamado estipe, estípide o pedicelo.
- **Placas:** restos de la volva que se encuentran en los sombreros de ciertas setas.
- **Poros:** pequeños orificios de los túbulos que forman el himenio.
- **Retículo:** filetes anastomados, en relieve y en color distinto del fondo, que marcan, a veces, el pie de algunos hongos. También se denomina red.
- **Sombrero:** también llamado píleo, es la parte superior del carpóforo que, en general, se presenta más ensanchada, sostenida por el pie y que lleva el himenio.
- **Tubo:** estructura tubular en cuyo interior se disponen los basidios.
- **Velo:** cubierta de los cuerpos fructíferos jóvenes, que protege las láminas y puede permanecer en forma de anillo en el pie o como porciones marginales en el sombrero. También puede proteger a todo el hongo, apareciendo como placas o motas en el sombrero o en la base del pie.
- **Verruga:** protuberancia, formación saliente terminada en punta o aplanada, residuo del velo, que adorna la superficie de los carpóforos, siendo blancas o coloreadas.
- **Volva:** resto membranoso del velo universal en forma de vaina, que a menudo persiste en la base del pie.
- **Zonaciones:** ornamentaciones circulares concéntricas o similares, que se presentan en la superficie por la alternancia de los colores, sobre todo en el sombrero y, a veces, en el pie.

No todas las setas constan de todas ellas, cada familia cuenta con unas partes morfológicas características.

3.2 Propiedades nutricionales.

En general, los hongos proporcionan entre 26 Kcal/100 g en el caso de los champiñones y 35 Kcal/100 g en el caso de la seta Shiitake. Las cantidades tan bajas de energía se deben a la gran cantidad de agua que tienen, entre un 81,8 y un 94,8%. A mayor porcentaje de humedad, menos vida útil y energía aportarán dependiendo de la especie, el cultivo, las condiciones de crecimiento y de su almacenamiento. Por ello se recomiendan en dietas hipocalóricas.

En consecuencia, la materia seca es muy baja (10%) y está compuesta por hidratos de carbono, proteínas, fibra y minerales, pero su poder saciante es muy alto, debido a las grandes cantidades de agua que poseen, y con baja densidad energética.

- **Hidratos de carbono (digeribles y no digeribles):** las cantidades varían mucho de unas especies a otras, entre un 35 y un 70% de su peso seco, pero son alimentos con muy bajo índice glucémico (IG = 15), por su riqueza en carbohidratos complejos y fibra que favorecen ralentizando la digestión, por lo que son recomendados en dietas hipoglucemiantes. Dentro de los digeribles destacan el manitol (0,3 – 5,5% en materia seca) y el glucógeno (1 – 1,6% en materia seca). Los no digeribles (fibra soluble e insoluble) se encuentran en mayor cantidad y son oligosacáridos como la trehalosa y polisacáridos no amiláceos como la quitina, los β -glucanos y mananos. El contenido de fibra insoluble esta entre 2,28 – 8,99 g/100 g y el de de la fibra soluble entre 0,32 – 2,2 g/100 g, por lo que son buena fuente de fibra dietética.
- **Lípidos:** contienen menos del 5% de su peso seco, predominando los ácidos grasos insaturados y entre estos el ácido linoleico (ω -6).
- **Proteínas:** las cantidades oscilan entre 15 y 25% de peso seco, con digestibilidad y absorción bastante buena, estando entre 73,4 – 76,3%, semejante a las leguminosas. Contienen todos los aminoácidos esenciales y además, son ricos en ácido glutámico, responsable del sabor umami, ácido aspártico y arginina.
- **Minerales:** varía entre el 6 y 11% sobre materia seca. Los más abundantes son calcio, fósforo, potasio, magnesio, cobre, selenio, hierro y cinc.
- **Vitaminas:** se consideran una buena fuente de vitaminas, sobre todo de riboflavina (B2), niacina (B3) y folatos (B9). También destaca su contenido en precursor de vitamina D (D_2 : ergocalciferol), puesto que es el único alimento no animal que lo contiene.

3.3 Compuestos bioactivos.

Son compuestos biológicamente activos que tienen propiedades beneficiosas para el organismo y por tanto, para la salud. Entre ellos se encuentran polisacáridos como la quitina, glucanos y celulosa que actúan como agentes inmunomoduladores, antitumorales, hipoglicémicos y antioxidantes, complejos polisacáridos-proteína que ejercen actividad antitumoral e inmunomoduladora, compuestos de bajo peso molecular, como los triterpenos que son agentes antivirales activos contra el VIH y virus del herpes y los compuestos fenólicos que se caracterizan por su alta capacidad antioxidante, y compuestos de bajo peso molecular como las lectinas con actividad inmunomoduladora, antiproliferativa, hipoglicémica y antitumoral y las ligninas que tienen actividad antiviral. Todos estos son los responsables del desarrollo del siguiente apartado.

3.4 Hongos medicinales

Para afrontar este tema, hay que saber diferenciar entre micología y micoterapia. La primera, hace referencia a la ciencia que estudia los hongos (características, clasificación, consumo) mientras que la segunda, responde al uso de estos y de sus extractos a nivel medicinal, tratándose de nutrición ortomolecular (aportar al organismo los nutrientes necesarios según el estado fisiológico, con apoyo de complementos nutricionales obtenidos de fuentes naturales).

Los hongos son usados como medicina tradicional, desde hace miles de años, en China. Se comenzaron a usar para curar heridas infectadas y son juzgados como tónicos del sistema inmunológico, gracias a que actúan sobre los sistemas de regulación y regeneración del organismo, al igual que en el medio ambiente, purificándolo o descontaminándolo.

Además, son considerados adaptógenos por lo que pueden usarse frente al sobrefuncionamiento y desregulación del sistema inmunitario en alergias, inflamación, enfermedades autoinmunes, o frente al hipofuncionamiento o deplección del mismo en el caso de cáncer, inmunosupresión, inmunodeficiencia. Por ello, pueden usarse como tratamiento de enfermedades, sobre todo tumorales y degenerativas, pero también, para la prevención de las mismas.

Se les otorga esta importancia debido a que algunas sustancias producidas por el metabolismo secundario de los hongos, tienen propiedades medicinales: antibiótica como la penicilina, que se extrae de *Penicillium notatum*. De lucha contra el cáncer como la ciclosporina, sustancia inmunosupresora usada en los trasplantes, producida por el hongo *Cordyceps subsessilis*. En MCT (Medicina China Tradicional): cura de resfriados, gripe, sarampión, bronquitis, prevención y cura de HTA (Hipertensión Arterial), hipercolesterolemia y como tónico de hígado y riñones, gracias al hongo *Lentinula edodes*, en japonés Shiitake u hongo del árbol Shii.

Actualmente, existen pocos estudios y muy similares sobre las propiedades beneficiosas de los hongos en cuanto a medicina. Se han aislado y estudiado compuestos farmacológicos activos, capaces de ejercer una acción terapéutica, pero el gran problema es el poco conocimiento que se tiene acerca del mundo *fungi*:

- Sólo se conoce el 10% de macrohongos presentes en la tierra, unas 14.000 especies de las 140.000 que existen.
- De estas, al menos 270 especies tienen propiedades terapéuticas, entre las que cabe destacar: antioxidante, antihipertensiva, hipocolesterolemia, hepatoprotectora, antifibrótica, anticoagulante, antidiabética, antiinflamatoria, antiviral, antimicrobiana y antineoplásica. Estas propiedades se han estudiado “*in vitro*” en más de 50 especies, de las cuales 20 también lo han sido “*in vivo*”.

3.5 Aplicaciones medicinales de los hongos.

En el uso de los hongos o sustancias derivadas de los mismos para el tratamiento de enfermedades, hay que tener en cuenta si la terapia es *in vitro* o *in vivo*, puesto que la actividad satisfactoria esperada no tiene por qué ser igual de efectiva en ambos casos. Esta efectividad depende de la vía de administración, la concentración a la que estemos suministrando la sustancia implicada en la posible cura o mejora, a los efectos secundarios negativos que esta pueda ocasionar en el individuo y el factor interpersonal, ya que algunas personas no podrán ser tratadas por contar con una alergia reconocida.

La clasificación de las aplicaciones medicinales de los hongos, es la siguiente:

- **Adaptógenos y estimulantes del sistema inmunitario:** son aquellos que tienen la capacidad de ayudarnos a adaptarnos a los cambios, tanto ambientales como

fisiopatológicos. Se lleva a cabo gracias a que estimulan la actividad de algunos de los componentes del sistema inmunitario, mejorando la fatiga, el estrés, los ritmos biológicos, el uso del oxígeno por parte del organismo, el anabolismo, la recuperación tras la práctica deportiva, eliminación de sustancias tóxicas de nuestro metabolismo y energizante. Ej: *Tremella mesentérica*, *Trametes versicolor*, *Inonotus obliquus*, etc.

- **Afrodisíacos:** llamados así, haciendo referencia a Afrodita, diosa del amor, por aumentar la libido sexual, los niveles de testosterona, el peso de los testículos, etc. Las trufas se encuentran dentro de estos por su forma y su olor, parecido al de las feromonas de los animales. Como todos sabemos son un manjar culinario.
- **Alucinógenos:** han llegado hasta nosotros gracias a los chamanes, ya que tras la conquista de Méjico, las ceremonias que hasta entonces se celebraban con el consumo de los mismos y que datan de la antigua Grecia (personajes como Aristóteles, Platón, Sófocles, etc., los consumían), fueron prohibidos. Son denominados alucinógenos, todos aquellos que en su composición presenten psilocina, psilocibina, baeocistina y/o nor-baeocistina. Estas sustancias ocasionan psicosis, alteraciones de la personalidad y del pensamiento, euforia, confusión mental, etc., como por ejemplo el cornezuelo.
- **Antibióticos:** Fleming fue el pionero con el descubrimiento de la penicilina en 1929 y su acción antibiótica frente a bacterias Gram-positivas. Descubrimiento casual al darse cuenta que alrededor del cultivo realizado un mes antes de *Staphylococcus Aureus*, había crecido un hongo contaminante, *Penicillium notatum*, que había formado un halo trasparente que indicaba destrucción celular.

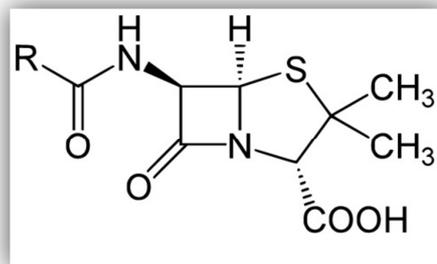


Figura 3. Penicilina.

En los años 90 se descubrieron antibióticos en los carpóforos de las setas *Agaricus campestris* que actúa contra *Staphylococcus* y *Salmonella*, *Clitocybe nebularis* que contiene nebularina, asociación de ribosa y purina que tiene acción contra la

tuberculosis y la lepra, el hongo del té, también llamado kombucha, en una infusión de té con un poco de azúcar, conviven microorganismos productores de ácido glucónico con levaduras que fermentan los hidratos de carbono y producen alcohol, aminas biógenas, ácido láctico, tartárico, málico, cítrico, etc. Se cree que tiene propiedades digestivas además de variedad de propiedades antibióticas, aún no demostradas.

- **Anticancerígenos:** algunas setas son capaces de detener la reproducción celular en la metafase, pero que no pueden ser usadas por el veneno letal que contienen, es el caso de *Amanita phalloides*, *A. virosa* y *A. verna*. La α -amanitina es la encargada de que se produzca esa acción, pero no puede entrar en contacto con células sanas, por lo que no puede llevarse a la práctica como tratamiento al tratarse de, posiblemente, la toxina más letal estudiada y que actúa como inhibidora de la RNA polimerasa II. Cabe destacar que la penicilina es un efectivo antídoto contra los efectos de envenenamiento de las amanitinas, puesto que compite con ellas en el sistema de entrada celular a la membrana del hepatocito. Otras como *Ganoderma applanatum* o *G. australe* inhiben el desarrollo del sarcoma 180 y del cáncer de esófago, por la acción de diferentes sustancias presentes en cada una de ellas (*G. australe* contiene principios activos como ergosteroles, triterpenos, etc., que inhiben la proliferación y el crecimiento de estas células cancerígenas). También incluimos en este apartado a *Ganoderma lucidum*, conocida como reishi o pipa en nuestro país. Sus polisacáridos son los encargados de inhibir la proliferación de ciertos tumores, pudiendo ser usados, junto a la administración de vitamina C para el tratamiento y la prevención de distintos tipos de cáncer, en España ha sido usada como coadyuvante al tratamiento anticancerígeno de leucemia linfoblástica en una niña de 4 años que no mejoraba solo con los medicamentos y que hoy en día lleva una vida normal, puesto que está totalmente recuperada. Hay otras muchas setas que pueden ser usadas, dependiendo del carcinoma al que nos enfrentemos, teniendo en cuenta sus principios activos.
- **Antiosteoporóticos:** especies muy comunes como son la seta de cardo, *Pleurotus eryngii*, o el champiñón común, *Agaricus bisporus*, tienen propiedades que previenen la desmineralización ósea e incluso ayudan a su regeneración. Esto se debe a que aumentan la absorción y disminuyen la pérdida de calcio y de otras sustancias indispensables para la formación de los huesos.

- **Antivirales:** *Calvatia gigantea*, objeto de este trabajo y en la que más adelante nos centraremos, es antiviral frente a diferentes virus. Son muchos los hongos que poseen esta propiedad, siendo cada uno específico para el tratamiento de distintos virus. Por ejemplo *Agaricus xanthodermus*, *Macrocyttidia cucumis*, *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa*, *Lentinula edodes*, etc, son específicos para el tratamiento del VIH, *Agaricus xanthodermus*, *Rozites caperatus*, *Ganoderma pfeifferi*, entre otras, para el tratamiento del herpes simple y *Rozites caperatus*, *Ganoderma pfeifferi*, *Inonotus hispidus*, etc., para el tratamiento de la gripe A.
- **Estimuladores del crecimiento de células nerviosas e inhibidores del Alzheimer:** las hericenonas extraídas de *Hericiium erinaceus* que junto a la seta de cardo (*Pleurotus eryngii*), la seta shiitake (*Lentinula edodes*) y la seta de ostra (*Pleurotus ostreatus*) tienen efectos sobre la salud digestiva.
- **Inmunodepresores:** son sustancias capaces de evitar que se produzca la reacción antígeno-anticuerpo, inhibiendo la producción de linfocitos (ergosterol, mayoritariamente), por lo que son muy importantes en las alergias. Algunos hongos y setas con esta propiedad son: *Pisolithus arhiruz*, *Lenzites betulina*, *Tricholoma populinum*, *Saccharomyces cerevisiae*, etc. Estas sustancias están contraindicadas en enfermos de VIH.
- **Provitamínicos:** el ergosterol, componente de las membranas de los hongos, que puede transformarse en vitamina D. En general las setas tienen grandes cantidades de vitaminas del grupo B, destacando B₁ y B₂, vitamina A, C y K. También poseen ácidos como el nicotínico y pantoténico, β-carotenos y aminoácidos que ayudan a la síntesis de vitaminas. Ej: *Agaricus bisporus*, *A. campestris*, *Cantharellus cibarius* y *Pleurotus ostreatus*.

3.6 Propiedades medicinales de los hongos en enfermedades derivadas de una mala alimentación.

- **Antiácidos, disminución de gases, mejora del metabolismo:** hongo del té, *Ganoderma lucidum*, *Hericiium erinaceus*, etc.
- **Antioxidantes:** protegen y conservan órganos vitales de nuestro organismo gracias a la destrucción de sustancias tóxicas generadas por nuestro metabolismo. Especies de *Ganoderma*, hongo del té, entre otros.
- **Astringentes:** *Calvatia gigantea* entre otras, retrasa el vaciamiento gástrico.

- **Cicatrizantes de úlceras digestivas:** *Coprinus atramentarius* y *Hericiium erinaceus*.
- **Cirrosis hepática:** regeneración celular en el hígado por parte de *Ganoderma lucidum*, hongo del té, etc.
- **Coadyuvante al tratamiento de enfermedades cardiacas:** *Ganoderma lucidum*, *Hericiium erinaceus*, etc.
- **Diuréticos:** *Amanita muscaria*, *Ganoderma lucidum*, especies de *Pleurotus*, entre otros.
- **Gastritis y duodenitis:** *Fomitopsis officinalis* y *Ericium erinaceus*.
- **Hipocolesterolemiantes:** *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa*, *Trametes versicolor*, especies de *Pleurotus*.
- **Hipoglucemiantes:** *Agaricus bisporus*, *Grifola frondosa*, *Trametes versicolor*, especies de *Tramenetes*, etc.
- **Hipotensores:** la gran mayoría de los hongos y las setas tienen esta propiedad ya que son ricos en potasio y este mineral ayuda a disminuir la tensión arterial. También ayudan a disminuir la tensión sanguínea regulando la actividad renal.
- **Laxantes, según cantidad ingerida:** *Boletus satanas*, *Grifola frondosa*, *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor*, etc.
- **Obesidad:** *Agaricus bisporus*, *Grifola frondosa*, entre otros.
- **Problemas del tiroides:** *Claviceps purpurea*, actúa ajustando las hormonas.
- **Tratamiento del alcoholismo:** *Coprinus atramentarius* al consumirse con bebidas alcohólicas produce problemas intestinales leves, por lo que provoca rechazo al alcohol.

3.7 *Calvatia gigantea*.

Calvatia gigantea, también denominada *Langermannia gigantea* y comúnmente pedo o cuesco de lobo gigante, ha sido el hongo comestible utilizado para llevar a cabo este trabajo.

Es un hongo superior cuyo cuerpo fructífero único, con cordones micelares en su base, tiene forma globosa y puede alcanzar los 80 cm de diámetro y los 30 Kg de peso. Se desarrolla en verano – otoño y puede hacerlo en una sola noche. En un inicio, su color es blanco – amarillento (estado inmaduro), tanto en el exterior como en el interior, pero posteriormente torna a colores marrones, debido a sus esporas, y consistencia polvo,

estado maduro en el que la misma no puede ser consumida. Crece en terrenos no demasiado húmedos, como jardines, parques, áreas herbosas de colinas y montañas, montones de estiércol y lechos de ortigas.

Nutricionalmente, es rica en ácidos grasos con un 14,2%, predominando los poliinsaturados cuyo contenido es de 67,93%. Contiene un 34,3% de proteínas, un 52% de hidratos de carbono y compuestos bioactivos en trazas como ácido gentísico, hexanal y trehalosa. Destaca una sustancia, la calvacina (calvacin en inglés), mucoproteína compuesta por aminoácidos, urea, ergosterol y lípidos que tiene efectos anticancerígenos contra sarcoma 180, sarcoma MA 387, sarcoma de Crabb y células humanas de cáncer de pulmón A459. En grandes cantidades puede resultar tóxica para el ser humano.

Medicinalmente, posee propiedades antibióticas, antivirales, hemostáticas, inmunomoduladoras y antitumoral. Además también presenta actividad expectorante, sedante, antiinflamatoria y analgésica.

Gastronómicamente, se puede consumir incluso cruda en ensalada, tras cortarla, salarla y macerarla con zumo de limón pulverizado sobre las láminas de la misma, durante un par de horas. Gracias a la consistencia de su carne, puede ser también asada, salteada o incluso empanada y frita.



Figura 4. *Calvatia gigantea* en estado comestible (gleba blanca) y en estado maduro (no comestible, gleba parda y polvorienta).



Figura 5. *Calvatia gigantea*. Fotografía propiedad Dr. Girbés por gentileza de Don Aurelio Blanco.

4 JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Tras ver todos los beneficios que los hongos pueden aportarnos a nuestro organismo, veremos los problemas que estos pueden ocasionarnos.

4.1 Justificación.

El tema ha sido seleccionado porque en la actualidad muchas personas afirman que ante la ingestión de hongos comestibles, se desencadenan problemas gastrointestinales. En el año 2013 el Servicio de Información Toxicología registró 178 intoxicaciones por setas (un 0,23% del total de intoxicaciones anuales). El 30% de las mismas, fueron graves con intoxicación hepática por *Amanita phalloides*, *Lepiota brunneoincarnata* y otras pertenecientes al género *Ovisporae*. Un 52% se desarrollaron como gastroenteritis. El 18% restante se atribuye al resto de síndromes tóxicos fúngicos entre los que se incluye un 1% de trastornos que fueron causados por setas comestibles. En el informe más reciente creado por el SIT (Servicio de Información Toxicológica), perteneciente a las intoxicaciones del año 2016, no se especifica la sintomatología causada. Se recogieron 168 consultas relacionadas con setas que corresponden al 0,18% del total de problemas tóxicos anuales y afirman que “los trastornos causados por especies comestibles no siempre han de tener lugar, fundamentándose en su caso síntomas digestivos como náuseas, vómitos y leve diarrea, normalmente autolimitada en el tiempo y sin mayores consecuencias médicas”. (Anexo 1).

Las intoxicaciones pueden ser de muchos tipos y cada uno de ellos produce unos problemas diferentes:

- **Intoxicación faloidiana:** en su mayoría son producidas por especies de *Amanitas* pero también las causan especies de *Galerina*, *Lepiota* y *Pholiotina filaris*. Consta de 3 fases: la primera desarrolla problemas gastrointestinales, después se produce una fase de mejoría aparente pero finalmente las toxinas atacan el hígado, produciéndose semanas después, la muerte.
- **Intoxicación orellánica:** producidas por diferentes especies de *Cortinarius*. Los síntomas son muy parecidos a la intoxicación anterior, pero en este caso el daño tardío que se produce es renal e incluso trastornos neurológicos.
- **Intoxicación giromitrínica:** la causan *Cudonia circinans*, *Leotia lubrica*, *Spathularia flavida* y especies de *Gyromitra* y *Helvella*. Sintomatología muy parecida también a la faloidiana pero con alteración añadida del bazo, cardíaca,

neurológica y renal. Posible muerte a los pocos días por parada respiratoria o insuficiencia cardíaca.

- **Intoxicación por rabdomiolisis:** causada por distintas especies de *Tricholoma*. Cursa con debilidad, rigidez de las extremidades, orina oscura, aumento de la creatina- fosfocinasa (CPK por sus siglas en inglés), problemas intestinales, etc.
- **Intoxicación por *Paxillus involutus* y *P. filamentosus*:** problemas gastrointestinales, sudores fríos y en casos graves hemólisis.
- **Trastornos gastrointestinales:** especies de *Agaricus*, *Boletus*, *Entoloma*, *Lactarius*, *Ramaria*, *Tricholoma*,... La sintomatología es muy variada, desde cólicos y molestias, hasta graves cuadros de diarrea y deshidratación.
- **Intoxicación sudoriana o muscarínica:** especies de *Clitocybe* e *Inocybe*. Aumento de todas las secreciones del organismo, síntomas digestivos, problemas de visión, etc.
- **Interacciones con alcohol:** *Boletus luridus*, *Laetiporus sulphureus*, especies de *Coprinus*, entre otras. Sus síntomas duran dos horas y constan de rubefacción cutánea, sofocos, palpitaciones, pinchazos, problemas digestivos, sudoración, arritmias, alteraciones visuales, etc.
- **Trastornos mentales:** dentro de este grupo tenemos dos subgrupos.
 - **Con predominio de trastornos nerviosos:** causados por especies de *Amanita* que cursan con problemas gastrointestinales y motrices, pudiendo llegar a ser mortal.
 - **Con predominio alucinógeno:** especies de *Inocybe*, *Mycena*, *Panaeolina*, *Pholiota*, *Psilocybe*, entre otras. Presentan alteraciones sensoriales, del pulso, de tensión, de visión, sudoración, debilidad y mareos.

De todas las alteraciones nombradas, nos interesan las que producen trastornos intestinales e incluso las que interaccionan con bebidas alcohólicas puesto que en nuestro país, lo más común es consumir una copa de vino en las comidas. El resto de problemas tratados como intoxicaciones, no nos competen en este caso ya que se trata de problemas desencadenados por el consumo de setas no comestibles, ya sea por error o confusión de alguna especie o por “diversión”.

La alergia/intolerancia se define como la sintomatología que producen, en este caso las setas consideradas comestibles, debido a una sensibilidad intrínseca al consumidor (no todo el mundo las tolera).

Hay individuos que no poseen alguna de las enzimas digestivas indispensables para descomponer compuestos que se encuentran en las paredes celulares de los hongos como por ejemplo la enzima trealasa que descompone la disacárido trealosa, por lo que llegan sin digerir al intestino grueso, donde fermentan y producen cólicos, gases y malestar.

Dejando de lado los hidratos de carbono cabe pensar que, en ocasiones, este malestar general acompañado de problemas gastrointestinales, puede deberse a que en los hongos comestibles se integren proteínas y/o péptidos resistentes al cocinado, digestión gástrica e intestinal. En caso de ser resistentes a estos procesos, podrían ser sustancias alergénicas en personas con sensibilidad, al igual que ocurre con las fracciones problemáticas del gluten (gliadina) de los cereales.

4.2 Objetivos.

- ✓ Extraer el perfil proteínico de la seta *Calvatia gigantea* en su estado crudo, tras elaborar extractos, dializar y digerir (gástrica e intestinalmente) las muestras para posteriormente someterlas a electroforesis tras precipitación de proteínas con TCA (ácido Tricloroacético) o tras ultrafiltración.
- ✓ Extraer el perfil proteínico de la seta *Calvatia gigantea* cocinada, tras elaborar extractos, dializar y digerir (gástrica e intestinalmente) las muestras para posteriormente someterlas a electroforesis tras precipitación de proteínas con TCA o tras ultrafiltración.
- ✓ Comparar los perfiles proteínicos de la seta *Calvatia gigantea* en sus diferentes estados, anteriormente nombrados.

Una de las fuentes de información utilizadas para realizar este trabajo ha sido la base de datos PubMed. La búsqueda bibliográfica se hizo desde lo más general, setas, hasta lo más particular, las proteínas de *Calvatia gigantea*.

Palabras de búsqueda	Artículos			Revisiones		
	Años	5	10	Total	5	10
Mushrooms	3.613	6.569	11.793	212	367	618
Mushrooms chemical composition	2.260	4.122	6.319	115	206	300
Mushrooms medicinal	1.152	999	648	65	112	136
<i>Calvatia gigantea</i>	3	3	10	0	0	0
<i>Calvatia gigantea medicinal</i>	2	2	2	0	0	0
<i>Calvatia gigantea proteins</i>	1	1	1	0	0	0
Calvacin	0	0	2	0	0	0

Tabla 1. Búsqueda bibliográfica en la base de datos PubMed.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales.

5.1.1 Equipos.

- ✓ Agitador magnético. J. JIMENO S.A.
- ✓ Balancín "ROCKER 25". LABNET.
- ✓ Balanza de precisión. GRAM FV-120.
- ✓ Balanza. KERM 572.
- ✓ Baño de ultrasonidos. SELECTA ULTRASONS.
- ✓ Baño digestor con agitación. BT-21 SBS.
- ✓ Baño MAGNETIC STIRRER. VELP.
- ✓ Campana extractora de gases. KOTTERMANN.
- ✓ Centrífuga "KINETIC ENERGY". LABNET.
- ✓ Destilador 341. POBERI.
- ✓ Electroforesis MINI-PROTEAN TETRA SYSTEM. BIORAD.
- ✓ Elix. MILLIPORE.
- ✓ Estufa plástico DRYING OVEN. RAYPA.
- ✓ Estufas para secar el material.
- ✓ Máquina de hielo.
- ✓ Microcentrífuga "SPECTRAFUGE24D". LABNET.
- ✓ Microjeringa HAMILTON.
- ✓ Pellet Pestle. SIGMA.
- ✓ Pipetas (200-1000 μ L, 20-200 μ L, 2-20 μ L). LABSYSTEMS. BIOHIT.
- ✓ Sonda homogeneizadora MICRA D-9.
- ✓ Triturador de hielo.
- ✓ Vórtex. RAYPA.

5.1.2 Material fungible.

- ✓ Botellas (de 250 ml a 2000 ml). SIMAX.
- ✓ Eppendorf (1,5-2 ml). DELTALAB SL.
- ✓ Filtros de ultrafiltración AMICON.
- ✓ Geles TGS (4-20% y 12%). BIORAD.
- ✓ Gradillas.
- ✓ Guantes de vinilo.
- ✓ Morteros.
- ✓ Papel absorbente.
- ✓ Papel de aluminio.
- ✓ Papel de filtro.
- ✓ Parafilm. VEMIX
- ✓ Pipetas Pasteur.
- ✓ Probetas (de 100 ml a 2000 ml). NORMAX.
- ✓ Recipientes contenedores de plástico y de poliespan.
- ✓ Tubos, distintos materiales y capacidades.
- ✓ Vasos de precipitados (de 100 ml a 1000 ml). NORMAX.

5.1.3 Reactivos químicos.

- ✓ Acetona Marca PANREAC.
- ✓ Ácido Acético. BAKER.
- ✓ Ácido Clorhídrico. PANREAC.
- ✓ Ácido Tricloroacético. PANREAC.
- ✓ Bicarbonato de Sodio. AIBASA.
- ✓ Biuret. PANREAC.
- ✓ BSA. ROCHE.
- ✓ Cloruro de Sodio. MERK.
- ✓ EDTA. PANREAC.
- ✓ Etanol 96%. BAKER.
- ✓ Glicerol. TERMO.
- ✓ TGS. BIORAD.
- ✓ Pepsina. SIGMA.
- ✓ Pancreatina. SIGMA.

5.1.4 Materiales biológicos.

- ✓ Seta *Calvatia gigantea*.

5.2 Métodos.

Tras preparar las muestras del hongo superior cocinado y sin cocinar se lleva a cabo un proceso común de diálisis para purificar los extractos para posteriormente comparar los perfiles proteínicos de *Calvatia gigantea* sin digerir y digerida. Las proteínas son extraídas mediante dos procesos: precipitación con TCA y lavados de acetona y ultrafiltración. Finalmente se someten a electroforesis que ordenará las proteínas contenidas en cada muestra según su peso molecular.

5.2.1 Preparación de muestras: extracto de *Calvatia gigantea*.

La extracción de muestras nos permite determinar el perfil proteínico de la seta estudiada. Para comparar las proteínas presentes en extractos crudos y cocinados es necesaria una preparación determinada de los mismos. Para ello hay que pesar una porción del cuerpo fructífero y colocarlo en un mortero cerámico, en baño de hielo - agua, estéril. Verter 16 ml de NaCl 0.5 M por cada 4 g de seta. Triturar, lo más fino posible.

Pasar la mezcla a un tubo de plástico de 50 ml y homogeneizarla con la sonda homogeneizadora MICRA D-9.

Finalmente, centrifugar a 3.500rpm y 4°C durante 30 minutos. Recoger los sobrenadantes (fracción mixta de albúminas y globulinas), para su posterior diálisis.

5.2.2 Diálisis de los extractos.

La diálisis es un proceso de filtración molecular que separa las moléculas contenidas en un extracto según su tamaño. Se emplean membranas semipermeables denominadas tripas de diálisis que contienen poros. Estos permiten el paso de las moléculas pequeñas como disolventes, sales, azúcares, etc., a la solución acuosa que rodea el exterior de la membrana, que en nuestro caso se trata de agua Elix. El proceso de diálisis se encuentra explicado en anexos (anexo 2).

5.2.3 Cocinado.

El efecto de la temperatura degrada nutrientes por lo que interesa saber cuáles permanecen en el alimento tras ser cocinado. El fin de este trabajo es conocer el posible contenido de alguna proteína o fracción de la misma que provoque intolerancia a personas susceptibles, por lo que el alimento debe cocinarse para que las pérdidas y transformaciones sean iguales a cuando lo consumimos. La técnica de cocinado utilizada se encuentra descrita en anexos (anexo 2).

5.2.4 Digestiones sucesivas: gástrica e intestinal.

Las digestiones *in vitro* simulan lo que ocurre en nuestro estómago e intestino, produciendo una pérdida y transformación de sustancias debida a la acción de enzimas que degradan las macromoléculas presentes en los alimentos que consumimos y que posteriormente serán usadas por nuestro cuerpo para llevar a cabo multitud de funciones, siendo una de las más importantes la creación de moléculas de ATP, encargadas de aportarnos energía.

Se lleva a cabo en muestras crudas dializadas y muestras cocinadas dializadas.

Gástrica: en un eppendorf de 2 ml, vertemos: 18 μ l de NaCl 2M a pH 1,2 para que actúe la pepsina, 20 μ l de pepsina 3,8 mg/ml, 362 μ l de agua Elix y 800 μ l de muestra. Volumen total: 1200 μ l. También realizamos control de BSA (albúmina sérica bovina por sus siglas en inglés) digerido (50 μ l de BSA, 1112 μ l de agua Elix y el resto de sustancias igual que en las muestras).

Lo sometemos al baño digestor durante 30 min a 37°C y 70 opm.

Este proceso siempre se realizará por duplicado puesto que tenemos que obtener una muestra para electroforesis y otra para someterla a la posterior digestión intestinal.

Intestinal: tras la digestión gástrica, añadimos al eppendorf 100 µl de solución KH_2PO_4 0.5 M + pancreatina 13 mg/ml. Llevamos el pH de la nueva mezcla a 7.5, con NaOH 1 M, para que actúe la pancreatina. Incubamos la muestra a 37°C y 70 opm durante 60 minutos.

5.2.5 Precipitación de las proteínas mediante TCA/acetona.

La precipitación es un proceso de extracción de proteínas que se produce gracias a la acción de TCA. Los ácidos forman sales insolubles al unirse con los iones catiónicos (+) presentes en las proteínas, las cuales precipitan formando pequeñas motitas blanquecinas suspendidas en la muestra. Posteriormente para degradar esas sales insolubles y obtener solamente las proteínas, hay que llevar a cabo varios lavados con acetona. La acetona se encarga de disolver el ácido que previamente se había unido a las mismas. Los pasos a seguir para su realización se encuentran en anexos (anexo 2).

5.2.6 Ultrafiltración.

La ultrafiltración es un proceso de separación, fraccionamiento y concentración de sustancias sin sufrir cambios. Para ello se usa un filtro cerámico que contiene una superficie con poros de tamaño definido que impedirá mayoritariamente el paso del contenido proteico de la muestra, siendo necesaria una presión constante. El contenido no filtrado será nuestra nueva muestra rica en proteínas concentradas. El desarrollo del método está descrito en anexos (anexo 2).

5.2.7 Electroforesis.

La electroforesis es una técnica analítica en la que se separan biomoléculas en disolución como consecuencia del paso de corriente eléctrica. Las biomoléculas poseen carga eléctrica de diferentes magnitudes dependiendo del pH del medio en el que se encuentran. Por ello, estas son desplazadas cuando se someten a la fuerza de un campo eléctrico que les proporciona una velocidad constante y un medio que les proporciona una resistencia de avance, fuerza de fricción o rozamiento.

Fuerza del campo eléctrico = Fuerza de fricción

$$q \cdot E = f \cdot v$$

Donde q es la carga; E la intensidad del campo; f el coeficiente de fricción y v la velocidad de la molécula.

El rozamiento mide la resistencia según la forma y el tamaño de la molécula. A mayor tamaño e irregularidad de su forma, mayor coeficiente de fricción.

En nuestro caso, se trata de una electroforesis zonal de soporte vertical y continua (un solo tipo de gel, 12%) en la que la muestra se aplica como banda y sus componentes migran a través del disolvente. El objetivo es la separación de las proteínas y los aminoácidos pequeños de la muestra según su peso molecular.

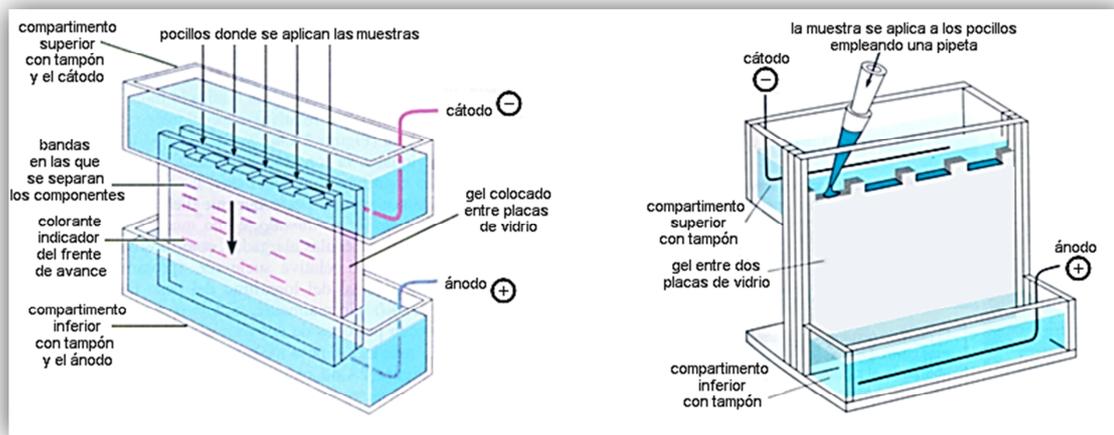


Figura 6. Partes del equipo de electroforesis.

Para realizar electroforesis de muestras precipitadas con TCA, añadimos a cada eppendorf de muestra 36 μ l de agua Elix y 12 μ l de 4 x Laemmli Sample Buffer, que teñirá las muestras y mejorará el paso de la corriente por las mismas en la electroforesis. En el caso de la ultrafiltración, se añadirá 4 x Laemmli Sample Buffer en la cantidad correspondiente a la obtenida de muestra.

Hervimos las muestras problema y los controles durante 3-4 minutos y sometemos a una centrifugación de 500 rpm para mezclar los componentes. Como algunas muestras pueden encontrarse ácidas y la corriente no efectuará la migración de proteínas, añadiremos 1 μ l de NaOH 0.3 M para basificarlas.

Los controles son de BSA compuesto por 2,5 μ l de BSA (10 mg/ml), 6 μ l de 4 x Laemmli Sample buffer y 20,5 μ l agua Elix, de pepsina compuesto por 2,5 μ l de pepsina (3,8 mg/ml), 6 μ l de 4 x Laemmli Sample buffer y 20,5 μ l agua Elix y de pancreatina compuesto por 2,5 μ l de pancreatina (13 mg/ml), 6 μ l de 4 x Laemmli Sample buffer y 20,5 μ l agua Elix.

Sacamos la placa que contiene el gel, guardado en solución 12% TRIS/HCl, retiramos la tira protectora para que se transmita la electricidad y lo colocamos en el soporte con electrodos. Quitamos el peine protector de los pocillos donde pipetearemos las muestras.

Llenamos de tampón Buffer el soporte de los electrodos y la cuba de electroforesis hasta la marca, según el número de geles que hayamos introducido.

Procedemos a pipetear las muestras, con una microjeringa especial de cristal (HAMILTON), en los pocillos. En los pocillos 1 y 12 siempre se pipeteará un patrón, que nos facilitará unos pesos moleculares conocidos para realizar la recta patrón, y a partir de la misma interpolar y extraer los pesos moleculares relativos de las muestras problema. Tras 25 minutos la electroforesis habrá finalizado llegando las bandas al borde del gel.

5.2.8 Fijación y tinción de proteínas.

Para la fijación de proteínas es necesario evitar su hidrólisis, produciendo deshidratación y coagulación de las mismas para la conservación de las bandas resultantes en el gel tras la electroforesis. Esto se produce gracias a la acción de la solución de Fixino, compuesta por un 40% de etanol y un 10% de ácido acético.

La tinción de las bandas anteriormente fijadas para su mejor visualización se lleva a cabo con QC Colloidal Coomassie Stain. Es un compuesto coloreado que se une a las proteínas aportándolas un color azul brillante mediante la saturación de sus enlaces. La explicación paso a paso está en anexos (anexo 2).

5.2.9 Enmarcación del gel.

Para una óptima conservación y manejo de los geles conviene forrarlos con celofán tras sumergir el gel en una solución compuesta por un 10% de glicerol y un 20% de etanol, lo que les aporta consistencia gracias a la extracción de las moléculas de agua del gel. El desarrollo del método está detallado en anexos (anexo 2)

5.2.10 Determinación del peso molecular.

Para conocer los pesos moleculares relativos de las proteínas visibles en los geles, se usa la interpolación. Este cálculo puede efectuarse puesto que en ciertos pocillos de los geles, pinchamos una solución patrón de pesos moleculares conocidos que nos permite representar una recta patrón.

Nosotros hemos usado un patrón para geles de 4-20% por lo que no obtendremos una recta en la representación, sino una parábola en la cual interpolaremos nuestros datos de las muestras problema.

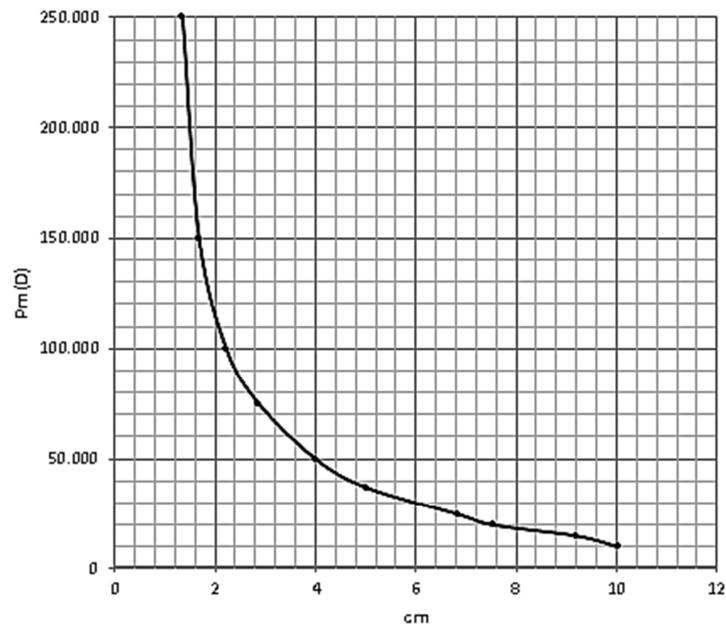


Figura 7. Parábola patrón de los pesos moleculares proteínicos.

5.2.11 Método del Biuret.

Es usado para medir la cantidad de proteínas de extractos de alimentos. La concentración en proteínas de las muestras a estudiar se obtiene por la interpolación de las absorbancias obtenidas en una recta patrón, elaborada con patrones de concentración conocida en proteína BSA.

El biuret es un reactivo, de color azul, formado por sulfato de cobre que reacciona con los grupos $-NH$ de las proteínas. Se forma un complejo con éstas gracias al Cu^{+2} , tornando la mezcla a color violeta. A más intensidad de color, mayor contenido en proteínas tendrá la muestra.

La cantidad de proteínas que contienen las muestras la medimos gracias a un espectrofotómetro que deja pasar un haz de luz, la cuál será absorbida por las proteínas presentes en las mezclas. El desarrollo de esta actividad está explicado en anexos (anexo 2).

6 RESULTADOS

6.1 Método del Biuret.

Tras realizar la espectrofotometría de las muestras patrón y problema, representar la recta patrón e interpolar las absorbancias de las muestras problema, obtenemos los siguientes resultados:

<i>Calvatia gigantea</i> no cocinada	4,13 g / 4,13%
<i>Calvatia gigantea</i> no cocinada y dializada	2,76 g / 2,76%
<i>Calvatia gigantea</i> no cocinada, dializada y sometida a digestión gástrica	1,49 g / 1,49%
<i>Calvatia gigantea</i> no cocinada, dializada y sometida a digestión gástrica e intestinal	1,93 g / 1,93%
<i>Calvatia gigantea</i> cocinada	22,46 g / 22,46%
<i>Calvatia gigantea</i> cocinada y dializada	1,97 g / 1,97%
<i>Calvatia gigantea</i> cocinada, dializada y sometida a digestión gástrica	1,62 g / 1,62%
<i>Calvatia gigantea</i> cocinada, dializada y sometida a digestión gástrica e intestinal	2,17 g / 2,17%

Tabla 2. Resultados de cantidades de proteínas en las muestras problema.

Las absorbancias de las muestras cocinadas son más altas debido a la coloración que las setas adquieren al someterlas a la acción del calor, por lo que no muestran las cantidades reales de proteínas. Al saltearlas pierden proteínas tanto cuantitativamente como cualitativamente y lo vemos reflejado en el resultado de la muestra cocinada dializada, en la que la cantidad disminuye notablemente respecto a la muestra sin cocinar dializada.

Se aprecia que las muestra cuanto más natural, mayor cantidad de proteínas y cuanto más procesada menor, excepto en las muestras sometidas a ambas digestiones consecutivas, que aumentan debido a la gran cantidad de encimas que contiene la pancreatina usada para realizar la digestión intestinal *in vitro*.

El método de espectrofotometría mide la cantidad de proteínas de los extractos por colorimetría, por lo que los porcentajes de proteínas de las muestras cocinadas no muestran cantidades reales de proteína. Esto se debe a las sustancias que se generan durante el procesado por la reacción de Maillard. Sin embargo, los datos de las muestras no cocinadas si son válidos.

6.2 Electroforesis.

Tras realizar las electroforesis de las diferentes muestras de *Calvatia gigantea*, vemos que resiste alguna proteína tanto a la digestión como al cocinado. Comentamos los resultados de la electroforesis realizada con muestras sometidas a ultrafiltración puesto que las bandas se ven con más claridad que en las sometidas a precipitación con TCA. Esto se debe a que la ultrafiltración elimina polisacáridos que han resistido a la diálisis y sin embargo en el método de precipitación con TCA, estos precipitan junto a las proteínas y enmascaran el resultado.

Además, hemos corregido el efecto smile informáticamente que puede estar causado por un aumento de la temperatura del buffer durante la electroforesis.

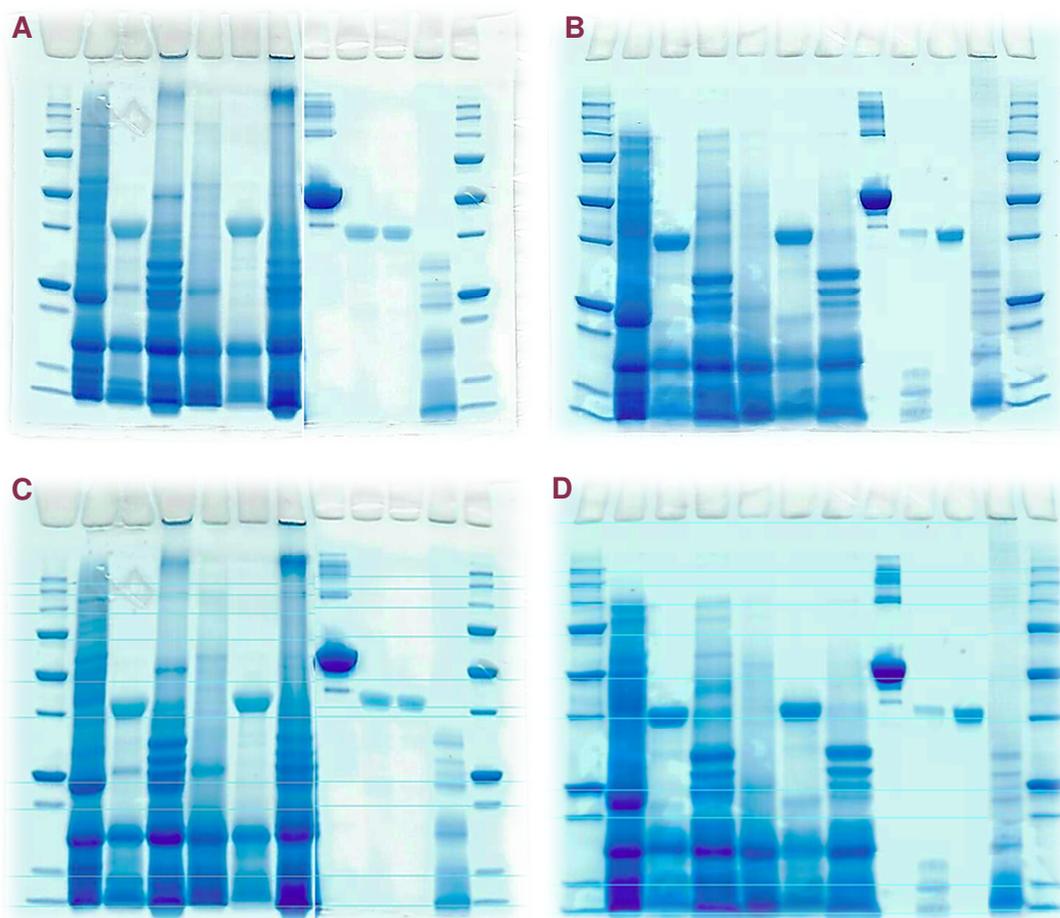


Figura 8. Diferencia de la visualización de bandas entre los métodos. A, TCA con smile; B, ultrafiltración con smile; C, TCA con efecto smile corregido y D, ultrafiltración con efecto smile corregido.

Por tanto las condiciones de la imagen D son las que hemos utilizado para obtener nuestros resultados, ultrafiltración y efecto smile corregido y las encontramos en la siguiente página, 27, que es desplegable (figura 10).

Electroforesis sin corregir el efecto smile y corregido, completas.

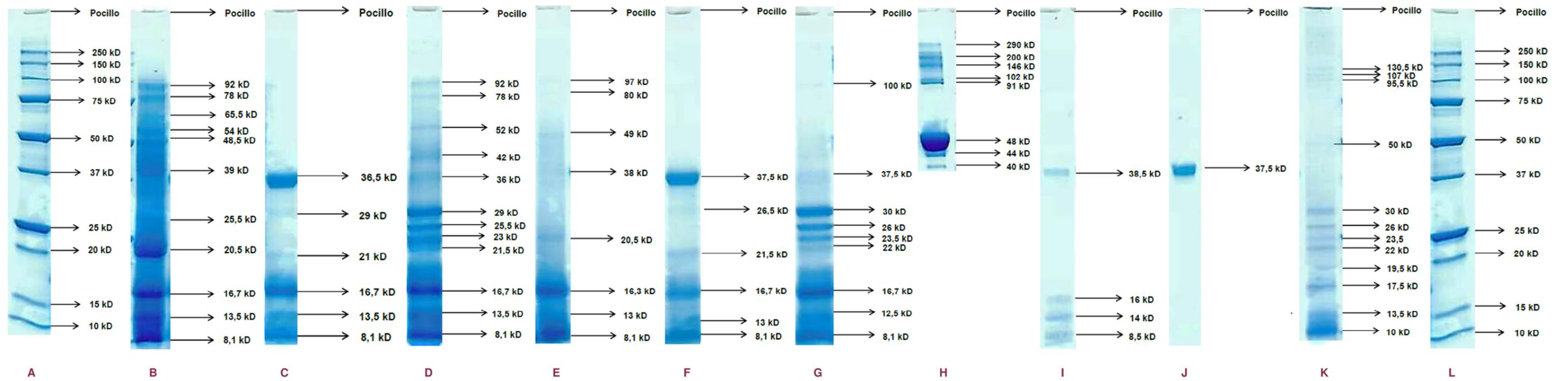


Figura 9. Electroforesis sin corregir efecto smile. Dónde: A, patrón; B, no cocinada; C, no cocinada sometida a digestión gástrica; D, no cocinada sometida a digestión gástrica e intestinal; E, cocinada; F, cocinada sometida a digestión gástrica; G, cocinada sometida a digestión gástrica e intestinal; H, BSA; I, BSA sometido a digestión gástrica; J, pepsina; K, pancreatina y L, patrón.

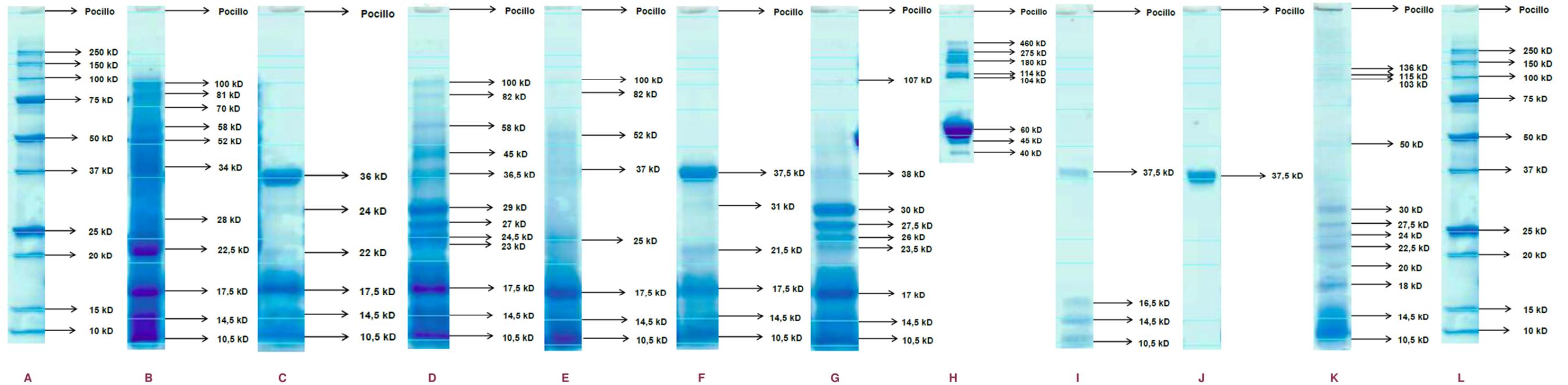


Figura 10. Corregido efecto smile. Dónde: A, patrón; B, no cocinada; C, no cocinada sometida a digestión gástrica; D, no cocinada sometida a digestión gástrica e intestinal; E, cocinada; F, cocinada sometida a digestión gástrica; G, cocinada sometida a digestión gástrica e intestinal; H, BSA; I, BSA sometido a digestión gástrica; J, pepsina; K, pancreatina y L, patrón.

En las figuras 9 y 10 observamos que hay 3 bandas que resisten todos los procesos a los que han sido sometidas las muestras de *Calvatia gigantea*. Son las correspondientes a los pesos moleculares relativos de 16,7, 13,5 y 8,1 kD, en el caso de la electroforesis sin corregir el efecto smile (figura 9) y de 17,5, 14,5 y 10,5, en la que sí ha sido corregido (figura 10). La corrección de los pesos moleculares es mayor en las bandas de menor peso molecular puesto que el efecto smile es más pronunciado por el aumento paulatino de la temperatura del buffer. Para ver detalladamente lo que ocurre veremos las diferencias apreciables entre cada proceso usando la figura 10, con efecto smile corregido:

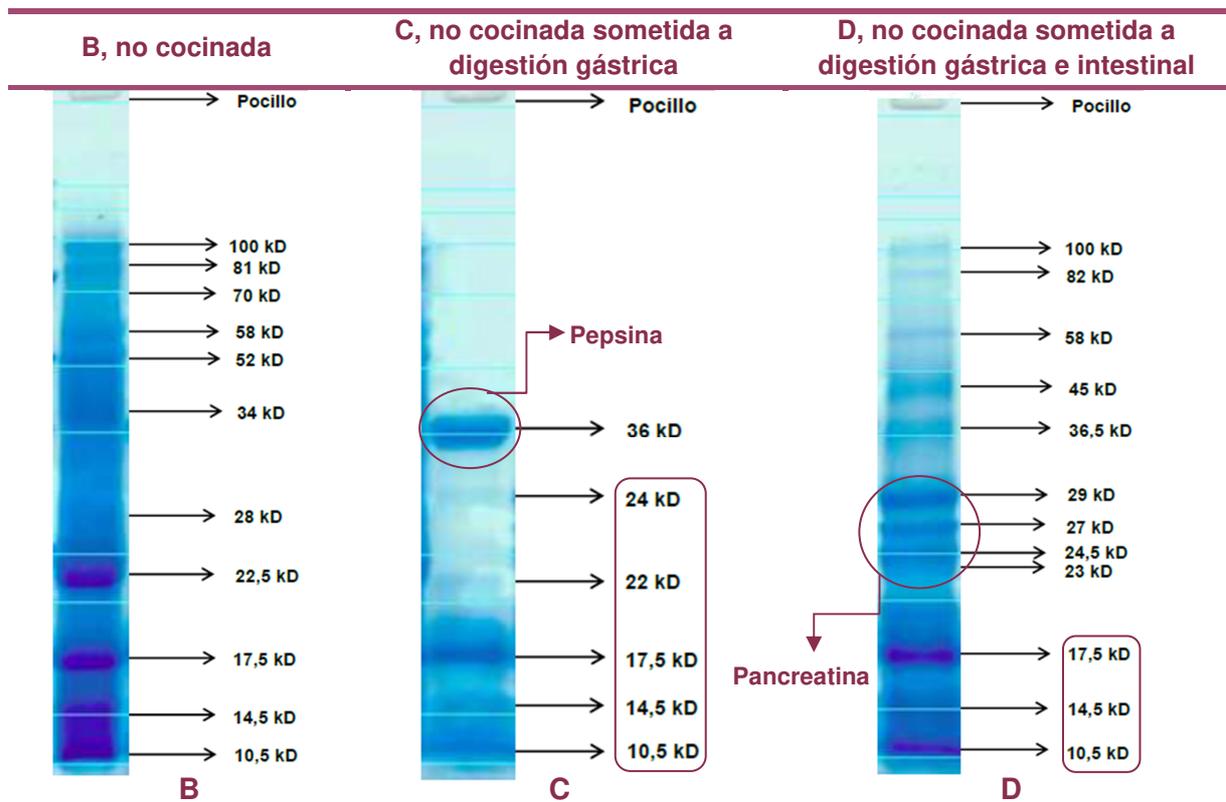


Figura 11. Resultados comparados de muestras no cocinadas.

- **B, no cocinada:** aparecen 11 bandas con pesos moleculares que van desde 100 hasta 10,5 kD.
- **C, no cocinada sometida a digestión gástrica:** obtenemos 5 bandas con pesos moleculares que van desde 10,5 a 24 kD. Una de ellas, de 24 kD, pueden ser un péptido derivado de la degradación proteica. La de 17,5 kD se mantiene, mientras que la de 22, 14,5 y 10,5 kD disminuyen respecto a la no cocinada (imagen B).
- **D, no cocinada sometida a digestión gástrica e intestinal:** la pancreatina, digiere el posible péptido originado en la digestión gástrica y una de las proteínas, de 22 kD, pero no altera 3 proteínas, de 17,5 kD, 14,5 kD y 10,5 kD.

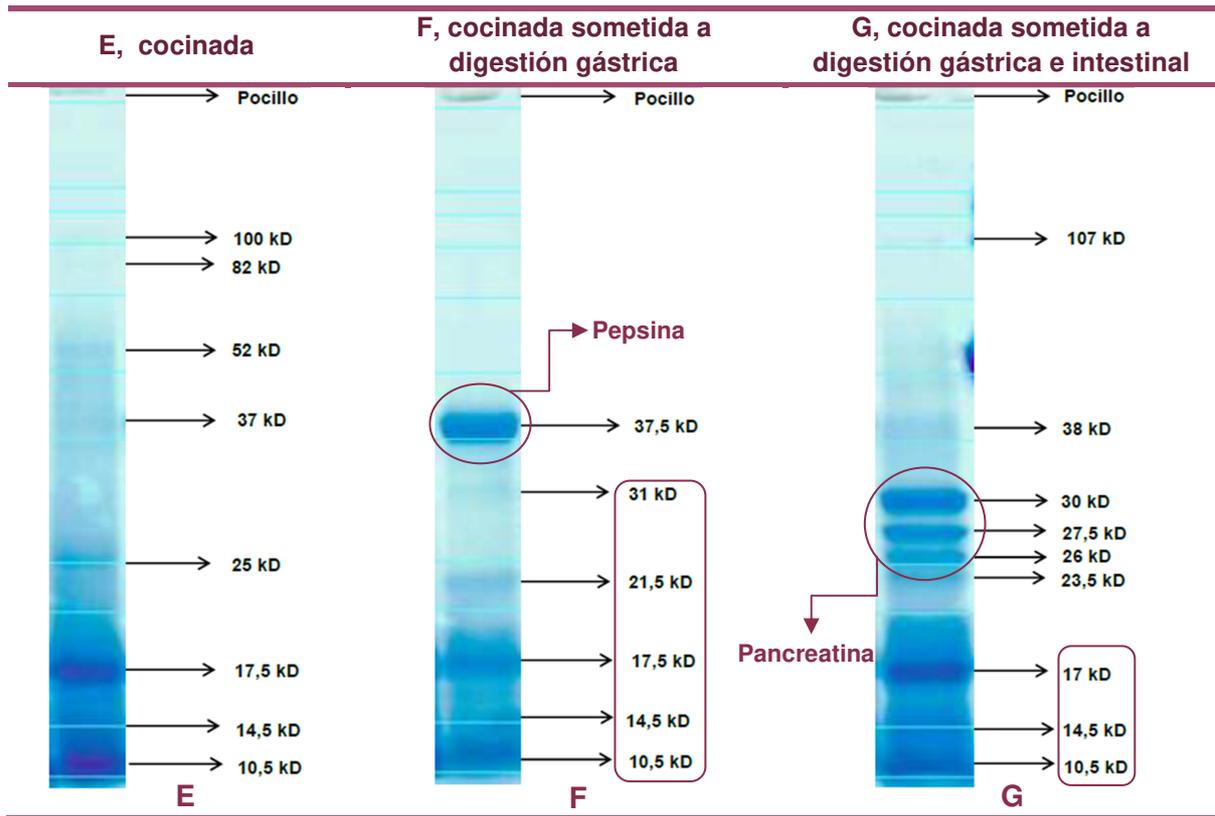


Figura 12. Resultados comparados de muestras cocinadas.

- **E, cocinada:** el efecto de la temperatura degrada 3 proteínas, de 70, 58 y 22,5 kD, pasando el número total de bandas de 11 a 8, respecto a la no cocinada (imagen B).
- **F, cocinada sometida a digestión gástrica:** obtenemos 5 bandas. Una de ellas, de 31 kD, pueden ser un péptido derivado de la degradación proteica. La de 17,5 kD se mantiene, mientras que la de 21,5, 14,5 y 10,5 kD disminuyen respecto a la cocinada (imagen E).
- **G, cocinada sometida a digestión gástrica e intestinal:** ocurre lo mismo que en caso de las muestras no cocinadas, manteniéndose las mismas 3 proteínas de 17,5 kD, 14,5 kD y 10,5 kD.

La Calvacina puede ser la proteína de mayor peso molecular que aparece en las electroforesis. En la que hemos corregido el efecto smile tiene un peso molecular de 100 kD (figura 10). Desaparece con la acción de la pepsina en la digestión gástrica pero no con el cocinado.

En las digestiones se han restado las bandas que pertenecen a pepsina y a pancreatina, para describir los resultados.

7 DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en las digestiones de la seta cruda y cocinada no pueden ser comparados puesto que nunca se ha realizado digestión *in vitro* de *Calvatia gigantea*. Tampoco podemos contrastar nuestra digestión dado que en los estudios encontrados, las realizan de forma paralela y simultánea. Nosotros la hemos ejecutado de manera continua por lo que tras transcurrir el tiempo de la digestión gástrica, recoger parte de la muestra para ser analizada y modificar el pH para condiciones intestinales, procedíamos a someterla a digestión intestinal.

Las cantidades de proteínas resultantes de la aplicación del método del Biuret, tampoco pueden compararse con los datos de cantidades de proteínas de la composición nutricional que hemos descrito, pertenecientes a la investigación de Israel Kivrak. Nuestro método mide la cantidad de proteínas por colorimetría, mientras que en el de Kivrak se determina la composición química completa de este hongo mediante tratamientos más exactos de extracción de cada sustancia. Por ello a nosotros nos resultan cantidades de proteínas de 4,13%, mientras que ellos obtienen 34,37%.

En cuanto a la banda obtenida de posible calvacina, que no se destruye con el cocinado, nuestro organismo puede beneficiarse de las ventajas de esta sustancia. Su peso molecular está en torno a los 100 - 120 kD. En la figura 9, sin corregir el efecto smile se situaría entre 92 y 100 kD. En la figura 10, corregido el efecto estaría entre 100 y 107 kD. No podemos asegurar que se trate de esta glucoproteína puesto que no hay datos exactos del peso molecular. Además las proteínas fúngicas inmunomoduladoras (FIP'S) tienen un peso molecular en torno a 15 kD, por lo que alguna de estas proteínas que se mantienen tras el cocinado y las digestiones gástricas e intestinal podría ser una de ellas.

El efecto smile nos complica la obtención de los pesos moleculares de las proteínas, por ello siempre hablamos de peso molecular relativo. Aunque tengamos las figuras corregidas, tampoco son exactas. La aparición de este efecto se debe al aumento de la temperatura del Buffer con el paso de la electricidad, a la resistencia del paso de la misma por parte de la muestra y a la tendencia de estas a hacer difusión lateral. Para saber cuáles serían los pesos moleculares exactos de las proteínas de interés y si la banda contiene sólo una proteína, varias o también algún péptido, tendrían que ser analizadas por proteómica que se encarga del estudio de la función y estructura de las proteínas, mediante el fraccionamiento y la separación por diferentes técnicas de cromatografía.

8 CONCLUSIONES

- ✓ El procedimiento de concentración de proteínas del extracto mediante la utilización del TCA en frío, si bien permite la concentración de proteínas, no garantiza la separación de estas y de los polisacáridos, lo cual da como resultado unos geles de difícil interpretación.
- ✓ La concentración mediante ultrafiltración da mejores resultados que el procedimiento de precipitación con TCA obteniéndose geles más limpios.
- ✓ Es la primera vez que se obtiene el perfil electroforético de la seta *Calvatia gigantea* encontrándose proteínas desde 100 hasta 10,5 kD, siendo las proteínas mayoritarias de 22,5 y 17,5 kD.
- ✓ La digestión gástrica permite la degradación de gran número de proteínas excepto la proteína de 17,5 kD y proteínas desde 14,5 a 10,5 kD.
- ✓ La digestión intestinal aparentemente degrada las proteínas que resisten la digestión gástrica.
- ✓ El cocinado de la seta mediante salteado suave conduce a la degradación de gran número de proteínas, siendo de destacar la resistencia de las proteínas de 17,5, 14,5 y 10,5 kD.
- ✓ La digestión gástrica e intestinal de setas cocinadas ofrece resultados similares a los obtenidos en la digestión de las setas crudas, por lo que el cocinado parece destruir sólo las proteínas lábiles, sin afectar esencialmente las proteínas resistentes a pepsina y pancreatina.

* Los pesos moleculares relativos que se indican en este apartado de conclusiones, corresponden a la electroforesis con corrección del efecto smile, al igual que en los resultados (figura 10).

9 BIBLIOGRAFÍA

- 1) Calonge FD. Hongos medicinales. Bol Soc Micol Madrid. 1993; 18:179-88.
- 2) Calonge FD. Hongos medicinales. Madrid: Ediciones Mundi-prensa; 2011. 130 p.
- 3) Díaz-Corpas T, Mateu-Puchades A, Coll-Puigserver MN, Marquina-Vila A. Dermatitis flagelada tras la ingesta de setas del género Shiitake. Actas Dermosifiliogr [Internet]. diciembre de 2011 [citado 1 de mayo de 2018]; 102(10):830-2. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001731011002900>
- 4) Electroforesis [Internet]. [citado 14 de mayo de 2018]. Disponible en: <http://biomodel.uah.es/tecnicas/elfo/inicio.htm>
- 5) Elisashuli V, Wasser SP, Tan KK. Hypoglycemic, interferogenous and immunomodulatory activity of tremellastin, from submerged culture of Tremella mesenterica. Int J Med Mushrooms. 2002; 4:215-97.
- 6) El-Mekkawi S, Al. &. Anti-HIV-1 and anti-HIV-1-protease substances from Ganoderma lucidum. Phytochemistry. 1998; 49:1651-827.
- 7) El-Registan GI, Mulyukin AL, Nikolaev Y, Suzina NE, Gal'chenko VF, Duda VI. Adaptogenic functions of extracellular autoregulators of microorganisms. Mikrobiologiya. 2006;75(446-456).
- 8) Elsayed EA, El Enshasy H, Wadaan MAM, Aziz R. Mushrooms: A potential natural source of anti-inflammatory compounds for medical applications. Mediators Inflamm. 2014; 2014.
- 9) Eroğlu C, Seçme M, Atmaca P, Kaygusuz O, Gezer K, Bağcı G, et al. Extract of *Calvatia gigantea* inhibits proliferation of A549 human lung cancer cells. Cytotechnology [Internet]. 28 de octubre de 2016 [citado 16 de mayo de 2018]; 68(5):2075-81. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26820971>
- 10) Hamilton GJ, Castrejón RN. Ergosterol peroxide, an intermediate in ergosterol biosynthesis. Fed Proc. 1966; 25:201.
- 11) Hetland G, Eide DM, Tangen JM, Haugen MH, Mirlashari MR, Paulsen JE. The *Agaricus blazei*-based mushroom extract, andosanTM, protects against intestinal tumorigenesis in the A/J Min/+ Mouse. PLoS One. 2016; 11(12):1-15.
- 12) INT (Instituto Nacional de Toxicología). Informe Toxicológico 2016. 2018.
- 13) James D. Astwood JNL& RLF. Stability of food allergens to digestion in vitro. Nat Biotechnol [Internet]. 1996; 14(3):303-8. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nbt1096-1269>

- 14) Jin X, Beguerie J, Sze M, Chan G. Ganoderma Lucidum (Reishi mushroom) for cancer treatment [Intervention Review of 2009 article]. Cochrane Database Syst Rev [Internet]. 2009; 13(6):1-39. Disponible en: <https://researchbank.rmit.edu.au/view/rmit:31909>
- 15) Khakzad Z, Hedayati MT, Mahdian S, Mayahi S. Serum immunoglobulin E and immunoglobulin G reactivity to Agaricus bisporus proteins in mushroom cultivation workers. Curr Med Mycol [Internet]. 2015; 1(2):25-30. Disponible en: <http://cmm.mazums.ac.ir/article-1-54-en.html>
- 16) Kivrak I, Kivrak S, Harmandar M. Bioactive Compounds, Chemical Composition, and Medicinal Value of the Giant Puffball, *Calvatia gigantea* (Higher Basidiomycetes), from Turkey. Int J Med Mushrooms [Internet]. 2016 [citado 16 de mayo de 2018]; 18(2):97-107. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27279532>
- 17) Klupp NL, Chang D, Hawke F, Kiat H, Cao H, Grant SJ, et al. Ganoderma lucidum mushroom for the treatment of cardiovascular risk factors. 2015;(2). Disponible en: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=coch&NEWS=N&AN=00075320-100000000-05891>
- 18) La Micología aplicada a la salud (MICOTERAPIA). [citado 1 de mayo de 2018]; Disponible en: <https://xerradesdemar.files.wordpress.com/2017/02/micoterapia-article-cast.pdf>
- 19) Lau CC, Abdullah N, Shuib AS, Aminudin N. Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from edible mushroom Agaricus bisporus (J.E. Lange) Imbach identified by LC-MS/MS. Food Chem [Internet]. 2014; 148:396-401. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.053>
- 20) León F, Valencia M, Rivera A, Nieto I, Quintana J, Estevez R, et al. Novel cytostatic lanostanoid triterpenes from Ganoderma australe. Helv Chim. 2003; 86:3088-95.
- 21) List PH, Hörhammer L. Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis. Springer-Verlag, New York. 1973; 7.
- 22) Mauvernay RY, Al. &. Glycoprotein extracted from the mushroom Psalliota xanthoderma and its application in anti-viral therapy. Cent Eur Rech Mauvernay, Riom, Fr. 1978;
- 23) Milton JM, Konuk M, Brown G. Lepista nebularis producer of nebularina. My- Col. 1992; 6: 44-5.
- 24) Minekus M, Alminger M, Alvito P, Ballance S, Bohn T, Bourlieu C, et al. A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international

- consensus. *Food Funct* [Internet]. 2014 [citado 22 de enero de 2018]; 5(5):1113-24. Disponible en: http://publications.lib.chalmers.se/records/fulltext/200281/local_200281.pdf
- 25) Mizuno T. Bioactive substances in *Hericium erinaceus* (Bull.:Fr.) Pers. (Yamabushitake), and its medicinal utilization. *Int J Med Mushrooms*. 1999; 1:105-19.
- 26) Money NP. Are mushrooms medicinal? *Fungal Biol* [Internet]. 2016; 120(4):449-53. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2016.01.006>
- 27) Moreno FJ. Gastrointestinal digestion of food allergens: Effect on their allergenicity. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2007; 61(1):50-60. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17188456>
- 28) Ortega A, Piqueras J, Amate P. Setas. Identificación. Toxicidad. *Gastromicología*. Granada: Proyecto Sur de ediciones, S.L.; 1996. 469 p.
- 29) Palazón Lozano F. Setas para todos. octubre de. Huesca: Pirineo; 2001. 654 p.
- 30) Piqueras-Carrasco J. Intoxicaciones por setas, una actualización. *Rev Española Med Leg* [Internet]. enero de 2014 [citado 1 de mayo de 2018];40(1):19-29. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0377473213000369>
- 31) Rey A, Garea M, Lago JC. Agrupación Micológica A Zarrota - Glosario Micológico [Internet]. 2007 [citado 1 de mayo de 2018]. Disponible en: http://www.azarrota.org/index.php?option=com_content&task=view&id=36&Itemid=62
- 32) Roland JF, Chmielewicz ZF, Weiner BA, Gross AM, Boening OP, Luck JV, et al. Calvacin a new antitumor agent. 1960; 1897.
- 33) Roncero Ramos I. Propiedades nutricionales y saludables de los hongos [Internet]. Centro Tecnológico de Investigación del Champiñón de La Rioja (CTICH). 2015. p. 64. Disponible en: www.ctich.com
- 34) Saboulard D, Gaspar A, Roussel B, Villard J. New antiherpetic nucleoside from a Basidiomycete. *Comptes Rendus l'Academie des Sci Ser III*. 1998; 321:585-91.
- 35) Sánchez Rodríguez JA, García Blanco A. Atlas de los hongos de Castilla y León. León: IRMA, S.L.; 2008. 479 p.
- 36) SIT. Intoxicaciones por setas [Internet]. Disponible en: <http://www.mjusticia.gob.es/cs/Satellite/Portal/1292428320105?blobheader=aplicati>
- 37) Sternberg SS, Philips FS, Cronin AP, Sodergren JE, Vidal PM. Toxicological Studies of Calvacin. *Cancer Res*. 1963; 23(9):1036-44.

- 38) Truyols JL, Casellas NM. Hongos medicinales: prevención y apoyo al tratamiento del cáncer. *Aliment Nutr y Salud* [Internet]. 2011; 18:16-23. Disponible en: http://www.institutodanone.es/assets/ans_1_2011.pdf
- 39) Wang Q, Wang F, Xu Z, Ding Z. Bioactive mushroom polysaccharides: A review on monosaccharide composition, biosynthesis and regulation. *Molecules*. 2017; 22(6).
- 40) Wasser S. Medicinal mushroom science: Current perspectives, advances, evidences, and challenges. *Biomed J* [Internet]. 2014 [citado 13 de diciembre de 2017]; 37(6):345. Disponible en: http://biomedj.cgu.edu.tw/pdfs/2014/37/6/images/BiomedJ_2014_37_6_345_138318.pdf
- 41) Wasser S. Medicinal mushroom science: Current perspectives, advances, evidences, and challenges. *Biomed J* [Internet]. 2014 [citado 13 de diciembre de 2017]; 37(6):345. Disponible en: http://biomedj.cgu.edu.tw/pdfs/2014/37/6/images/BiomedJ_2014_37_6_345_138318.pdf
- 42) Wasser S. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2003; 60:258-74. Disponible en: http://фyнro.рф/upload/files/_wasser_polysaccharide.pdf
- 43) Wickham M, Faulks R, Mills C. In vitro digestion methods for assessing the effect of food structure on allergen breakdown. *Mol Nutr Food Res* [Internet]. 2009; 53(8):952-8. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19603399>
- 44) Yokota ME, Frison PS, Marcante RC, Jorge LF, Valle JS, Dragunski DC, et al. Iron translocation in *Pleurotus ostreatus* basidiocarps: Production, bioavailability, and antioxidant activity. *Genet Mol Res*. 2016; 15(1):1-10.

10 ANEXOS

Anexo 1. Informe del Instituto Nacional de Toxicología: año 2016.



MINISTERIO
DE JUSTICIA

INSTITUTO NACIONAL DE TOXICOLOGÍA
Y CIENCIAS FORENSES

INT
CIENCIAS FORENSES

NOTIFICACION

A/A Iris Omil
irisomil1993@gmail.com

S/REF.
N/REF. M_E18_06004
FECHA 09/04/18
ASUNTO COMUNICACIÓN

El Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses (INTCF) se articula según la Ley Orgánica del Poder Judicial (LOPJ) como órgano consultor de la Administración de Justicia. Su finalidad es asesorar a Jueces, Magistrados, Fiscales y Tribunales acerca de materias de orden toxicológico. Por ello, emite informes a instancia de los mismos cuando así es requerido por la Administración de Justicia.

En él se integra el Servicio de Información Toxicológica (SIT) que asume, entre otras, la función de emitir tanto informes toxicológicos judiciales como clínicos a petición de un organismo oficial y de particulares en caso de intoxicación por ser un servicio médico integrado por Médicos Forenses y Facultativos que actúan como peritos oficiales judiciales. El INTCF contribuye a la unidad de criterio científico y a la calidad de la pericia analítica, así como al desarrollo de las ciencias forenses, tal y como se establece por ley.

Respecto a su petición, los datos estadísticos de nuestro Servicio están publicados en nuestras Memorias Anuales, correspondiendo la última al año 2016 y a disposición pública.

Por otra parte, dentro de nuestros registros dados a conocer mediante dichos documentos, reflejamos los datos estadísticos epidemiológicos generales sin aportar casuística específica de las setas responsables de cada intoxicación.

Durante dicho año se recibieron en este Servicio 90.922 consultas. Tras la revisión informática correspondiente para localizar aquellas en las que el motivo estuviera relacionado con Setas, se recogen 168 consultas (0,18% del total recibido).

La llamada tipo se trata de una consulta desde un centro médico por la exposición de un adulto por vía oral a una seta sin identificar y en el último trimestre anual.

Se añade que el consumo de setas puede producir diversos cuadros de toxicidad, generalmente aguda, de una intensidad variable y que puede llegar a la letalidad por daño hepático irreversible. Se conocen más de 5000 variedades de setas. En España están catalogadas más de 1500 especies, de las cuales entre 50 y 70 pueden considerarse ciertamente tóxicas y sobre una decena letales.

Los cuadros de intoxicación se producen al confundirlas por su similitud en múltiples aspectos, con otras setas comestibles. Estos cuadros son más frecuentes en otoño, en particular en época de lluvias aunque pueden ocurrir durante todo el año. Es necesario tener en cuenta que en una misma ingesta se pueden tomar a la vez varios tipos de setas.

CORREO ELECTRÓNICO:
intcf.sit@justicia.es

Página 1 de 1

C/ José Echegaray, 4 SIT
28232 Las Rozas de
Madrid (MADRID)
TLF: + (34) 91 766 98 00
FAX: + (34) 91 564 88 54



MINISTERIO
DE JUSTICIA

N/REF. M_E18_06004
FECHA . 09/04/18

combinando especies que sean causantes de cuadros clínicos de diferente gravedad y pronóstico con otras incluso comestibles.

Para ayuda a su petición y respecto a la información que sugiere, los trastornos causados por especies comestibles no siempre han de tener lugar, fundamentándose en su caso en síntomas digestivos como náuseas, vómitos y leve diarrea, normalmente autolimitada en el tiempo y sin mayores consecuencias médicas.

Las Rozas de Madrid, a 9 de Abril de 2018

SERVICIO DE INFORMACION TOXICOLOGICA



CORREO ELECTRÓNICO:
sit@mju.es

Página 2 de 2

C/ José Echegaray, 4
28232 Las Rozas de
Madrid (MADRID)
TLF: + (34) 91 768 98 00
FAX: + (34) 91 564 86 54

Anexo 2. Métodos: procedimientos.

Diálisis de los extractos.

1. Preparamos un fragmento de tripa de diálisis de unos 15 cm de largo y entre 2 y 2,5 cm de ancho. Lo lavamos por fuera minuciosamente, dejando correr agua Elix sobre toda la superficie, en bastante cantidad y varias veces.
2. Hacemos un nudo a uno de los extremos. Vertemos agua en su interior. Cerramos el otro extremo y movemos el agua dentro de la misma, de un lado a otro, varias veces, con el fin de lavar la tripa por dentro. Tiramos el agua. Repetimos esta operación entre 3 y 5 veces.
3. Una vez limpia introducimos la muestra dejando una cámara de aire, anudaremos el otro extremo para que la tripa quede totalmente cerrada.
4. Introducimos la tripa en una garrafa con 5 L de agua Elix y dializamos la muestra.

Cocinado.

Tras hidratar una porción de la seta, la cortamos en láminas de unos 3 mm de grosor. En una sartén caliente a una temperatura entre 200-220°C, colocamos las láminas durante 2 minutos por cada lado. Tras esto, se procede a la extracción de muestras y su posterior diálisis, procesos anteriormente explicados.

Precipitación de las proteínas mediante TCA/acetona.

Se lleva a cabo en seta cruda dializada, seta cocinada dializada y muestras de ambas sometidas a digestión gástrica e intestinal.

1. Añadir 200 µl de TCA al 50% a 800 µl de la muestra y mantener la mezcla en baño de hielo - agua durante 30 minutos para permitir la precipitación de las proteínas.
2. Centrifugar la mezcla a 11.000rpm durante 15 minutos en la microcentrífuga "SPECTRAFUGE 24D".
3. Desechar el sobrenadante y con una pieza de papel absorbente fina, retirar el TCA sobrante.
4. Llenar 3/4 del eppendorf con acetona fría y con ayuda del pellet Pestle, limpiar bien los restos de TCA en la proteína precipitada. Centrifugar de igual manera que se ha descrito en el punto 2. Repetir el punto 3. Este proceso se realizara 3 veces para eliminar todo el TCA.

Ultrafiltración.

Tras observar resultados interesantes en las electroforesis de las muestras precipitadas con TCA/acetona, conviene utilizar un método más limpio, pero más costoso económicamente, que sustituye al nombrado. Es un método más fino y preciso de extracción de proteínas. Se llevará a cabo en muestra de seta cruda dializada, seta cocinada dializada y muestras de ambas sometidas a digestión gástrica e intestinal.

1. Colocamos 500µl de cada muestra a analizar en tubos de ultrafiltrado para centrifuga. Los ponemos en hielo hasta su centrifugación.
2. Centrifugamos durante 20 minutos a 11.000rpm.
3. Sacamos los filtros de los tubos y los colocamos de manera inversa en unos tubos nuevos, esterilizados, como se muestra en la figura 13. Les damos un pulso de 10 segundos, para recoger el contenido sobrante de las muestras que se ha quedado en ellos durante la centrifugación (contenido no filtrado: proteínas).
4. Medimos las cantidades obtenidas y calculamos la proporción de Sample Buffer que hay que añadir, sabiendo que este se encuentra concentrado 4 veces.

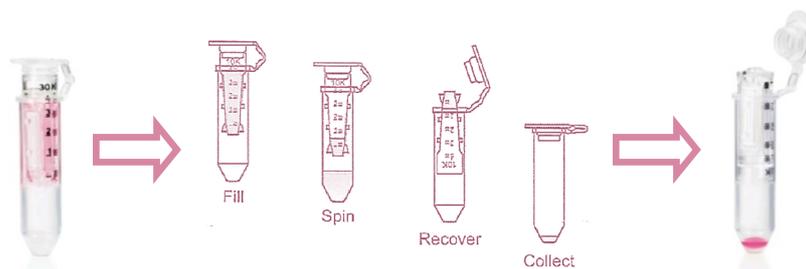


Figura 13. Tubo de ultrafiltrado antes de la centrifugación y tras el pulso final.

Fijación y tinción de proteínas.

1. Sacamos el gel del soporte y lo ponemos en un recipiente con agua Elix..
2. Transcurridos 2 minutos quitamos el agua y vertemos solución Fixino (40% etanol del 96% + 10% ácido acético) que fija las proteínas al gel. Por seguridad, este paso ha de llevarse a cabo en la campana extractora. Tapamos el recipiente y lo ponemos en balanceo continuo 15 minutos.
3. Retiramos la solución y limpiamos con agua Elix el gel durante 2 minutos.
4. Retiramos el agua y lo cubrimos con tinte QC Colloidal Coomassie Stain. Tapamos el recipiente y lo dejamos en balanceo continuo hasta el día siguiente.

5. Retiramos el tinte y vertemos de nuevo agua Elix para eliminar el exceso de este. Tras 20 minutos de lavado con balanceo continuo, realizamos otro cambio de agua, que dejaremos actuar durante otros 20 minutos.
6. Finalizado el lavado, retiramos el agua y añadimos solución glicerol al 10% y etanol del 96% al 20%. La dejamos actuar durante 15 minutos. El alcohol desplazará el agua que contiene el gel y lo sustituirá por glicerol, aportando resistencia al mismo.

Enmarcación del gel.

1. Cortamos unas porciones de celofán y las ponemos a hidratar 2 minutos para que se ablande y sea más manejable.
2. Colocamos la placa trasera con el borde biselado hacia abajo y ponemos uno de los celofanes estirado, con cuidado de que no queden burbujas entre este y el cristal.
3. Ponemos el gel sobre el celofán, con cuidado de que no queden burbujas y de que no se agriete el gel.
4. Colocamos la otra hoja de celofán hidratado sobre el gel y en caso de que quedasen burbujas, las eliminaríamos deslizando por encima un tubo de cristal.
5. Disponemos la otra parte de cristal con forma de marco, con el borde biselado hacia arriba. Nos aseguramos de que el marco cubre todos los bordes del celofán.
6. Colocamos unas pinzas que sujetan y ejercen presión en el reborde del enmarcado.
7. Lo dejamos secar 2-3 días. Después se retiran las pinzas y los marcos con cuidado y comprobamos que esté totalmente seco, incluidos los bordes. Recortamos el gel, dejando medio centímetro de celofán sobrante a cada lado. Lo guardamos en una bolsa hermética y la etiquetamos.

Método del Biuret.

1. Pipeteamos las sustancias que aparecen en la siguiente tabla, en ese mismo orden y en los tubos correspondientes que tenemos que nombrar previamente.
Donde el blanco es usado para tarar el espectrofotómetro; del 1 al 5 son las muestras patrón con las que realizaremos la recta patrón, puesto que conocemos la concentración exacta de BSA que contienen y *Calvatia gigantea* (n, natural; d, dializada; dg, digestión gástrica; di, digestión gástrica e intestinal y co, cocinada) son las muestras problema.

	NaCl 0,9%	BSA (10mg / ml)	Extracto <i>Calvatia gigantea</i>	Biuret
Blanco	1500 µl	0 µl	-	1500 µl
1	1487,5 µl	12,5 µl	-	1500 µl
2	1475 µl	25 µl	-	1500 µl
3	1459 µl	50 µl	-	1500 µl
4	1375 µl	125 µl	-	1500 µl
5	1250 µl	250 µl	-	1500 µl
CG n	1300 µl	-	200 µl	1500 µl
CG d	1200 µl	-	300 µl	1500 µl
CG dg	1100 µl	-	400 µl	1500 µl
CG di	1000 µl	-	500 µl	1500 µl
CG co n	1200 µl	-	300 µl	1500 µl
CG co d	1100 µl	-	400 µl	1500 µl
CG co dg	1000 µl	-	500 µl	1500 µl
CG co di	900 µl	-	600 µl	1500 µl

Tabla 3. Cantidades de muestras patrón y problema para espectrofotometría.

2. Incubamos los 7 tubos preparados a 55°C durante 10 minutos, lo que intensifica el color del biuret al fijarse los complejos que se forman entre el cobre del biuret y los grupos -NH de las proteínas.
3. Bajamos la temperatura del baño a 20°C e introducimos los tubos otros 5 minutos en agua templada y procedemos a medir la absorbancia de todos ellos.
4. Primero vertimos el contenido del blanco en la cubeta del espectrofotómetro visible, cogiendo esta por la parte con rayas, cuidando que las paredes estén bien limpias y no tengan huellas que podrían distorsionar la medida. La introducimos en la máquina, con la flecha que tiene mirando hacia nosotras y hacemos el blanco (blanco = 0).
5. Llevamos a cabo el mismo procedimiento con todas las muestras patrón y las muestras problema, cuidando de no contaminarlas.
6. Anotamos todas las absorbancias medidas a 540 nm, para realizar la recta patrón con las muestras 1 a 5 y poder llevar a cabo la interpolación de las muestras problema y conocer su concentración proteica.

