

Proyecto de Grado

**EVALUACIÓN DEL TRIPTÓFANO EN LA PRODUCCIÓN DE PSILOCIBINA EN
EL CULTIVO SUMERGIDO DE *Psilocybe sp.***

ADRIANA GIRALDO CAMPUZANO

Asesor:

Alex A. Sáez Vega

**UNIVERSIDAD EAFIT
ESCUELA DE INGENIERIA
DEPARTAMENTO DE INGENIERIA DE PROCESOS
MEDELLIN
2015**

**EVALUACIÓN DE LA INCIDENCIA DEL TRIPTÓFANO EN LA PRODUCCIÓN
DE PSILOCIBINA EN EL CULTIVO SUMERGIDO DE *Psilocybe sp***

ADRIANA GIRALDO CAMPUZANO

Trabajo De Grado Para Optar Por El Título De Ingeniera De Procesos

**Asesor
Alex A. Sáez Vega**

**UNIVERSIDAD EAFIT
ESCUELA DE INGENIERIA
DEPARTAMENTO DE INGENIERIA DE PROCESOS
MEDELLIN
2015**

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE TABLAS	5
LISTA DE IMÁGENES	6
LISTA DE GRÁFICOS	8
LISTA DE ECUACIONES	9
LISTA DE ANEXOS.....	10
INTRODUCCIÓN	11
1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	12
2 JUSTIFICACIÓN.....	12
3 OBJETIVOS.....	13
3.1 Objetivo General	13
3.2 Objetivos Específicos	13
4 MARCO REFERENCIAL	14
4.1 Generalidades de los Hongos	14
4.1.1 Hongos laminares (Agaricales).....	14
4.2 Descripción del hongo <i>Psilocybe sp.</i>	15
4.2.1 Sombrero o Píleo.....	15
4.2.2 Lamelas	16
4.2.3 Estípite o Tallo	17
4.2.4 Características microscópicas	18
4.3 Medios de cultivo	18
4.3.1 Tipos de medio de cultivo	18
4.3.2 Medio sumergido	18
4.4 Alcaloides presentes en <i>Psilocybe sp</i>	19
4.4.1 Generalidades	19
4.4.2 Propiedades fisicoquímicas	21
4.4.3 Reconocimiento de los alcaloides.....	21
4.4.4 Clasificación de los alcaloides	22
4.4.5 Antecedentes de la obtención de Psilocibina y Psilocina	24
4.4.6 Antecedentes de la síntesis de Psilocibina	25
4.5 Estado del arte	25
5 MATERIALES Y MÉTODOS	29
5.1 Localización	29
5.2 Microorganismo de estudio	29

5.3	Medio de Cultivo (Fang-Zhong modificado)	30
5.4	Preparación de los diferentes preinóculos de <i>Psilocybe sp</i> utilizados para las fermentaciones sumergidas	33
5.5	Preparación de los medios de cultivo y los inóculos de <i>Psilocybe sp</i> utilizados para las fermentaciones sumergidas	33
5.6	Cuantificación del crecimiento de biomasa mediante los métodos de peso húmedo y peso seco para el cultivo sumergido de <i>Psilocybe sp</i>	34
5.7	Evaluación del consumo de sustrato por parte del <i>Psilocybe sp</i> cultivado en medio sumergido	34
5.8	Método para determinar la presencia de Psilocibina mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).....	35
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
6.1	Cinética de crecimiento del hongo <i>Psilocybe sp</i> en el medio sumergido base 35	
6.2	Crecimiento micelial de <i>Psilocybe sp</i> en medio sumergido utilizando diferentes porcentajes de Triptófano	35
6.3	Ajuste de la cinética de crecimiento de <i>Psilocybe sp</i> al modelo cinético logístico.....	44
6.4	Aplicación del modelo logístico para los diferentes medios	45
6.5	Estudio cualitativo de la presencia del alcaloide	46
6.6	Estudio porcentual (área) del alcaloide realizado para los diferentes ensayos	47
6.6.1	Porcentaje de la Psilocibina para los diferentes medios.....	47
7	CONCLUSIONES	50
8	RECOMENDACIONES	51
9	ANEXOS	52
9.1	ANEXO 1. Determinación de consumo de azúcares por el método de DNS (Ácido Dinitrosalicílico).....	52
9.2	ANEXO 2. CINÉTICA DE CONSUMO DE SUSTRATO	52
9.3	ANEXO 3. BARRIDO ESPECTRAL PARA EL <i>Psilocybe sp</i>	53
9.4	ANEXO 4. Cromatogramas (HPLC) del día 8 de fermentación	54
9.5	ANEXO 5. Cromatogramas (HPLC) del día 9 de fermentación.....	62
9.6	ANEXO 6. Cromatogramas (HPLC) del día 10 de fermentación.....	68
10	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación Científica del hongo <i>Psilocybe sp.</i> (María P & Marisol, 2010)	20
Tabla 2: Medio de cultivo base (Fang y Zhong modificado)	30
Tabla 3: Medio de Cultivo modificado llamado M1.....	31
Tabla 4: Medio de Cultivo modificado llamado M2.....	31
Tabla 5: Medio de Cultivo modificado llamado M3.....	32
Tabla 6: Medio de Cultivo modificado llamado M4.....	32
Tabla 7: Diseño de experimento Factorial Completo 2 ²	33
Tabla 8: Descripción diseño de experimento	33
Tabla 9: Cinética de crecimiento micelial de <i>Psilocybe sp</i> en medio sumergido M1	37
Tabla 10: Cinética de crecimiento micelial de <i>Psilocybe sp</i> en medio sumergido M2	39
Tabla 11: Cinética de crecimiento micelial de <i>Psilocybe sp</i> en medio sumergido M3	40
Tabla 12: Cinética de crecimiento micelial de <i>Psilocybe sp</i> en medio sumergido M4	42
Tabla 13: Parámetros cinéticos obtenidos mediante el modelo logístico para las diferentes fermentaciones de <i>Psilocybe sp.</i>	45
Tabla 14: Porcentaje de las áreas de la biomasa para los cuatro medios	47
Tabla 15: Porcentaje de las áreas del sobrenadante para los cuatro medios.....	48
Tabla 16: Áreas obtenidas de los cromatogramas para el <i>Psilocibe sp</i> en los medios base y modificados en el día 8 de las fermentaciones.	54
Tabla 17: Áreas obtenidas de los cromatogramas para el <i>Psilocibe sp</i> en los medios base y modificados en el día 9 de las fermentaciones	62
Tabla 18: Áreas obtenidas de los cromatogramas para el <i>Psilocibe sp</i> en los medios base y modificados en el día 10 de las fermentaciones	68

LISTA DE IMÁGENES

Imagen 1: Hongo Agaricales (Laminar) (Kuo, 2007).....	15
Imagen 2: Sombrero o Píleo de <i>Psilocybe sp.</i>	16
Imagen 3: Lamelas y esporas de <i>Psilocybe sp.</i> (María P & Marisol, 2010)	17
Imagen 4: Estípite o tallo de <i>Psilocybe sp.</i> (María P & Marisol, 2010).....	17
Imagen 5: Estructura química de la Psilocibina (Téllez, 2005)	21
Imagen 6: Alcaloides derivados del Triptófano (Mercano & Hasegawa, 1991)....	23
Imagen 7: Rutas biosintéticas del triptófano	26
Imagen 8: Descomposición de Psilocibina en el cuerpo humano (Hasler y Bourquin, 2002).	27
Imagen 9: HPLC-ECD Determinación de Psilocina (Hasler y Bourquin, 2002). ..	28
Imagen 10: Perfil cromatográfico (Musshoff, Madea, & Beike, Septiembre 11, 2000)	53
Imagen 11: M1At8	55
Imagen 12: M1Bt8s	56
Imagen 13: M2Bt8	57
Imagen 14: M3Ct8	58
Imagen 15: M3At8s.....	59
Imagen 16: M4At8	60
Imagen 17: M4At8s.....	61
Imagen 18: M1Bt9	63
Imagen 19: M2At9	64
Imagen 20: M4At9	65
Imagen 21: M4At9s	66

Imagen 22: M4Ct9s	67
Imagen 23: M1Bt10	69
Imagen 24: M1At10s.....	70
Imagen 25: M2Ct10	71
Imagen 26: M2Bt10s.....	72
Imagen 27: M3At10	73
Imagen 28: M3At10s.....	74
Imagen 29: M4Bt10	75
Imagen 30: M4Bt10s.....	76

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfica 1: Cinética de crecimiento micelial de <i>Psilocybe sp</i> en medio sumergido M1	37
Gráfica 2: Cinética de crecimiento micelial de <i>Psilocybe sp</i> en medio sumergido M2	39
Gráfica 3: Cinética de crecimiento micelial de <i>Psilocybe sp</i> en medio sumergido M3	41
Gráfica 4: Cinética de crecimiento micelial de <i>Psilocybe sp</i> en medio sumergido M4	43
Gráfica 5: Cinética de crecimiento micelial de <i>Psilocybe sp</i> en medio sumergido (base) utilizando cuatro medios diferentes (Peso seco).....	43
Gráfica 6: Cinética de consumo de sustrato por parte del <i>Psilocybe sp</i> en medio sumergido utilizando diferentes concentraciones de glucosa como fuente de carbono	46
Gráfica 7: Porcentaje de las áreas de la biomasa para los cuatro medios	48
Gráfica 8: Porcentaje de las áreas del sobrenadante para los cuatro medios	49

LISTA DE ECUACIONES

Ecuación 1: Ecuación linealizada del modelo logístico	44
Ecuación 2: Valores teóricos de biomasa en el tiempo	45

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. Determinación de consumo de azúcares por el método de DNS (Ácido Dinitrosalicílico).....	52
ANEXO 2. Cinética de consumo de sustrato	52
ANEXO 3. Barrido espectral para el <i>Psilocibe sp</i>	53
ANEXO 4. Cromatogramas (HPLC) del día 8 de fermentación	54
ANEXO 5. Cromatogramas (HPLC) del día 9 de fermentación	62
ANEXO 6. Cromatogramas (HPLC) del día 10 de fermentación	68

INTRODUCCIÓN

El hongo *Psilocybe sp* tiene una importancia significativa a nivel de investigaciones clínicas y psiquiátricas debido a que produce un alcaloide en sus tejidos llamado Psilocybina. Éste, es derivado de la triptamina, y posee una estructura química similar a la de los neurotransmisores llamados serotonina (5 hidroxitriptamina), melatonina y otros neuroreguladores (Arora, 1986).

En la actualidad el uso de la Psilocibina está prohibido en la mayoría de los países, debido a sus efectos alucinógenos y psicoactivos; sin embargo, en los Estados Unidos la FDA aprobó varios estudios sobre el uso de éste alcaloide, de ésta manera; MAPS (Multidisciplinary Association for Psychedelic Studies) ha publicado diferentes estudios con dosis de Psilocibina realizados en pacientes que presentan desordenes obsesivo-compulsivos, pacientes terminales de cáncer, con autismo infantil, entre otros (Hanes, 1996). Debido a estas publicaciones, es importante desarrollar una metodología para incrementar la producción de psilocibina por parte del hongo. En éste trabajo se evaluará la producción de este alcaloide mediante la adición de triptófano al medio de cultivo; debido a que es un precursor de la Psilocibina.

Por tal motivo, este estudio se enfocará en la producción de la Psilocibina mediante el cultivo del *Psilocibe sp* en el medio sumergido (Fang-Zhong) (Fang, 2002), con una variación en la concentración de la peptona por el triptófano.

Se evaluarán los efectos de dos relaciones de Carbono-Nitrógeno (C/N) diferentes (glucosa y peptona respectivamente), y dos concentraciones diferentes de Triptófano en el cultivo sumergido del hongo *Psilocibe sp*, con el fin de determinar la incidencia de éstas en la producción de biomasa y en la producción y presencia de Psilocibina; alcaloide de interés (Lee, y otros, 2004).

El interés por los hongos como el *Psilocibe sp* respondía únicamente a inquietudes religiosas, culturales o curativas (Griffiths, Richards, Johnson, McCann, & Jesse, 2008), en donde su uso se remonta a más de 3500 años, que fue usado por los indígenas de Sudamérica, y otras culturas prehistóricas. En 1957 comienzan los estudios sobre este tipo de hongos, se publica un artículo, y hace el primer cultivo a nivel de laboratorio del hongo *Psilocybe mexicana* por parte del microbiólogo francés Roger Hiem; y después, se aislaron alcaloides indólicos responsables de la actividad psicoactiva de los hongos. En la década de los sesenta algunos investigadores utilizaron la Psilocibina con fines terapéuticos, pero las investigaciones cesaron ante la situación legal de estas sustancias y sólo en contadas ocasiones, como es el caso de Suiza en los años 90, se autorizó su uso (Gottlieb, 1997).

1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Como se mencionó anteriormente, el género *Psilocybe* contiene en sus tejidos tres tipos de alcaloides, donde el más importante es la Psilocibina, derivado de la triptamina y muy similar al neurotransmisor Serotonina (Brailowsky, 2013), este alcaloide ha tomado gran importancia debido a las investigaciones realizadas en el ámbito medicinal y psiquiátrico en donde se ha observado tratamientos de enfermedades en pacientes con desordenes del comportamiento y en pacientes terminales de cáncer, lo que hace de éste alcaloide un medicamento interesante ya que su uso no es perjudicial para la salud y no genera dependencia alguna (Lee, y otros, 2004) (Hanes, 1996).

Dado que no se conoce la caracterización de flujos metabólicos ni la incidencia del medio de cultivo sobre la producción del metabolito, se plantea resolver el problema evaluando el diseño de experimentos, para dar respuesta a las siguientes preguntas de investigación:

- ¿Cuál es la incidencia del triptófano en la producción de Psilocibina?
- ¿Cuál es el mejor tratamiento para aumentar la producción de Psilocibinas?
- ¿Cuál es la incidencia del triptófano en la cinética de crecimiento del hongo *Psilocibe sp?*

2 JUSTIFICACIÓN

ACADÉMICA

Debido a las investigaciones realizadas en el ámbito medicinal y psiquiátrico, en tratamientos de enfermedades en pacientes con desordenes del comportamiento y en pacientes terminales de cáncer (Hanes, 1996), se hace de éste alcaloide un medicamento potencial ya que su uso no genera dependencia alguna (Lee, y otros, 2004).

En el campo de la medicina se presentan varios usos, los cuales describen tratamientos realizados a pacientes con cáncer, además han publicado estudios en efectos de la cognición para mejorar los conocimientos adquiridos a partir de la percepción, estimulando el desarrollo de la creatividad y estudios sobre tratamientos psicofarmacológicos en el control de prisioneros de la cárcel Concord en Massachusetts para evitar la reincidencia (Perrine, 1999).

Dado el potencial de los compuestos de *Psilocibe sp*, se hace importante desde el punto de vista académico evaluar si la producción de estos metabolitos secundarios pueden ser potenciadas por la presencia de un aminoácido aromático como el triptófano, cuya estructura es parecida al metabolito final, dado que supone ahorro de energía en la síntesis del anillo indólico.

AMBIENTAL

El uso de la cepa nativa de *Psilocibe sp* implica adentrarnos en la fisiología del hongo y su conservación, además de la adquisición de una muestra por colecta que enriquece el cepario de la universidad y nos amplía la base del conocimiento de nuestra biodiversidad

SOCIAL

Si se logra el desarrollo de medicamentos que puedan alterar la cadena de consumo de productos psicoactivos el impacto social puede llegar a ser de gran importancia dado que estos productos generan un alto desorden social y económico y desencadenan una problemática de orden mundial. Si es posible reducir esto, será en consecuencia la mejor justificación de todas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

- Evaluar el efecto de la adición del triptófano en la producción de psilocibina o psilocina en el cultivo sumergido del *Psilocibe sp*.

3.2 Objetivos Específicos

- Analizar el efecto de la adición de triptófano a la peptona sobre el crecimiento, consumo de sustrato, y producción de psilocibina o psilocina en el cultivo sumergido del *Psilocibe sp*.
- Determinar la producción de alcaloides del mejor tratamiento obtenido por medio de una técnica de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).
- Determinar la cinética de consumo de sustrato, producción de biomasa y psilocibina del mejor tratamiento obtenido.

4 MARCO REFERENCIAL

4.1 Generalidades de los Hongos

Los hongos pertenecen al reino Fungi en el cual se hallan una gran cantidad de organismos eucariotas, descomponedores y heterótrofos. Poseen características muy particulares que los hacen diferentes de las plantas porque carecen de clorofila. La forma en la que se alimentan es por absorción y pueden reproducirse tanto sexual y asexualmente; el cuerpo consiste generalmente de filamentos ramificados con pared celular quitinosa (Miles, 1999).

Los hongos se originan a partir de esporas, células especializadas que cumplen la misma función de las semillas en las plantas. Cuando las éstas encuentran las condiciones adecuadas de humedad, temperatura, luz y nutrientes, entre otras, germinan y producen hifas, estructuras filamentosas que constituyen la unidad estructural fundamental de la mayoría de los hongos (Miles y Chang, 1999). Las hifas se ramifican y forman una masa algodonosa llamada micelio, el cual se extienden sobre el medio o superficie (materia orgánica, madera, entre otros) y produce los cuerpos fructíferos. En realidad, el verdadero cuerpo del hongo lo constituye el micelio, y los cuerpos fructíferos son el equivalente de los frutos en un árbol. Los cuerpos fructíferos son las estructuras que se observan a simple vista sobre un sustrato, medio o superficie y su función es producir esporas que son dispersadas por el agua, el viento, insectos y otros factores y finalmente mueren. Los cuerpos fructíferos son estacionales y aparecen solo en ciertas épocas del año, pero el micelio permanece sobre el sustrato, incluso durante cientos de años (Miles, 1999).

Constituyen uno de los grupos de organismos más importantes para la vida del hombre, debido a que son los responsables de gran parte de la descomposición de la materia orgánica, aumentando la disponibilidad de nutrientes en el suelo; pueden ser comestibles, venenosos o psicotrópicos; muchos son patógenos; otros, producen ciertas sustancias benéficas o intervienen en procesos de elaboración de algunos comestibles (Miles, 1999).

4.1.1 Hongos laminares (Agaricales)

El orden Agaricales también conocido como Euagaricales es el mayor orden de setas y hongos que incluye más de la mitad de todas las especies conocidas de la clase Homobasidiomycetes (Hibbett, D.S. y Thorn, R.G., 2001). Más de 9000 especies y alrededor de 350 géneros se han atribuido a este orden, que contiene 26 familias (Kirk, Cannon, & David, 2001). Un consenso de mayor nivel de clasificación de los Agaricales ha sido difícil de lograr, debido a la competencia de sistemas que restringen géneros y familias (o incluso orden) de diferentes maneras (Bas, 1998).

La base para la clasificación de los hongos fue construida por Fries (1874), quien hizo hincapié en las características macroscópicas, como la textura del tallo, la separación de los filamentos (laminas), presencia o ausencia de velo y color de las esporas.

Posteriormente, dividió los hongos Agaricales en varias especies de acuerdo al color de las esporas depositadas, las cuales pueden ser de color blanco, rosado, marrón, púrpura – marrón y negro. El sistema macroscópico de Fries, que reconoció inicialmente 12 géneros de hongos carnosos que forman los hongos, es taxonómicamente práctico. Éste fue relativamente invariable hasta que Fayod (1989) estudió la anatomía y las características microscópicas de muchos Agaricales, reconociendo 108 géneros (Arora, 1986).

Al igual que todas las setas, los hongos laminares son fábricas de esporas, creados con el único propósito de fabricar esporas microscópicas para dejarse llevar por las corrientes de aire y con suerte, caer en un lugar adecuado en la tierra para germinar y comenzar un nuevo organismo. Las probabilidades de que cualquier individuo que tiene esporas de este tipo tenga suerte, son tan bajas que el hongo produce millones de esporas para compensar esto. En las láminas se encuentran numerosas esporas, las cuales aumentan considerablemente el número de esporas que el hongo puede producir. Ambos lados de cada lámina está cubierta con esporas microscópicas (Kuo, 2007). A continuación se muestra de manera ilustrativa en la figura 1 las láminas que poseen los hongos Agaricales, en las cuales se da la formación de las esporas.



Imagen 1: Hongo Agaricales (Laminar) (Kuo, 2007)

4.2 Descripción del hongo *Psilocybe sp*

4.2.1 Sombrero o Píleo

El sombrero del hongo mide entre 1.5-8 cm de diámetro con una superficie que puede variar entre lisa a fibrilosa, o finamente escamosa; el sombrero presenta un color amarillo opaco en el centro, que va desapareciendo hacia el exterior. El himenóforo está formado por lamelas de un color gris. Las esporas son café púrpura, cuando se lesiona o se manipula el hongo adopta un color azul-negro (Stamets, *Psilocybin Mushrooms of the World.*, 1996).

El contenido de Psilocibina en el hongo *Psilocybe sp*, es mucho mayor en la parte del sombrero, en un rango de 0.44-1.35%, mientras que en el tallo el contenido de Psilocibina se encuentra en un rango de 0.05-1.27% (Wurst, Semerdzieva, & Vokoun, 1984).



Imagen 2: Sombrero o Píleo de Psilocybe sp.

4.2.2 Lamelas

Se encuentran unidas al sombrero, están cercanas unas a otras y son ligeramente largas en el centro. Su color se torna gris pálido en los cuerpos fructíferos jóvenes, transformándose en un profundo púrpura oscuro en la etapa de madurez del hongo (Stamets, *Psilocybin Mushrooms of the World.*, 1996).



Imagen 3: Lamelas y esporas de *Psilocybe* sp. (María P & Marisol, 2010)

4.2.3 Estípite o Tallo

Puede alcanzar una altura de 40-150 mm de largo por 5-15 mm de ancho. Se puede tornar blancuzco y cambia a un color amarillento y puede presentar un color azulado cuando es maltratado con fuerza. La superficie es lisa y estriada en su cúspide o cima. Presenta un anillo en la parte superior (apical) del estípite, de consistencia membranosa y color claro (Stamets, *Psilocybin Mushrooms of the World.*, 1996).



Imagen 4: Estípite o tallo de *Psilocybe* sp. (María P & Marisol, 2010)

4.2.4 Características microscópicas

El hongo presenta esporas púrpuras oscuras y tiene en su estructura células fértiles (basidios) en donde ocurre la producción de esporas (Stamets, *Psilocybin Mushrooms of the World.*, 1996).

4.3 Medios de cultivo

Uno de los sistemas más importantes para la identificación de microorganismos es observar su crecimiento en sustancias alimenticias artificiales preparadas en el laboratorio. El material alimenticio en el que crecen los microorganismos es el medio de cultivo (García, *Introducción a la microbiología*, 1995).

Para que los microorganismos crezcan adecuadamente en un medio de cultivo artificial, éste debe reunir una serie de condiciones como lo son: temperatura, grado de humedad y presión; así como un grado correcto de acidez o alcalinidad. Un medio de cultivo contiene los nutrientes y factores de crecimiento necesarios para que el microorganismo se desarrolle correctamente y debe estar exento de cualquier tipo de microorganismo que pueda generar contaminación (García, *Introducción a la microbiología*, 1995)

4.3.1 Tipos de medio de cultivo

En la actualidad existen diversos tipos de medio de cultivo, si se centra en la composición, éstos pueden ser medios sintéticos que contienen fuente de carbono, fuente de nitrógeno, sales que suplen los iones y demás elementos tales como estimuladores del crecimiento; medios complejos que contienen ingredientes tales como extracto de levadura, peptona, vitamina B1, etc., ricos en nutrientes; medios de enriquecimiento, complejos con aditivos adicionales para favorecer así al crecimiento y desarrollo de determinados microorganismos; medios selectivos, que son diseñados para favorecer el crecimiento específico de un microorganismo determinado o un grupo microbiano; medios diferenciales que proporcionan la distinción microbiana de una mezcla por sus propiedades diferenciales de crecimiento en dichos medios; medios de mantenimiento; siendo disímiles de los de crecimiento óptimo por el crecimiento rápido y prolífico que deriva en la muerte rápida de las células (García, 1995).

Atendiendo a su estado, los medios de cultivo pueden presentarse como medios sumergidos y medios sólidos que contienen agar que gelifica por debajo de 45 °C, y cuya concentración en su uso es de 1.5%; y medios semisólidos que contiene un agar a una concentración de 0.7% (García, 1995).

4.3.2 Medio sumergido

Debido a que cultivar el cuerpo fructífero toma varios meses y se dificulta el control de calidad del producto final porque se está sujeto a los cambios permanentes del

clima y las plagas; se ha empleado la metodología de medio sumergido, la cual es una alternativa muy prometedora para la producción eficiente del micelio y de los metabolitos (Lindequist & Niedermeyer, 2005).

De éste modo, es la mejor forma para producir, extraer y purificar metabolitos de un cultivo de hongo, ya que facilita una producción de biomasa en menor tiempo y de mayor calidad que el cultivo en medio sólido; además de facilitar la dispersión y adaptación del hongo y reducir los vectores de contaminación. De igual forma, un cultivo de esta índole es la opción más viable si se quiere escalar procesos fermentativos en aras de desarrollar mercados, como en este caso, el de metabolitos medicinales (Navarro, Márquez, Rocha, & Sánchez, 1998).

Por otro lado, el uso de un cultivo sumergido puede beneficiar la producción de muchos metabolitos secundarios y disminuir los costos de producción por reducir las labores que involucran los métodos de etapas sólidas (Domínguez, 2003).

Los metabolitos bioactivos de los hongos pueden ser potencialmente producidos a nivel industrial mediante el uso de la metodología de cultivo sumergido, pero el éxito a escala comercial depende del costo, comparado con la tecnología existente y la ventaja económica que la industria puede ver usando este método. El uso de la tecnología puede ser facilitada por el aumento en el rendimiento de la producción y el desarrollo del sistema (Hwang, Kim, & Choi, 2004).

El cultivo de hongos sumergidos se caracteriza por un aumento en la viscosidad del caldo con el tiempo, debido a uno o más factores tales como el aumento de la concentración de células, los cambios de la morfología del crecimiento o la producción de productos extracelulares que alteran el carácter reológico de la cultura del líquido. El aumento en la viscosidad puede ser visto como un fenómeno indeseable pero inevitable, ya que causan dificultades en el suministro de oxígeno, en la eliminación de dióxido de carbono y en posibles problemas de agitación (Hwang, Kim, & Choi, 2004).

4.4 Alcaloides presentes en *Psilocybe sp*

4.4.1 Generalidades

La diversidad estructural y la variedad en la actividad biológica, hacen de los alcaloides como también de los antibióticos, los grupos más importantes entre las sustancias naturales de interés terapéutico (Paris, M. y Hurabielle, M., 1981). Se han aislado principalmente en plantas superiores y se han encontrado en más de 100 familias de Fanerógamas (aquellas plantas que se reproducen por semillas producidas en sus inflorescencias). Su actividad biológica a nivel del sistema nervioso, dio pie a las primeras investigaciones, siendo los alcaloides las primeras sustancias naturales estudiadas (Paris, M. y Hurabielle, M., 1981). El término alcaloide, propuesto por el farmacéutico W. Meissner en 1819; se aplicó a los compuestos de origen vegetal con propiedades alcalinas; este carácter básico es

debido a la presencia de nitrógeno amínico en su estructura. Los alcaloides se pueden considerar como: Un compuesto orgánico de origen natural, nitrogenado, derivados generalmente de aminoácidos, más o menos básico, de distribución restringida, con propiedades farmacológicas importantes a dosis bajas y que responden a reacciones comunes de precipitación (Paris, M. y Hurabielle, M., 1981).

Psilocybe sp es el nombre de una especie de hongos del género *Psilocybe* llamados así debido a las propiedades enteógenas que son el resultado de las diferentes sustancias químicas que poseen, principalmente la Psilocibina. El *Psilocybe sp* es conocido también como golden tops, cubies, san Isidro y hongos kentesh (Stamets, *Psilocybin Mushrooms of the World.*, 1996).

La determinación de la especie es la siguiente:

Clasificación Científica	
Reino	<i>Fungi</i>
División	<i>Basidiomycota</i>
Clase	<i>Agaricomycetes</i>
Orden	<i>Agaricales</i>
Familia	<i>Strophariaceae</i>
Género	<i>Psilocybe</i>

Tabla 1: Clasificación Científica del hongo *Psilocybe sp.* (María P & Marisol, 2010)

Los principios activos del *Psilocybe sp.* son derivados de la triptamina. El más importante de éstos es la Psilocibina ó 4-fosforilhidroxi N, N dimetilriptamina (figura 5) (Stamets, *Psilocybin Mushrooms of the World.*, 1996)

La Psilocibina fue considerada una de las sustancias únicas causantes de la embriaguez fúngica, hasta que en 1968 se aislaron dos análogos de la psilocibina, la bacocistina y la norbaeocistina, con propiedades similares a las anteriores. Aproximadamente un centenar de especies de hongos contienen este tipo de sustancias, con lo que se puede decir, que se trata de las toxinas más extendidas en el mundo fúngico. En ocasiones, se observan variaciones de contenido en alcaloides muy elevadas, incluso dentro de ejemplares de la misma especie que han crecido en las mismas condiciones ambientales.

La dosis umbral de psilocibina oscila entre 2 y 4 miligramos, por encima de 5 miligramos se considera que comienzan los efectos enteogénicos, y a pesar de que la dosis máxima segura se ha establecido en 150 miligramos, dosis superiores a 50 miligramos no se consideran recomendables. Para algunos autores, una medida

adecuada se situaría en torno a unos 0,25 miligramos. Estas consideraciones son de escaso valor para el usuario medio, que incapaz de obtener la psilocibina y sus análogos de forma sintética, se ve obligado a consumir en ocasiones hongos de dudosa procedencia. Las condiciones de almacenamiento influyen notablemente en la potencia de los hongos, sobre todo en aquellos donde la psilocina aparece como principal alcaloide; el *Psilocybe sp*, probablemente el hongo psicoactivo más cultivado del mundo, es un ejemplo de esto último.

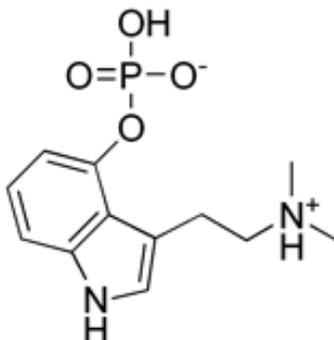


Imagen 5: Estructura química de la Psilocibina (Téllez, 2005)

4.4.2 Propiedades fisicoquímicas

Los alcaloides tienen masas moleculares que varían entre 100 y 9000 g/mol; son casi siempre incoloros; son normalmente sólidos a temperatura ambiente a excepción de los alcaloides no oxigenados. Los alcaloides son poco solubles en agua gracias a su carácter básico; dicho carácter se debe al par de electrones libres del nitrógeno (Paris, M. y Hurabielle, M., 1981). En la naturaleza se encuentran en forma de sales, generalmente. En las plantas se consideraba que eran productos obtenidos durante la extracción y poco solubles en disolventes típicos de extracción por su polaridad. Son solubles en disolventes orgánicos como cloroformo, etanol, metanol, acetato de etilo, éter, benceno. En forma de sales son solubles en agua excepto las sales de berberina (Paris, M. y Hurabielle, M., 1981).

Todos los alcaloides son activos a la luz polarizada, Presentan una fluorescencia característica bajo la luz U.V o IR, dando lugar a espectros característicos (Paris, M. y Hurabielle, M., 1981).

4.4.3 Reconocimiento de los alcaloides

Las técnicas de reconocimiento son basadas en la capacidad que tienen los alcaloides en estado de sal (extractos ácidos), de combinarse con el yodo y metales pesados como bismuto, mercurio, tungsteno, formando precipitados, se utilizan reactivos generales para detectar alcaloides como: reactivo de Wagner, reactivo de

Mayer, reactivo de Dragendorff, reactivo de Hager, reactivo de Bertrand, reactivo de Ehrlich y reactivo de Vitali-Morin (Paris y Hurabielle, 1981).

4.4.4 Clasificación de los alcaloides

Habitualmente los alcaloides se han clasificado en función de su estructura, distinguiéndose principalmente los compuestos heterocíclicos de los no heterocíclicos. Actualmente existen varias formas de clasificarlos (Bruneton, 1987), entre ellas se pueden distinguir:

4.4.4.1 Alcaloides alifáticos

- Derivados de la ornitina (pirrolidinas, tropánicos, pirrolizidínicos)
- Derivados de la lisina (piperidinas, quinolizidínicos)

4.4.4.2 Alcaloides de origen diverso

- Alcaloides terpénicos y esteroidales.
- Alcaloides diversos (purinas, macrociclos, etc.)

4.4.4.3 Alcaloides aromáticos

- Derivados del ácido nicotínico (piridinas).
- Derivados de la fenilalanina y tirosina (isoquinoleínas).
- Derivados del triptófano (indólicos, quinoleínas).
- Derivados de la histidina (imidazoles)

4.4.4.4 Alcaloides derivados del Triptófano (Alcaloides indólicos)

Desde el punto de vista farmacológico ha habido mucho interés sobre las bases que contienen el núcleo indólico a raíz del descubrimiento de la actividad alucinógena del LSD, así como la actividad sedante de la reserpina aislada del género *Rauwolfia*. El auge del estudio fitoquímico ocurrió en la década de los 60 y se dirigió principalmente a la familia Apocynaceae (Mercano y Hasegawa, 1991).

Existen unos 800 alcaloides de este tipo, distribuidos principalmente en la familia Apocynaceae, (géneros *Rauwolfia*, *Aspidos-perma*, *Strychnos* y *Vinca*), menos frecuentes en hongos y familias como Leguminoseae, Malphigiaceae, Rubiaceae y Rutaceae donde los alcaloides presentan el grupo indólico sencillo (Mercano y Hasegawa, 1991).

El triptófano es el precursor de estos alcaloides, los cuales se clasifican en triptaminas y en no triptaminas; las triptaminas a su vez, se subdividen en b-carbolinas y en indoleninas y pueden ser triptaminas simples o triptaminas complejas y estas pueden ser isoprénicas o no isoprénicas (Mercano y Hasegawa,

1991). La figura a continuación, se muestra la estructura química del triptófano, triptamina y sus divisiones.

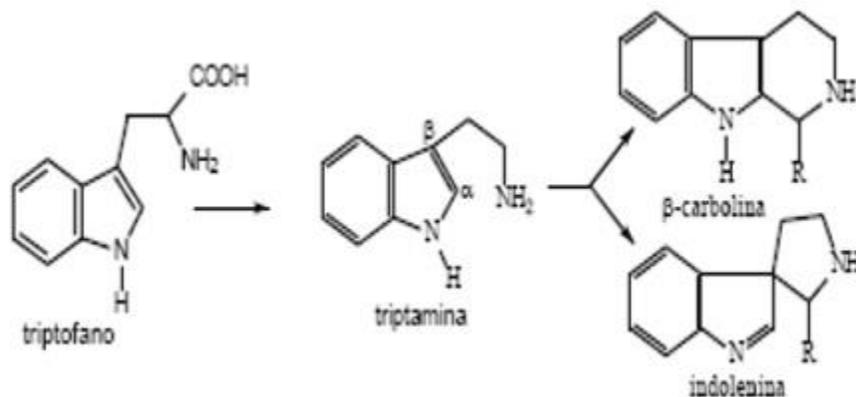


Imagen 6: Alcaloides derivados del Triptófano (Mercano & Hasegawa, 1991)

4.4.4.5 Triptaminas simples

Las triptaminas simples juegan un importante papel en la cultura indígena de América por sus efectos alucinógenos y extáticos en sus ceremonias mágico religiosas (Furst, 1994). Se han encontrado en hongos alucinógenos de Mesoamérica del género *Psilocybe*, *Stropharia* y *Conocybe* (“teonacat” o “carne de los dioses”) usados por los indios Aztecas en sus ceremonias religiosas desde hace más de 1700 años. Se han encontrado en estos hongos los alcaloides alucinógenos, la Psilocina y la Psilocibina que al ingerirlos produce diferentes sensaciones auditivas y visuales, relajación muscular, depresiones y euforias alternadas (Mercano & Hasegawa, 1991).

La serotonina que juega un importante papel en la actividad neuronal, se encuentra también en vegetales. Se ha aislado en el pericarpio del banano, el cual seco, cuando es fumado, actúa como un alucinógeno ligero (Seigler, 1981).

De las glándulas parótidas del sapo común *Bufo vulgaris* se aísla la bufotenina derivado N-dimetilado de la serotonina que también es el principio activo del Yopó, polvo de las semillas de *Anadenanthera peregrina* (*Piptadenia peregrina*) Leguminosae y especies del género *Virola* (Myristicaceae) que contiene también triptaminas; son mezclados con cenizas e inhalados por medio de tubos de bambú por los indígenas del Orinoco en ceremonias mágico religiosas produciendo alucinación e incoordinación motriz (Seigler, 1981).

4.4.4.6 Psilocibina y Psilocina

La Psilocibina y la Psilocina, son biológicamente sintetizadas en los hongos pertenecientes a los géneros de *Psilocybe* (Bigwood & Beug, 1982).

La Psilocibina y la Psilocina se han identificado en todo el mundo en una variedad de setas, que son llamados "hongos mágicos". La ingestión de pequeñas cantidades de alucinógenos provoca el éxtasis. La actividad alucinógena de la Psilocibina es relativamente más baja que la de la Psilocina. Sin embargo, la Psilocibina se convierte fácilmente en Psilocina (componente activo principal) en los sistemas biológicos. Así, el desarrollo de un método de determinación de la Psilocibina es importante, lo misma que la de la Psilocina (Kimie, y otros, 2005).

La hidrólisis de la Psilocibina se consigue saturando con anhídrido carbónico una solución acuosa de Psilocibina (para eliminar el oxígeno del aire y calentándola) obteniendo así una molécula de 4hidroxi-dimetiltriptamina y una molécula de ácido fosfórico (Mandrile, E.; Bongiorno, G.; Nájera, M., 1983).

Como todos los fármacos derivados del indol, éstas sustancias han despertado interés porque se sospechó la posibilidad de que algunas de ellas se formen en el organismo y que en ciertas psicosis, especialmente en la esquizofrenia, se produzcan elevados niveles sanguíneos que ocasionan algunos de los síntomas (Mandrile, E.; Bongiorno, G.; Nájera, M., 1983).

4.4.5 Antecedentes de la obtención de Psilocibina y Psilocina

Una gran variedad de métodos cromatográficos para la determinación de Psilocibina y Psilocina presentes en las incautaciones de hongos se han publicado. La cromatografía de capa fina, es utilizada debido a que ésta es muy apropiada para la detección de sustancias derivadas del triptófano (Bigwood & Beug, 1982) Aun así, métodos que involucran tanto la cromatografía de alta eficiencia (HPLC), como la detección fotométrica de U.V (Bigwood & Beug, 1982) fueron establecidas y optimizadas para la cuantificación de Psilocibina.

Durante los últimos años se han venido utilizando diferentes tipos de columna y fase móvil, con el fin de obtener la mayor cantidad posible de la sustancia de interés (Psilocibina).

En el año 1981, en el instituto farmacéutico de la Universidad de Oslo, realizaron una investigación con una columna de sílice, con una fase móvil de metanol-nitrato de amonio, en donde no sólo se logró obtener Psilocibina y Psilocina, sino también un nuevo producto conocido como baeocistín. Se logró un porcentaje de separación máxima de 75% w/w (Christiansen, Rasmussen, & Tonnesen, 1981).

Asimismo, en el año 1984, en el instituto de microbiología de Amsterdam, se realizó un estudio con una columna C18 de sílice y una fase móvil de agua-etanol- ácido

acético, de forma isocrática en donde se obtuvo un porcentaje 0.25%-1.15% y 0.02-0.16% de Psilocibina y Psilocina, respectivamente en el hongo (Wurst, Semerdzieva, & Vokoun, 1984)

De igual manera, en el año 2003, en el instituto de ciencia policiaca, en Japón, se ejecutó la cromatografía de alta eficiencia, utilizando una columna C18, con una fase móvil de ácido fórmico, de forma isocrática y un detector DAD de 220 nm; un rango de porcentaje de Psilocibina 0.14-0.42 % w/v en la capa, mientras un 0.09-0.3 %w/v en el tallo (Tsujikawa, y otros, 2003).

4.4.6 Antecedentes de la síntesis de Psilocibina

4.5 Estado del arte

Las especies de hongos del género *Psilocybe* originarios de Nepal, no han sido muy estudiadas; sin embargo las demás especies de la región se han venido estudiado desde comienzos del siglo XVIII (Berkeley, 1854). El estudio realizado de las diferentes especies de *Psilocybe* fueron exploradas en diferentes localidades:

- ✓ Koradi ubicada en el norte cerca al Tibet, la cual presenta una región de zona templada.
- ✓ Kathmandú ubicada en el centro del país y Dhulikhel ubicada al este de Kathmandú, presentan clima húmedo subtropical.
- ✓ Royal Chitwan Nacional Park en el sur cerca de la India, presenta un clima tropical considerado evergreen forest.

De las localidades mencionadas, solamente se encontró el género *Psilocybe* en Dhulikhel y Chitwan Park, donde se realizaron diferentes estudios a las especies psicocíbicas. Se estudió la longitud, el ancho y espesor de las esporas y la actividad psicotrópica de los hongos (figura 4).

Las especies psicocíbicas estudiadas fueron: *Psilocybe percevali*, *P. pseudobullacea* y *P. cubensis*. Los resultados arrojados por la investigación certifican que el *P. cubensis* posee actividad alucinógena y efectos psicoactivos (Kasuya y Guzmán, 2004).

El incremento de la popularidad de los hongos mágicos, se debe al fácil acceso que hay para adquirir hongos con propiedades psicoactivas en el mercado negro, a los kits de cultivo que se encuentran vía internet y a las tiendas de recreación ubicadas en Europa. La Psilocibina se ha convertido en una herramienta importante para

estudios neurobiológicos de los estados de alteración de la conciencia. Un incremento en el número de publicaciones científicas han renacido de la investigación con Psilocibina debido a sus “modelos sicóticos” ya que algunos estudios han investigado las propiedades farmacocinéticas de la Psilocibina en humanos (Hasler y Bourquin, 2002).

El triptófano sigue la ruta de descarboxilación, donde el producto es la triptamina; la cual, a su vez, sigue la ruta de alquilación en donde se hidroxila, formando así los alcaloides indoliletil amínicos.

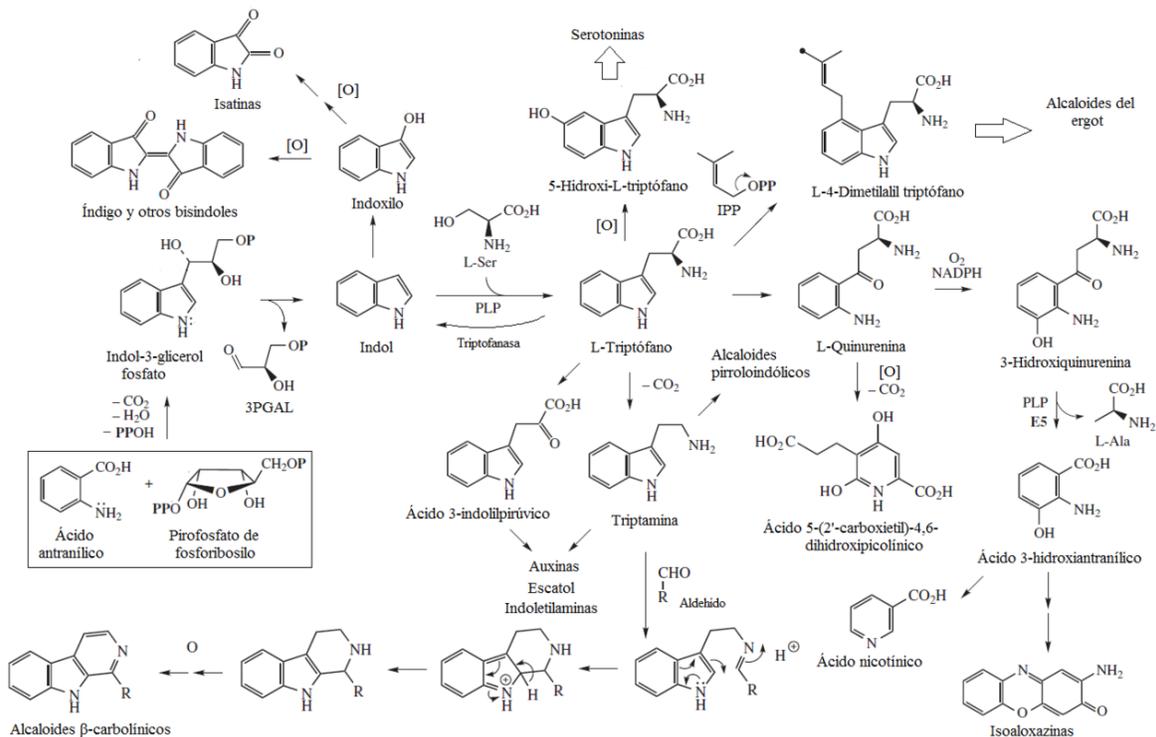


Imagen 7: Rutas biosintéticas del triptófano

El estudio clínico reportado en el artículo “Renal excretion profiles of Psilocybin following oral administration of Psilocybin: a controlled study in man”, fue aprobado por el comité del hospital universitario de psiquiatría en Zürich, la administración de la Psilocibina fue controlada y autorizada por la oficina federal Suiza de salud pública y las personas seleccionadas fueron sometidas a estudios psiquiátricos para asegurar que no tuvieran registro de parientes con desordenes psiquiátricos o adicciones a las drogas (Hasler y Bourquin, 2002). En el proceso de desarrollo, los médicos suministraron Psilocibina por vía oral en dosis de 212±25 µg/Kg de peso corporal. La investigación observó que el cuerpo posee la capacidad de degradar la

Psilocibina a Psilocina, ésta se reduce a un aldehído el cual se descompone formando 2 metabolitos debido a una de-aminación (4-hydroxy indol-3-yl-ácido acético) y una oxidación (4-hydroxitriptofol) (figura 10). (Hasler y Bourquin, 2002).

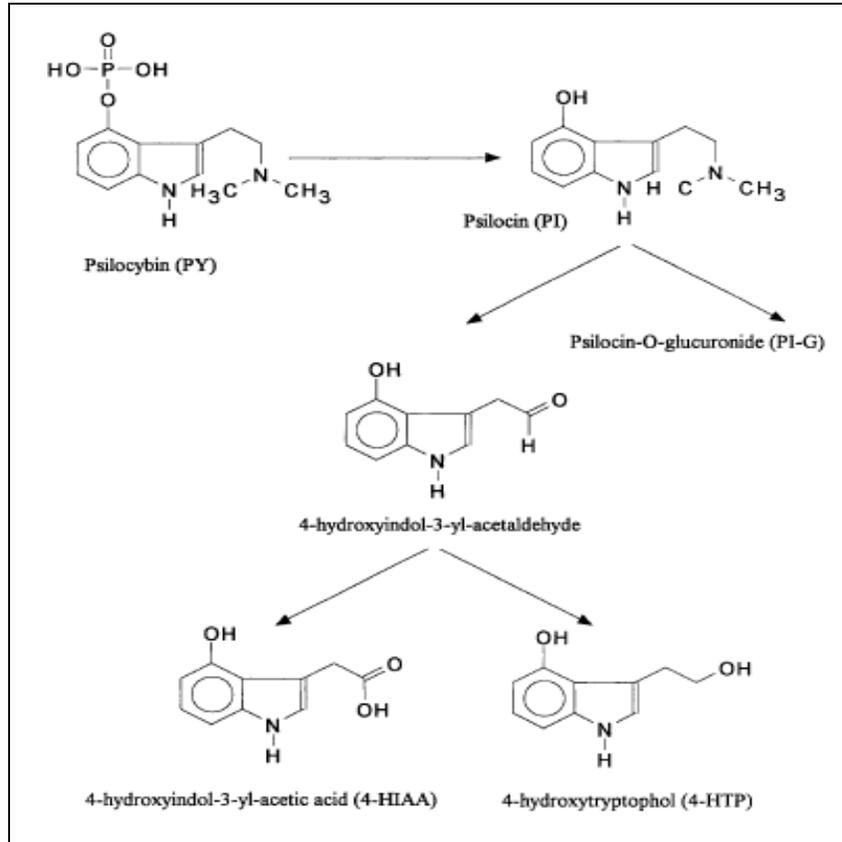


Imagen 8: Descomposición de Psilocibina en el cuerpo humano (Hasler y Bourquin, 2002).

El análisis para definir los efectos que posee la Psilocibina en los humanos, se realizó por medio de la recolección de la orina de los voluntarios; donde por medio de un estudio HPLC (figura 11) se cuantificó la cantidad de Psilocina presente en las excreciones urinarias (Hasler y Bourquin, 2002).

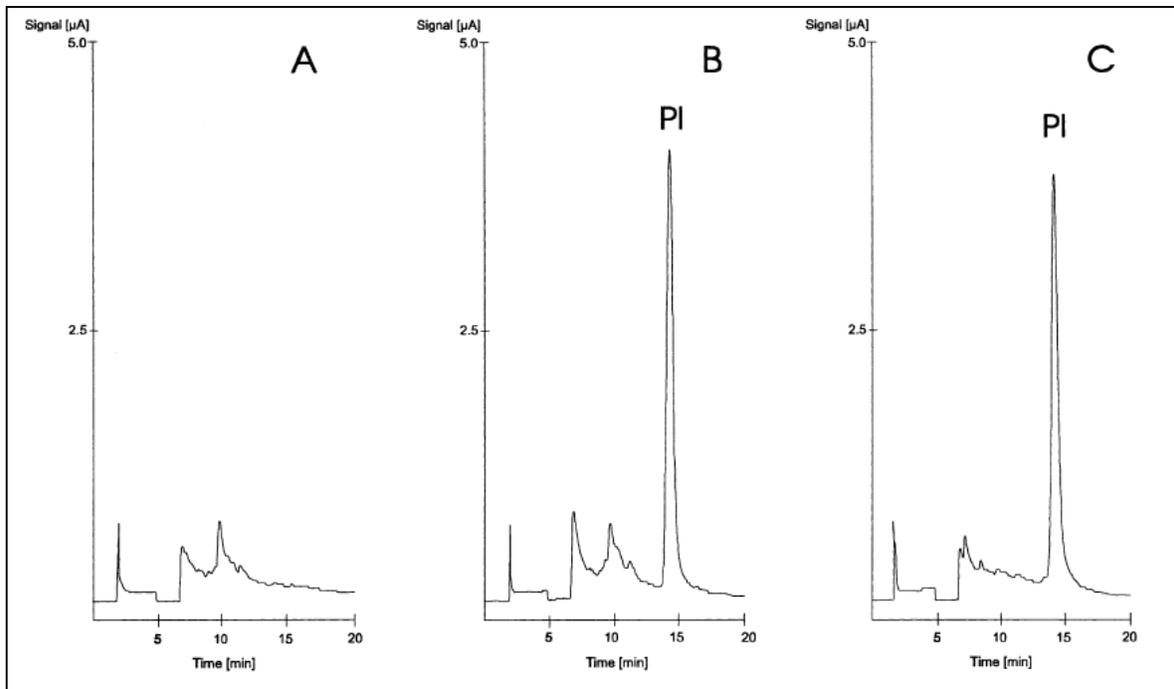


Imagen 9: HPLC-ECD Determinación de Psilocina (Hasler y Bourquin, 2002).

Este estudio permitió conocer que a dosis entre 10 a 18 mg de Psilocibina, se induce a estados alterados de conciencia. Luego de 60 minutos de haberse suministrado la droga, los voluntarios experimentaron cambios en la percepción sensorial afectando el humor, alteraciones en la percepción del tiempo y el espacio, ilusiones visuales y alucinaciones. Las dosis de Psilocibina utilizadas en el estudio fueron toleradas por los voluntarios, los cuales presentaron pocas reacciones adversas tales como náuseas y mareos lo que lleva a concluir que la Psilocibina es totalmente segura para usos experimentales en individuos saludables (Hasler y Bourquin, 2002).

El artículo “The effects of consciousness-expanding drugs on prisoner rehabilitation” describe como desde 1960 se realizaron estudios acerca del uso de “Hongos Mágicos” para el tratamiento de enfermedades psiquiátricas y psicológicas. Uno de los proyectos y el más importante fue realizado por estudiantes de la Universidad de Harvard, el cual inició en el Instituto Correccional Concord Massachusetts donde se pretendía realizar una investigación detallada acerca de los efectos de la conciencia con el uso de dosis de Psilocibina en prisioneros (Leary, 1969).

En Marzo de 1961 se dio inicio al estudio de los efectos de la Psilocibina en prisioneros de la correccional de Concord, éste estaba conformado por seis prisioneros voluntarios y dos estudiantes de la Universidad de Harvard. A todos los

participantes se les suministró 20 mg del hongo mágico, incluyendo a los estudiantes de Harvard ya que uno de los requisitos para llevar a cabo el estudio fue que personal de la universidad participara en el desarrollo del proyecto para asegurar que el uso de la Psilocibina era totalmente seguro y no era perjudicial para la salud. Los participantes reportaron experimentar un incremento de los sentidos, en la vista y el oído. (Leary, 1969).

Después de seis meses de tratamiento los prisioneros cambiaron de actitud presentando un decrecimiento en la conducta hostil, cinismo, delincuencia e irresponsabilidad, tomando además un comportamiento mucho más maduro y social. El proyecto tuvo una duración de dos años, en donde participaron 168 personas de las cuales 131 eran reclusos y 37 personal de la Universidad de Harvard; los cuales luego del suministro de la droga no presentaron ningún episodio de violencia ni efectos negativos en la salud física o mental lo cual confirma que los efectos de la Psilocibina en bajas concentraciones tiene efectos positivos y satisfactorios (Leary, 1969).

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Localización

Las fermentaciones, la medición del crecimiento micelial y la cuantificación del consumo del sustrato y de proteína, se llevaron a cabo en el laboratorio de Biotecnología de la Universidad EAFIT; mientras que los análisis de cromatografía líquida de alta calidad (HPLC), se realizaron en el laboratorio de Química Instrumental de la misma Universidad

5.2 Microorganismo de estudio

La cepa del hongo *Psilocybe sp* (EAH01) con la cual se trabajará, fue donada por José Rodrigo Moreno, Ingeniero del laboratorio de la Universidad Católica de Oriente (UCO). La EAH01 permanece aún en el laboratorio de Biotecnología de la Universidad EAFIT. Dicha cepa se cultiva en una caja Petri que contiene Agar Extracto de Malta (MEA) y se incuba a 30°C en una incubadora del laboratorio de Biotecnología de la Universidad EAFIT. La imagen 2 (Fuente propia) representa una cepa de *Psilocybe sp* cultivada en medio sólido MEA.



Imagen 10: Cepa EAH01

5.3 Medio de Cultivo (Fang-Zhong modificado)

El medio sumergido utilizado para llevar a cabo las diferentes fermentaciones de *Psilocybe sp* está basado en el descrito por Fang-Zhong con una modificación en la fuente de carbono (Glucosa), debido a los requerimientos nutricionales del hongo. La tabla 2 muestra los componentes de dicho medio y la concentración de cada uno de ellos. Se destaca que la fuente de carbono utilizada es la glucosa, mientras que la fuente de nitrógeno utilizada es la peptona, variando la relación de carbono-nitrógeno (C/N) para cada experimento; y haciendo variaciones en la fuente de nitrógeno del medio base, por dos porcentajes diferentes de triptófano.

El diseño experimental 2^2 , con dos factores, y dos variables, se muestra en la tabla a continuación.

Medio de Cultivo	
Base (Fang y Zhong Modificado)	
FUENTE	g/L
Glucosa	50
Peptona	5
Extracto de Levadura	5
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,5
KH ₂ PO ₄	1
Vitamina B1	0,05
pH	5,5

Tabla 2: Medio de cultivo base (Fang y Zhong modificado)

Medio de Cultivo (M1)		
Base (Peptona 100% - C/N=5)		
FUENTE	g/L	4,5 Lt (gr)
Glucosa	40	180
Peptona	5	54
Extracto de Levadura	5	22.5
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0.5	2.25
KH ₂ PO ₄	1	4.5
Vitamina B1	0.05	0.225
pH	5.5	5.5

Tabla 3: Medio de Cultivo modificado llamado M1

Medio de Cultivo (M2)		
Base (Peptona 100% - C/N=15)		
FUENTE	g/L	4,5 Lt (gr)
Glucosa	50	225
Peptona	3.4	15.3
Extracto de Levadura	5	22.5
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0.5	2.25
KH ₂ PO ₄	1	4.5
Vitamina B1	0.05	0.225
pH	5.5	5.5

Tabla 4: Medio de Cultivo modificado llamado M2

Medio de Cultivo (M3)		
Base (Peptona 60% + Triptófano 40% - C/N=5)		
FUENTE	g/L	4,5 Lt (gr)
Glucosa	40	180
Peptona	2.5	11.25
Triptófano	1.6	7.2
Extracto de Levadura	5	22.5
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0.5	2.25
KH ₂ PO ₄	1	4.5
Vitamina B1	0.05	0.225
pH	5.5	5.5

Tabla 5: Medio de Cultivo modificado llamado M3

Medio de Cultivo (M4)		
Base (Peptona 60% + Triptófano 40% - C/N=15)		
FUENTE	g/L	4,5 Lt (gr)
Glucosa	50	225
Peptona	5	11.25
Triptófano	1.6	7.2
Extracto de Levadura	5	22.5
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0.5	2.25
KH ₂ PO ₄	1	4.5
Vitamina B1	0.05	0.225
pH	5.5	5.5

Tabla 6: Medio de Cultivo modificado llamado M4

Diseño Factorial Completo 2 ²		
Tratamiento	X ₁	X ₂
1	-1	-1
2	-1	1
3	1	-1
4	1	1

Tabla 7: Diseño de experimento Factorial Completo 2²

Nomenclatura	Factor	Mínimo	Máximo
		-1	1
X ₁	Relación C/N	5	15
X ₂	% de Triptófano	0	40

Tabla 8: Descripción diseño de experimento

5.4 Preparación de los diferentes preinóculos de *Psilocybe sp* utilizados para las fermentaciones sumergidas

Con el propósito de llevar a cabo cada uno de los ensayos, fue necesario realizar la preparación de un preinóculo con el fin de realizar un proceso de adaptación del *Psilocybe sp* al medio, favoreciendo la disminución en cuanto a tiempo (preferiblemente la eliminación de la aparición de un fase de latencia una vez comenzada la fermentación). La preparación de cada uno de los preinóculos se realizó en 2 erlenmeyers de 1000 mL con 200 mL de medio cada uno, los cuales se esterilizaron a 120°C por 15 minutos e inocularon con 20 ml aproximadamente de *P. cubensis*, provenientes de la cepa previamente cultivada en medio líquido. Los erlenmeyers se llevaron a un agitador orbital por 6 días a 30°C y 100 rpm.

5.5 Preparación de los medios de cultivo y los inóculos de *Psilocybe sp* utilizados para las fermentaciones sumergidas

Una vez se realizó el preinóculo, se procedió a preparar los medios de cultivo utilizados para realizar los distintos experimentos de la siguiente manera:

Se prepararon medios que diferían, del medio base, en la fuente de carbono (glucosa) y en la concentración de la misma; teniendo así un total de cuatro fermentaciones. Las demás cantidades de los componentes del medio base fueron las mismas que las usadas en el preinóculo descritas en la Tabla 2. En primer lugar, se llevó a cabo las dos fermentaciones de relación C/N, preparando un total de 90 erlenmeyers (15 por cada concentración de azúcar, por triplicado); cada uno de los frascos contenía 100 mL del medio en erlenmeyers de 250 mL, y fueron inoculados con 0.1 g de peso húmedo del preinóculo, aproximadamente. Los 90 frascos se llevaron, durante 14 días, a un agitador orbital a 100 rpm con una temperatura de 30 °C. Posteriormente, se llevaron a cabo las dos fermentaciones de triptófano, siguiendo el mismo proceso descrito anteriormente para la glucosa.

5.6 Cuantificación del crecimiento de biomasa mediante los métodos de peso húmedo y peso seco para el cultivo sumergido de *Psilocybe sp*

La cuantificación de biomasa para cada uno de los tratamientos se realizó usando la metodología de peso húmedo y peso seco. Para la cuantificación de biomasa mediante el método de peso húmedo se tomaron tres muestras provenientes de cada erlenmeyer cada 24 horas, las cuales fueron filtradas y pesadas con el fin de obtener el valor de peso húmedo para cada tratamiento del *Psilocybe sp*.

Posteriormente, la biomasa retenida en el papel filtro fue llevada a un secador que estaba a una temperatura de 50°C durante 24 horas; transcurrido el tiempo, la biomasa seca se pesó con el fin de obtener datos de peso seco. Durante los 15 días de la fermentación se obtuvieron los datos de peso húmedo y peso seco por triplicado para cada una de las fermentaciones.

5.7 Evaluación del consumo de sustrato por parte del *Psilocybe sp* cultivado en medio sumergido

Con el fin de evaluar el consumo de sustrato y proteína por parte del *Psilocybe sp* durante las fermentaciones que contenían glucosa en el medio, se recolectaron muestras cada 24 horas del líquido obtenido después de realizada la filtración de la muestra que se utilizaba para efectos de cálculo de peso seco, dicho líquido denominado sobrenadante se almacenó a -4 °C. Finalizadas cada una de las fermentaciones, se procedió a realizar el protocolo para evaluar el consumo de sustrato para cada medio mediante el método de DNS (Ácido Dinitrosalicílico) (Miller, 1959).

Para llevar a cabo la cuantificación de sustrato y proteína en los distintos ensayos fue necesario realizar las curvas de calibración correspondientes, dichas curvas con sus respectivos valores de concentración.

5.8 Método para determinar la presencia de Psilocibina mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

Una vez evaluado el consumo de sustrato, se procedió a determinar mediante el uso de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), la presencia de los alcaloides en la mezcla con sus respectivos tiempos de retención; para llevar a cabo la extracción de la Psilocibina, se sigue el método descrito por Musshoff, et al., (2000).

Para ello, la muestra de biomasa seca se maceró en un mortero hasta convertirla en un polvo fino. Cinco miligramos de la muestra en polvo se extrajeron dos veces con 2 mL de metanol en un baño de ultrasonido durante 30 minutos. Posterior a ésto, se centrifugaron las muestras a 3000 rpm durante 5 minutos; el sobrenadante se depositó en un vial independiente

El equipo utilizado para realizar todos los análisis correspondientes a HPLC cuenta con las siguientes características: equipo Agilent Technologies que consta de una columna C18, de 46 mm * 250 mm * 5 mm, con una fase móvil de HCOONH₄ con una concentración 10 µM y un pH de 3.5 y un flujo de 1 mL/minuto; un detector UV de 214 nm y una inyección de 20 µL y una temperatura de 25°C. El experimento se corre de modo isocrático con una fase móvil de agua 70 y HCOONH₄ de 30.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Cinética de crecimiento del hongo *Psilocybe sp* en el medio sumergido base

Para evaluar el crecimiento micelial del *Psilocybe sp* en el medio líquido base durante 15 días, se usó la metodología de peso húmedo y peso seco; pero sólo se exponen los datos arrojados por el método de peso seco.

A continuación se presentan cada una de las fermentaciones dependiendo del porcentaje de peptona sustituido por, los respectivos valores de peso seco obtenidos y los análisis para cada caso.

6.2 Crecimiento micelial de *Psilocybe sp* en medio sumergido utilizando diferentes porcentajes de Triptófano

Se evaluaron 4 medios con diferente porcentaje de peptona sustituido por triptófano, y variando la relación C/N en el cultivo sumergido de *Psilocybe sp* de los medios correspondientes a 40%, 60%, 5, y 15, respectivamente.

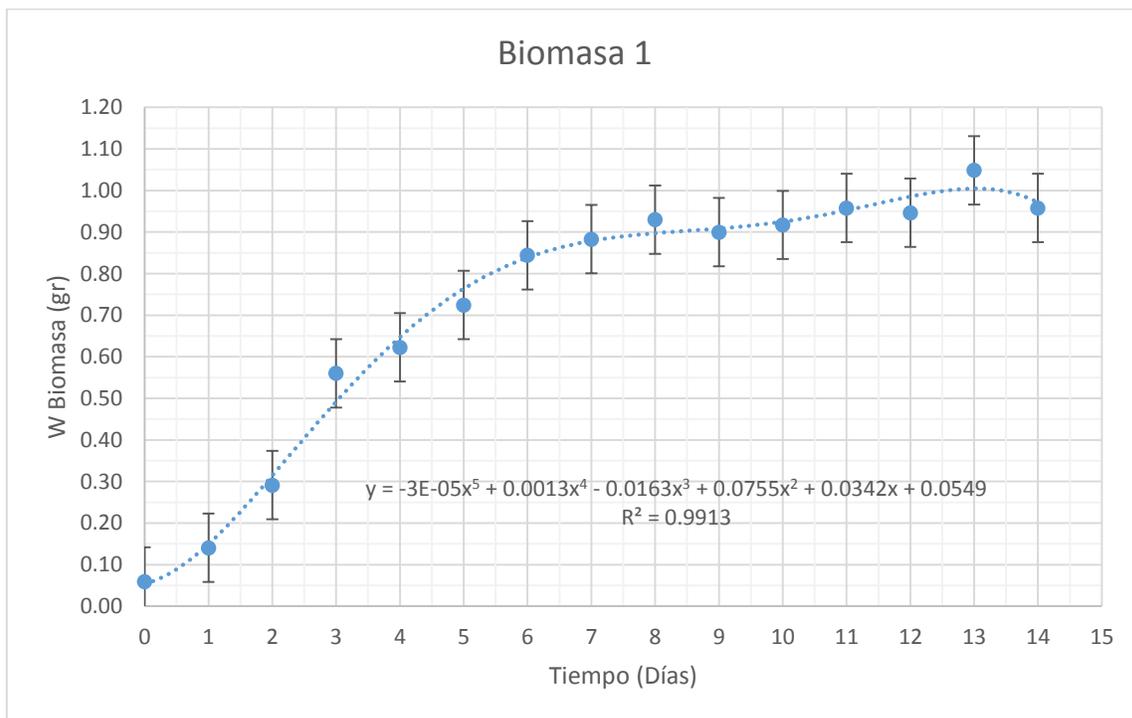
A continuación se muestran los valores de peso seco obtenidos para cada variación del medio sumergido base, durante los 15 días de la fermentación.

Tiempo (Días)	M1					
	$W_{BIOMASA}$ (gr)	$\mu_{m\acute{a}x}$	$X_{te\acute{o}}$	$\ln((X_{m\acute{a}x}/X)-1)$	$W_{PROM\ BIOM}$ (gr)	Error Est\andar
0	0.06	ND	ND	2.78	0.06	0.00
1	0.14	0.77	0.14	1.87	0.14	0.01
2	0.29	0.84	0.29	0.96	0.29	0.00
3	0.56	0.92	0.56	-0.13	0.56	0.04
4	0.62	0.75	0.62	-0.37	0.62	0.04
5	0.72	0.69	0.72	-0.79	0.72	0.01
6	0.84	0.67	0.84	-1.40	0.84	0.01
7	0.88	0.61	0.88	-1.64	0.88	0.01
8	0.93	0.59	0.93	-2.02	0.93	0.02
9	0.90	0.49	0.90	-1.77	0.90	0.03
10	0.92	0.46	0.92	-1.91	0.92	0.02
11	0.96	0.46	0.96	-2.31	0.96	0.03

12	0.95	0.40	0.95	-2.18	0.95	0.01
13	1.05	ND	ND	-5.47	1.05	0.00
14	0.96	0.36	0.96	-2.31	0.96	0.01

*ND = No Determinado

Tabla 9: Cinética de crecimiento micelial de *Psilocybe sp* en medio sumergido M1



Gráfica 1: Cinética de crecimiento micelial de *Psilocybe sp* en medio sumergido M1

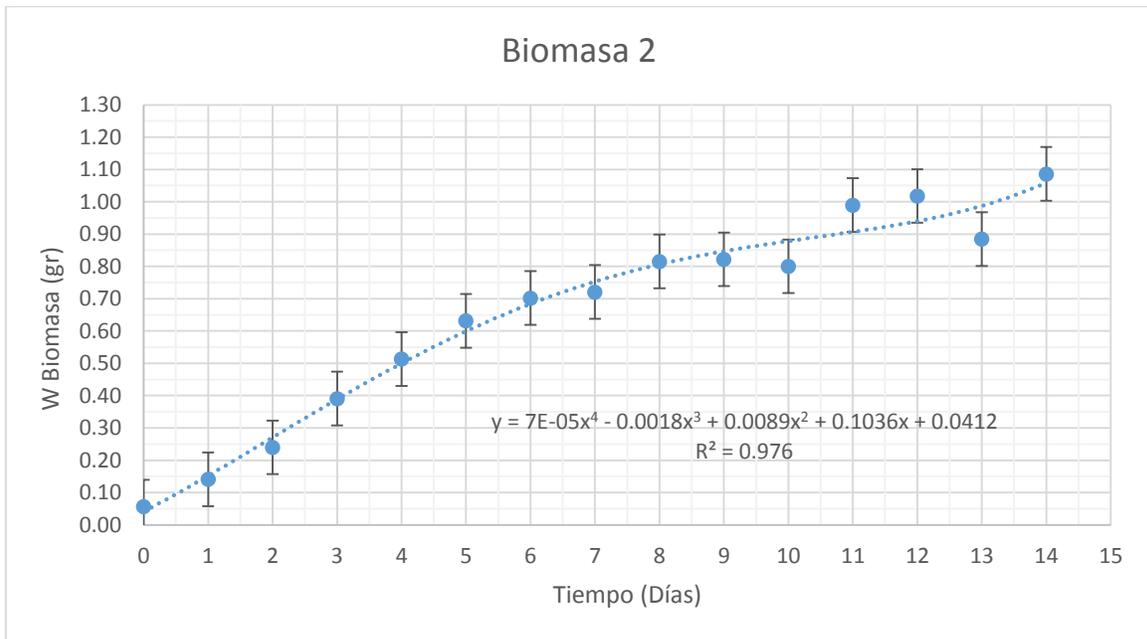
Tiempo (Días)	M2					
	$W_{BIOMASA}$ (gr)	$\mu_{m\acute{a}x}$	$X_{te\acute{o}}$	$\ln((X_{m\acute{a}x}/X)-1)$	$W_{PROM BIOM}$ (gr)	Error Est\andar
0	0.06	ND	ND	2.51	0.06	0.00

1	0.14	1.15	0.14	1.87	0.14	0.01
2	0.24	0.90	0.24	1.22	0.24	0.00
3	0.39	0.83	0.39	0.53	0.39	0.05
4	0.51	0.74	0.51	0.05	0.51	0.03
5	0.63	0.69	0.63	-0.40	0.63	0.00
6	0.70	0.62	0.70	-0.69	0.70	0.02
7	0.72	0.54	0.72	-0.77	0.72	0.04
8	0.82	0.53	0.82	-1.23	0.82	0.01
9	0.82	0.48	0.82	-1.27	0.82	0.02
10	0.80	0.42	0.80	-1.15	0.80	0.04
11	0.99	ND	ND	-2.75	0.99	0.04
12	1.02	ND	ND	-3.37	1.02	0.02
13	0.88	0.36	0.88	-1.66	0.88	0.03

14	1.09	ND	ND	0.05	1.09	0.06
----	------	----	----	------	------	------

*ND = No Determinado

Tabla 10: Cinética de crecimiento micelial de *Psilocybe sp* en medio sumergido M2



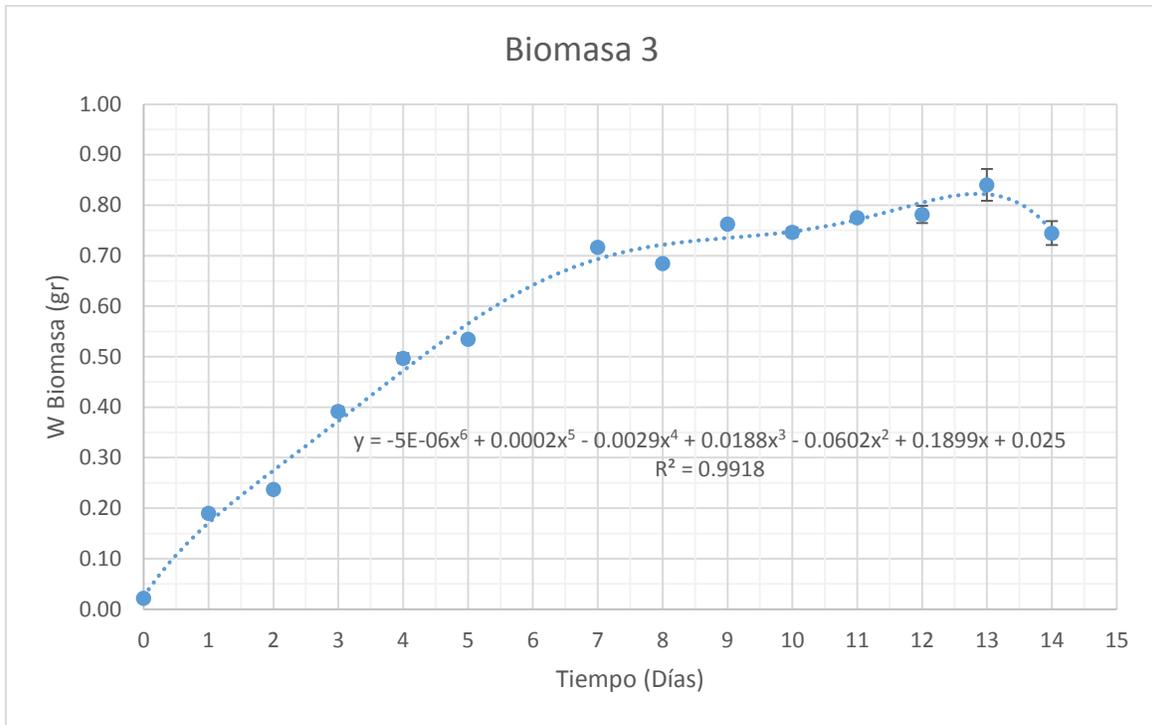
Gráfica 2: Cinética de crecimiento micelial de *Psilocybe sp* en medio sumergido M2

Tiempo (Días)	M3					
	W _{BIOMASA} (gr)	μ _{máx}	X _{teó}	Ln((X _{máx} /X)-1)	W _{PROM BIOM} (gr)	Error Estándar
0	0.02	ND	ND	1.62	0.02	0.00
1	0.19	3.85	0.19	1.32	0.19	0.01
2	0.24	2.07	0.24	1.03	0.24	0.00
3	0.39	1.63	0.39	0.27	0.39	0.01

4	0.50	1.34	0.50	-0.20	0.50	0.01
5	0.53	1.11	0.53	-0.37	0.53	0.01
6	0.00	ND	ND	ND	0.00	0.00
7	0.72	0.93	0.72	-1.35	0.72	0.01
8	0.68	0.79	0.68	-1.14	0.68	0.00
9	0.76	0.76	0.76	-1.69	0.76	0.01
10	0.75	0.67	0.75	-1.56	0.75	0.01
11	0.78	0.63	0.78	-1.80	0.78	0.01
12	0.78	0.59	0.78	-1.86	0.78	0.02
13	0.84	ND	ND	-2.59	0.84	0.03
14	0.74	0.48	0.74	-1.55	0.74	0.02

*ND = No Determinado

Tabla 11: Cinética de crecimiento micelial de *Psilocybe* sp en medio sumergido M3



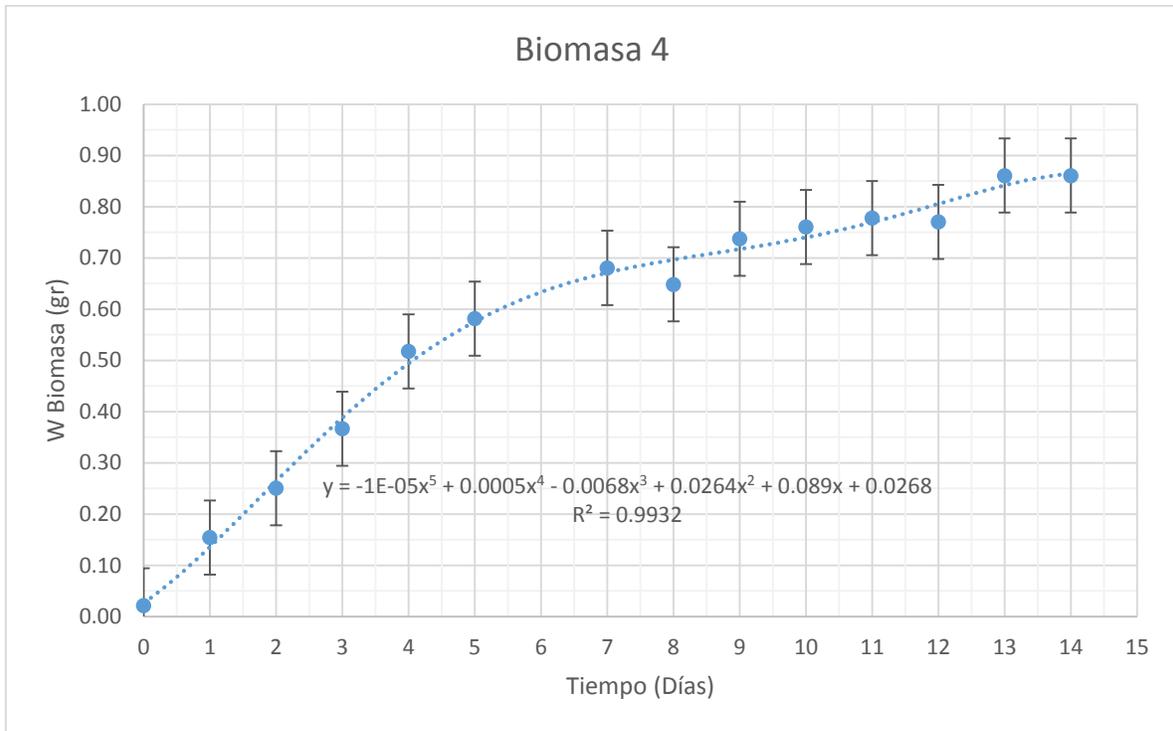
Gráfica 3: Cinética de crecimiento micelial de *Psilocybe sp* en medio sumergido M3

Tiempo (Días)	M4					
	$W_{BIOMASA}$ (gr)	$\mu_{m\acute{a}x}$	$X_{te\acute{o}}$	$\ln((X_{m\acute{a}x}/X)-1)$	$W_{PROM BIOM}$ (gr)	Error Est\andar
0	0.02	ND	ND	2.20	0.02	0.00
1	0.15	3.59	0.15	1.58	0.15	0.01
2	0.25	2.11	0.25	0.96	0.25	0.01
3	0.37	1.60	0.37	0.38	0.37	0.03
4	0.52	1.37	0.52	-0.29	0.52	0.01
5	0.58	1.15	0.58	-0.59	0.58	0.01

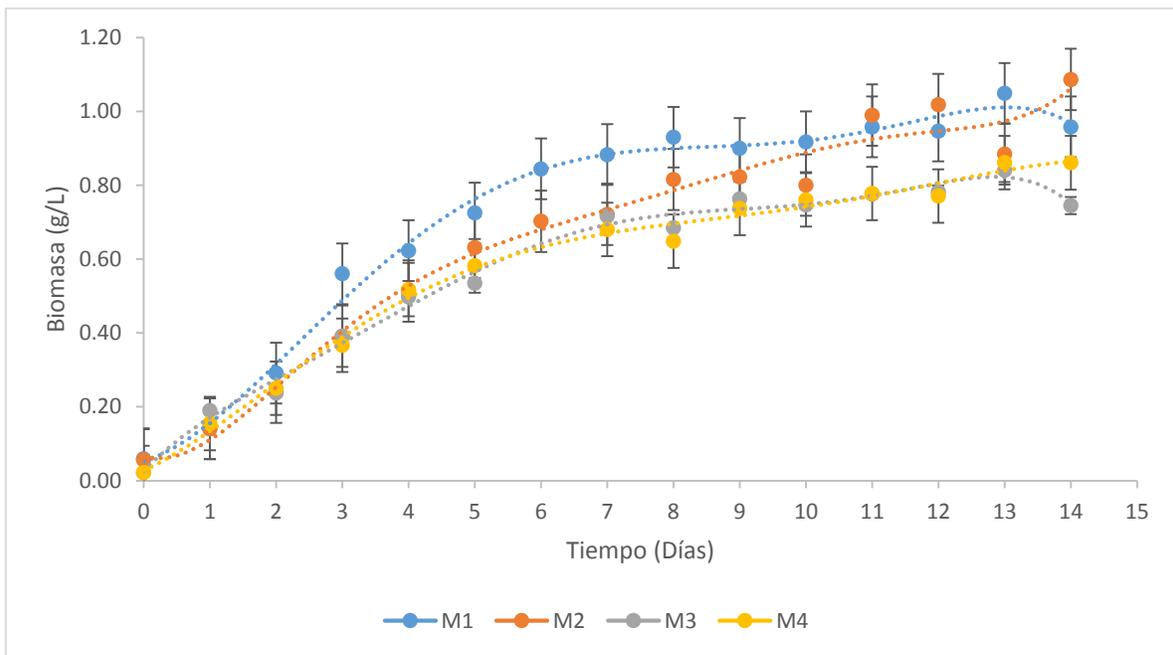
6	0.00	ND	ND	ND	0.00	0.00
7	0.68	0.90	0.68	-1.12	0.68	0.01
8	0.65	0.76	0.65	-0.93	0.65	0.02
9	0.74	0.74	0.74	-1.49	0.74	0.02
10	0.76	0.68	0.76	-1.67	0.76	0.01
11	0.78	0.64	0.78	-1.82	0.78	0.01
12	0.77	0.58	0.77	-1.76	0.77	0.01
13	0.86	0.63	0.86	-3.01	0.86	0.01
14	0.86	0.59	0.86	-3.01	0.86	0.01

*ND = No Determinado

Tabla 12: Cinética de crecimiento micelial de *Psilocybe sp* en medio sumergido M4



Gráfica 4: Cinética de crecimiento micelial de *Psilocybe sp* en medio sumergido M4



Gráfica 5: Cinética de crecimiento micelial de *Psilocybe sp* en medio sumergido (base) utilizando cuatro medios diferentes (Peso seco)

De la gráfica 5 se puede observar que no hubo evidencia de la fase de latencia en ninguno de los medios.

También, se puede afirmar que la fase exponencial parece avanzar con la fermentación en los medios con una relación C/N = 15. Mientras que los medios con la relación C/N = 5, presentan una fase exponencial y estacionaria más notoria.

Además se puede observar que en los medios M2 y M4, el crecimiento de biomasa se ve aumentado a partir del día 13, los cuales presentan una relación de C/N = 15.

De los medios M1 y M3, se puede ver que presentan un comportamiento similar, mostrando una fase exponencial hasta el día 7, y una fase estacionaria hasta el día 13, mostrando ésta fase estacionaria un crecimiento muy pequeño; después las fases comienzan a decaer.

También se puede observar en la gráfica que el crecimiento máximo de los cuatro medios se da en el día 13, sin importar la tendencia del mismo.

6.3 Ajuste de la cinética de crecimiento de *Psilocybe sp* al modelo cinético logístico

El modelo logístico representa de buena manera el crecimiento del microorganismo hasta que éste alcanza la etapa estacionaria; sin embargo sus parámetros deben ser determinados para cada nuevo medio de cultivo.

Una vez se recolectaron los datos de cada ensayo y analizaron, se ajustaron al modelo logístico (ecuación 1), debido a que éste muestra resultados más reales cuando se cultivan hongos, pues su morfología es muy diferente a otros microorganismos, lo que dificulta la transferencia de masa (Bailey JE, 1986).

Éste modelo permite encontrar las variables cinéticas X_0 (cantidad inicial de biomasa), y $\mu_{m\acute{a}x}$ (velocidad máxima de crecimiento), entre otras.

Una vez que se linealiza la ecuación que describe el modelo se llega a la siguiente expresión:

$$\ln\left(\frac{X_{m\acute{a}x}}{X} - 1\right) = -\mu_{m\acute{a}x} * tiempo + \ln\left(\frac{X_{m\acute{a}x}}{X_0} - 1\right)$$

Ecuación 1: Ecuación linealizada del modelo logístico

Después de linealizar de la ecuación, se graficó $\ln((X_{m\acute{a}x}/X)-1)$ Vs. tiempo, obteniendo como pendiente la velocidad máxima de crecimiento ($\mu_{m\acute{a}x}$) y como

intercepto el $\ln((X_{m\acute{a}x}/X_0)-1)$ el cual permiti3 la obtenci3n de la concentraci3n inicial de biomasa, teniendo as3 los par3metros cin3ticos $\mu_{m\acute{a}x}$ y X_0 .

Se defini3 la concentraci3n m3xima de biomasa ($X_{m\acute{a}x}$) para poder hallar los par3metros cin3ticos mediante el modelo; cabe aclarar que dicho valor se toma de los resultados de biomasa adquiridos para cada ensayo mediante el m3todo de peso seco; y 3ste valor var3a para cada ensayo.

Una vez ajustados los datos de cada tratamiento al modelo log3stico, se calcul3 te3ricamente los valores de X (biomasa) que var3a con el tiempo, teniendo en cuenta los par3metros cin3ticos arrojados mediante el modelo log3stico utilizando la siguiente ecuaci3n:

$$X = \frac{X_0 * X_m * e^{\mu m * t}}{X_m - X_0 + X_0 * e^{\mu m * t}}$$

Ecuaci3n 2: Valores te3ricos de biomasa en el tiempo

Los valores de X te3ricos obtenidos mediante la f3rmula anterior se grafican con respecto a los valores de X obtenidos de manera experimental, con el fin de observar el ajuste del modelo log3stico a cada uno de los datos experimentales.

6.4 Aplicaci3n del modelo log3stico para los diferentes medios

Una vez que se realiza la cin3tica de crecimiento del *Psilocybe sp* en los diferentes medios de cultivo usando diferentes concentraciones de glucosa, peptona, y variando el % de tript3fano; se ajustaron los datos obtenidos al modelo log3stico. Los par3metros cin3ticos para cada ensayo se muestran en la tabla a continuaci3n (tabla 13).

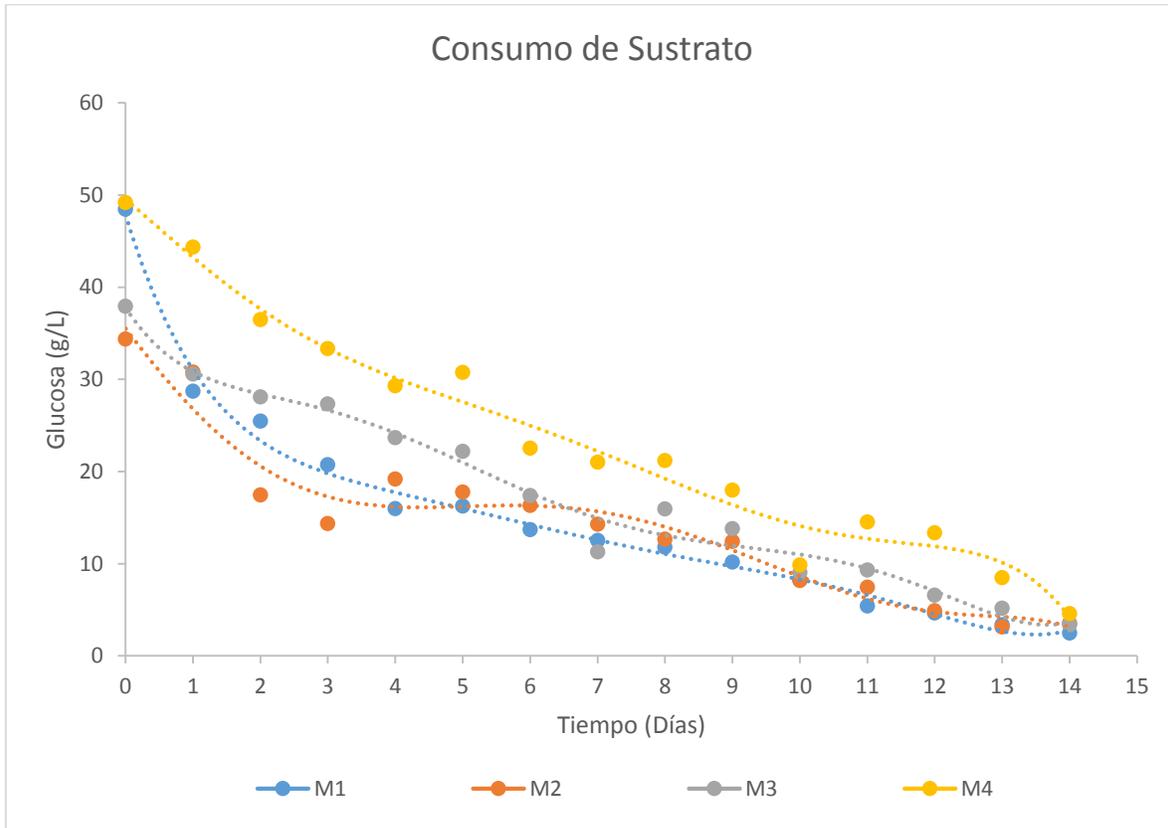
M1		M2		M3		M4	
μ_x (d3a ⁻¹)	0.13	μ_x (d3a ⁻¹)	0.16	μ_x (d3a ⁻¹)	0.18	μ_x (d3a ⁻¹)	0.16
$\mu_{m\acute{a}x}$ (d3a ⁻¹)	-0.74	$\mu_{m\acute{a}x}$ (d3a ⁻¹)	-0.82	$\mu_{m\acute{a}x}$ (d3a ⁻¹)	-	$\mu_{m\acute{a}x}$ (d3a ⁻¹)	-0.49
X_0 (g/L)	0.07	X_0 (g/L)	0.05	X_0 (g/L)	0.01	X_0 (g/L)	0.01
R^2	0.85	R^2	0.82	R^2	0.96	R^2	0.96

Tabla 13: Par3metros cin3ticos obtenidos mediante el modelo log3stico para las diferentes fermentaciones de *Psilocybe sp*.

De 3sta tabla se puede observar que los medios M1 y M2, y M3 y M4, presentan valores similares de biomasa inicial; mientras que entre los cuatro medios se observa una variaci3n.

También se puede observar el mismo comportamiento para la velocidad máxima de crecimiento, donde los medios M3 y M4 muestran una similitud significativa, pero hay variación entre todos los medios.

De acuerdo con la tabla se puede decir que el medio en el cual se alcanza la mayor velocidad máxima de crecimiento ($\mu_{m\acute{a}x}$) es con el medio M2, que se puede observar en la gráfica 5.



Gráfica 6: Cinética de consumo de sustrato por parte del *Psilocybe sp* en medio sumergido utilizando diferentes concentraciones de glucosa como fuente de carbono

En la gráfica 6, se muestra que el *Psilocybe sp* consumió mayor cantidad de sustrato en el medio M4, mientras que los otros muestran un comportamiento más semejante en el tiempo.

6.5 Estudio cualitativo de la presencia del alcaloide

Para finalizar los ensayos para cada tratamiento utilizado se realizó un último análisis, que a la vez, fue el de mayor relevancia a la hora de determinar cuál de los medios fue el que mejores resultados arrojó.

Se procedió a utilizar la técnica de HPLC con el fin de hallar un porcentaje del compuesto de interés basado en las áreas obtenidas de los cromatogramas (asumiendo un tiempo de retención entre 4.8 y 5.2 minutos).

6.6 Estudio porcentual (área) del alcaloide realizado para los diferentes ensayos

El estudio porcentual por medio del HPLC se le realizó para la biomasa y el sobrenadante de cada muestra.

Se calculó el porcentaje de área correspondiente al pico identificado en el cromatograma, por medio de la suposición realizada del tiempo de retención. A continuación se presentan los valores obtenidos con su respectivo análisis para cada tratamiento.

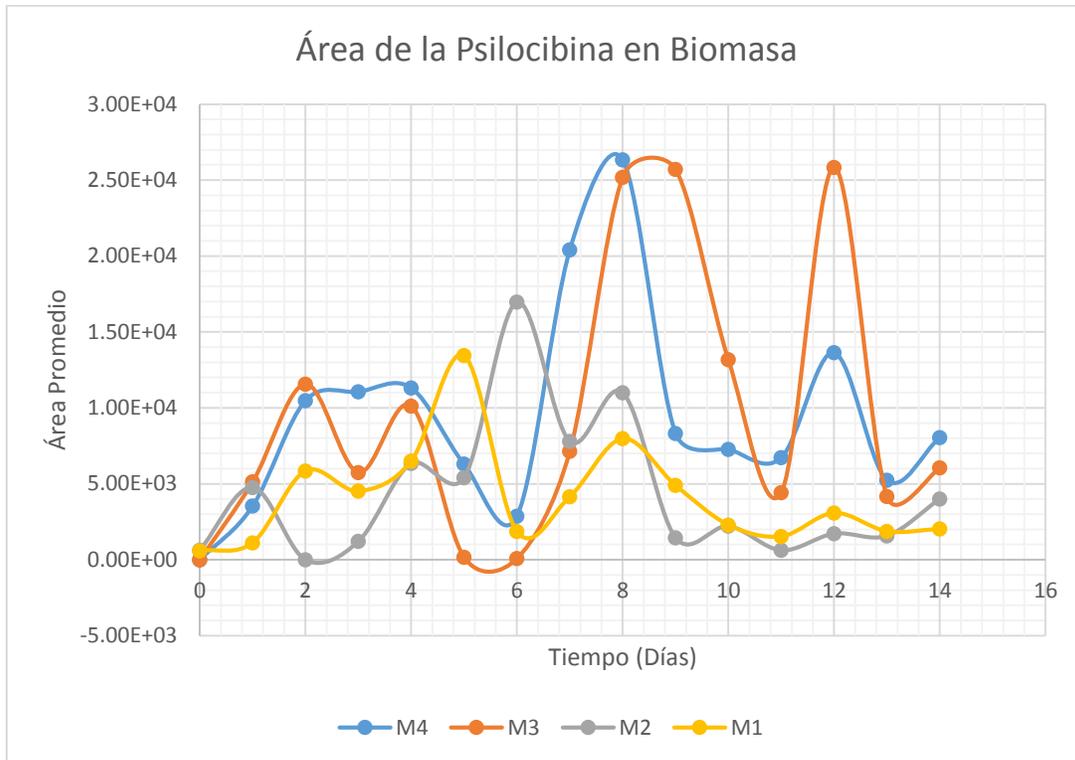
6.6.1 Porcentaje de la Psilocibina para los diferentes medios

Teniendo en cuenta que no se contó con un estándar de Psilocibina, los resultados mostrados en las gráficas a continuación, en donde se halló el porcentaje que correspondía al área bajo la curva del pico que arrojó el cromatograma (Anexos 4, 5 y 6). En dichos anexos se encuentran resaltadas en negrilla aquellas aéreas utilizadas.

A continuación se muestran las gráficas de los resultados de los obtenidos en los cromatogramas, para cada medio.

Biomasa				
t _{Días}	M1	M2	M3	M4
	Área (mAU*s)	Área (mAU*s)	Área (mAU*s)	Área (mAU*s)
8	7977.56	11006.02	25182.10	26340.43
9	4904.31	1457.57	25713.53	8331.16
10	2295.67	2217.28	13173.55	7275.53
12	3079.25	1721.70	25837.15	13642.49

Tabla 14: Porcentaje de las áreas de la biomasa para los cuatro medios



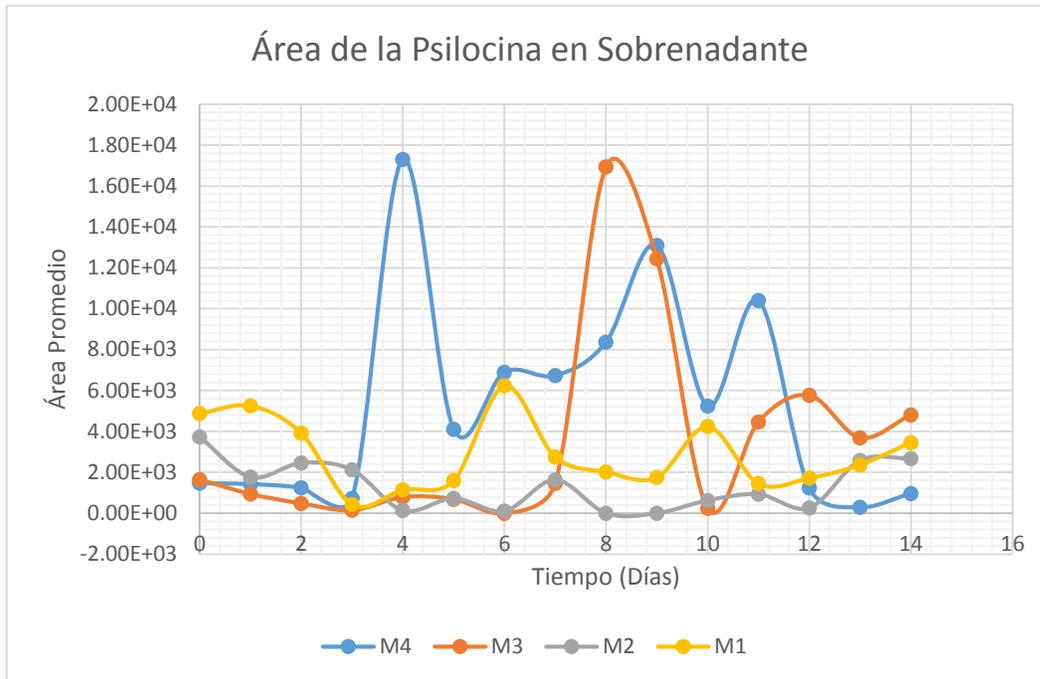
Gráfica 7: Porcentaje de las áreas de la biomasa para los cuatro medios

En la gráfica 7 se puede observar que el medio con mayor porcentaje del área bajo la curva fue M3, pues en el día 8 tiene un valor menor que el M4, pero tiene un porcentaje mayor que los demás medios en el día 9, y 12.

El siguiente medio en presentar porcentajes mayores fue el M4; mientras que los medios M1 y M2 presentan un comportamiento muy similar, mostrando porcentajes mayores el M2.

Sobrenadante				
t _{Días}	M1	M2	M3	M4
	Área (mAU*s)	Área (mAU*s)	Área (mAU*s)	Área (mAU*s)
4	1148.16	134.90	787.78	17298.54
8	2023.35	0.00	16938.90	8367.13
9	1757.60	0.00	12450.90	13104.36
10	4245.95	627.11	248.90	5249.30
11	1454.78	928.22	4463.31	10407.85

Tabla 15: Porcentaje de las áreas del sobrenadante para los cuatro medios



Gráfica 8: Porcentaje de las áreas del sobrenadante para los cuatro medios

En la gráfica del sobrenadante se puede observar que el medio con mayores porcentajes del área bajo la curva fue el M4, pues tiene picos un poco más significativos que el M3.

Por otra parte los medios M1 y M2 presentan un comportamiento similar, mostrando porcentajes más altos el M1.

De las gráficas anteriores se puede decir que los medios con mayores porcentajes del área bajo la curva son los medios M3 y M4, aunque difieren en la biomasa y el sobrenadante; caso que también se da con los medios de menores porcentajes (M1 y M2).

7 CONCLUSIONES

- Se presentan diferencias significativas en el crecimiento micelial del *Psilocybe sp* en los medios sumergidos base, y los medios modificados.
- Se observan diferencias en el crecimiento micelial del *Psilocybe sp* cuando se utilizaron los medios con diferentes relaciones C/N, y se puede observar que la relación que más favorece el crecimiento micelial es una relación C/N de 15.
- Se observan diferencias en el crecimiento micelial del *Psilocybe sp* cuando se utilizaron los medios con diferentes porcentajes de triptófano, y se puede observar que el porcentaje de triptófano que más favorece el crecimiento micelial es del 40%.
- Se observa que los medios modificados con triptófano muestran una tendencia de crecimiento en el día 13, a diferencia de los medios que no fueron modificados, que se puede observar que la tendencia comienza a decaer.
- EL porcentaje de triptófano tiene una influencia significativa en la resolución de los picos obtenidos por HPLC para el *Psilocybe sp*.
- La resolución de los picos obtenidos por HPLC para el *Psilocybe sp* es mucho mejor para las muestras de biomasa, que para las muestras del sobrenadante.
- Los medios con la relación de C/N y el porcentaje de triptófano modificados no presentan una diferencia muy significativa en cuanto a la producción de biomasa. Sin embargo, si existe una diferencia significativa en la producción del metabolito secundario, que se puede observar en los datos y gráficas arrojadas por los cromatogramas.
- El modelo logístico considera una limitación para el crecimiento, debido a que no consideran limitaciones por sustrato, por tanto sus parámetros deben ser determinados para cada sistema.
- Se puede afirmar que el tratamiento para el medio M4 fue el que arrojó resultados significativamente mejores; sin embargo el tratamiento para el medio M3 también puede considerarse conjuntamente significativo con el medio M4.

8 RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar una línea base del microorganismo de estudio, ya que en éste estudio no se realizó debido a los conocimientos y referencias bibliográficas del comportamiento del hongo.
- Se recomienda evaluar el efecto de la variación de factores como las el pH y la aireación, además de variables no tenidas en cuenta en éste estudio, a las cuáles fueron llevadas las fermentaciones, en el crecimiento micelial del *Psilocybe sp.*
- Del mismo modo, sería apropiado realizar el estudio de la Psilocina, también producido por el *Psilocybe sp.*, debido a la similitud de su estructura química con la Psilocibina, y debido a la síntesis del mismo.
- Se recomienda realizar un escalado de dicho proceso en un biorreactor, con el fin, de evaluar a mayor escala el crecimiento del *Psilocybe sp* y la producción del metabolito secundario.
- Debido a que se evidencian diferencias en las tendencias del crecimiento micelial del *Psilocybe sp* con la variación en la relación C/N, se sugiere evaluar el crecimiento del hongo variando éste factor.
- Se recomienda realizar una medida del peso seco del inóculo, para así optimizar y confirmar las mediciones de la metodología de la cinética de crecimiento del hongo.

9 ANEXOS

9.1 ANEXO 1. Determinación de consumo de azúcares por el método de DNS (Ácido Dinitrosalicílico)

DNS para glucosa

Pasos para preparar DNS:

- Disolver 1.6 gr de NaOH en agua destilada
- Adicionar 30 gr de tartrato de Na y K
- Aforar a 100 ml con agua destilada
- Almacenar en tubos eppendorff a 4°C

Se debe mantener un stock de glucosa 4mg/ml y almacenarlo a 4°C. A partir de la solución de glucosa se preparan las soluciones para hacer la curva patrón con las siguientes concentraciones (g/L): 0.25, 0.50, 1.00, 2.00 y 4.00

Procedimiento:

- Tomar 0.5 ml de cada dilución y agregar 0.5 ml de reactivo DNS.
- Preparar una muestra blanco por dilución de 0.5 ml de agua destilada a 0.5 ml de reactivo de DNS.
- Agitar todas las muestras.
- Poner al baño maría las muestras por cinco minutos, hasta el punto de ebullición.
- Esperar que las muestras se enfríen.
- Adicionar 5 ml de agua destilada.
- Agitar y dejar en reposo 15 minutos.
- Leer en espectrofotómetro a 540 nm.
- Realizar la curva Absorbancia Vs Concentración. Debe tener un coeficiente de correlación de 0.991 a 0.999.

9.2 ANEXO 2. CINÉTICA DE CONSUMO DE SUSTRATO

La cinética de consumo de sustrato se realizó por el método de Ácido Dinitrosalicílico (DNS). Los rangos de concentración y absorbancia para cada caso se citan a continuación.

Rangos de concentraciones y absorbancias para las fermentaciones que usaron como sustrato:

Concentración: de 0,2 a 1,2 g/L

Absorbancia: de 0,0924 a 0,5623

Ecuación: $Y = 0,4796x - 0,008187$ $R^2 = 0,9994$

9.3 ANEXO 3. BARRIDO ESPECTRAL PARA EL *Psilocybe sp*

La metodología mencionada a continuación está basada en artículo base (Musshoff, Madea, & Beike, Septiembre 11, 2000).

- Macerar la muestra en un mortero hasta obtener un polvo fino.
- 0.5 gr de la muestra se extraen con 2 ml de metanol en un baño de ultrasonido durante 30 min.
- Se centrifuga a 4500 rpm durante 5 min, y se vuelve al baño ultrasónico durante 15 min, se centrifuga de nuevo.
- El sobrenadante se lleva a un tubo eppendorff y se vuelve a centrifugar.
- Se extraen los 2 ml (aprox) del tubo eppendorff y se llevan a un vial de vidrio, pasando por un filtro de poliamida de 0,2 μ .
- El vial del HPLC debe contener un líquido filtrado y translúcido.

La fase móvil del HPLC contiene Acetato de Amonio (HCOONH_4) a una concentración de 10 μM y un pH de 3,5 y bombeado a un caudal de 0.2 ml/minuto.

El perfil cromatográfico obtenido durante la investigación de (Musshoff, Madea, & Beike, Septiembre 11, 2000) se muestra en le imagen 1, que aparece a continuación.

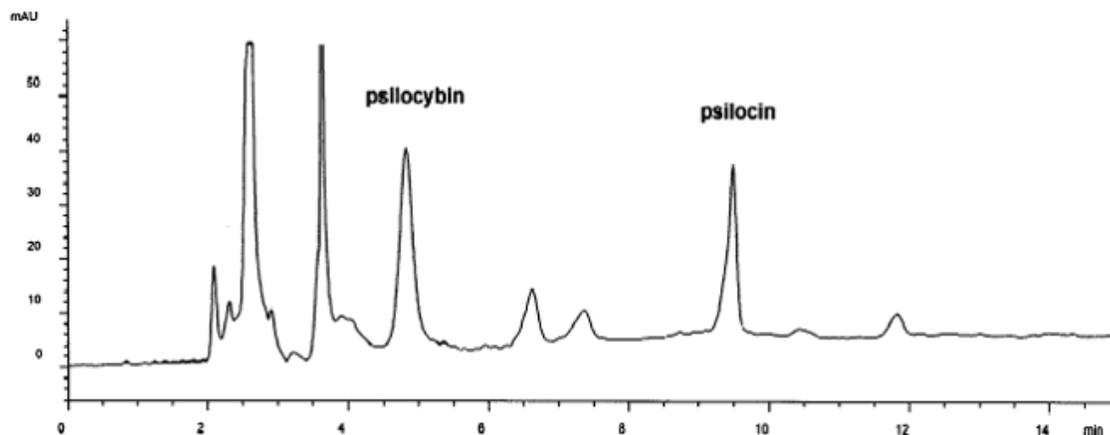


Imagen 10: Perfil cromatográfico (Musshoff, Madea, & Beike, Septiembre 11, 2000)

9.4 ANEXO 4. Cromatogramas (HPLC) del día 8 de fermentación

Biomasa				
t _{Días}	M1	M2	M3	M4
	Área (mAU*s)	Área (mAU*s)	Área (mAU*s)	Área (mAU*s)
8	7977.56	11006.02	25182.10	26340.43
Sobrenadante				
t _{Días}	M1	M2	M3	M4
	Área (mAU*s)	Área (mAU*s)	Área (mAU*s)	Área (mAU*s)
8	2023.35	0.00	16938.90	8367.13

Tabla 16: Áreas obtenidas de los cromatogramas para el *Psilocybe sp* en los medios base y modificados en el día 8 de las fermentaciones.

A continuación se presentan los cromatogramas obtenidos para el *Psilocybe sp* en los medios base y modificados en el día 8 de las fermentaciones, donde la nomenclatura es así:

M#: Medio en el cual fue cultivado

Letra (A, B, C): Muestra (fueron 3 muestras por día)

t#: día de la fermentación

s: sólo está presente cuando es un sobrenadante, de lo contrario se entiende que es biomasa.

Ej: M2At8s

La muestra fue cultivada en el medio M2, es la muestra A, en el día 8 de la fermentación, y es el sobrenadante.

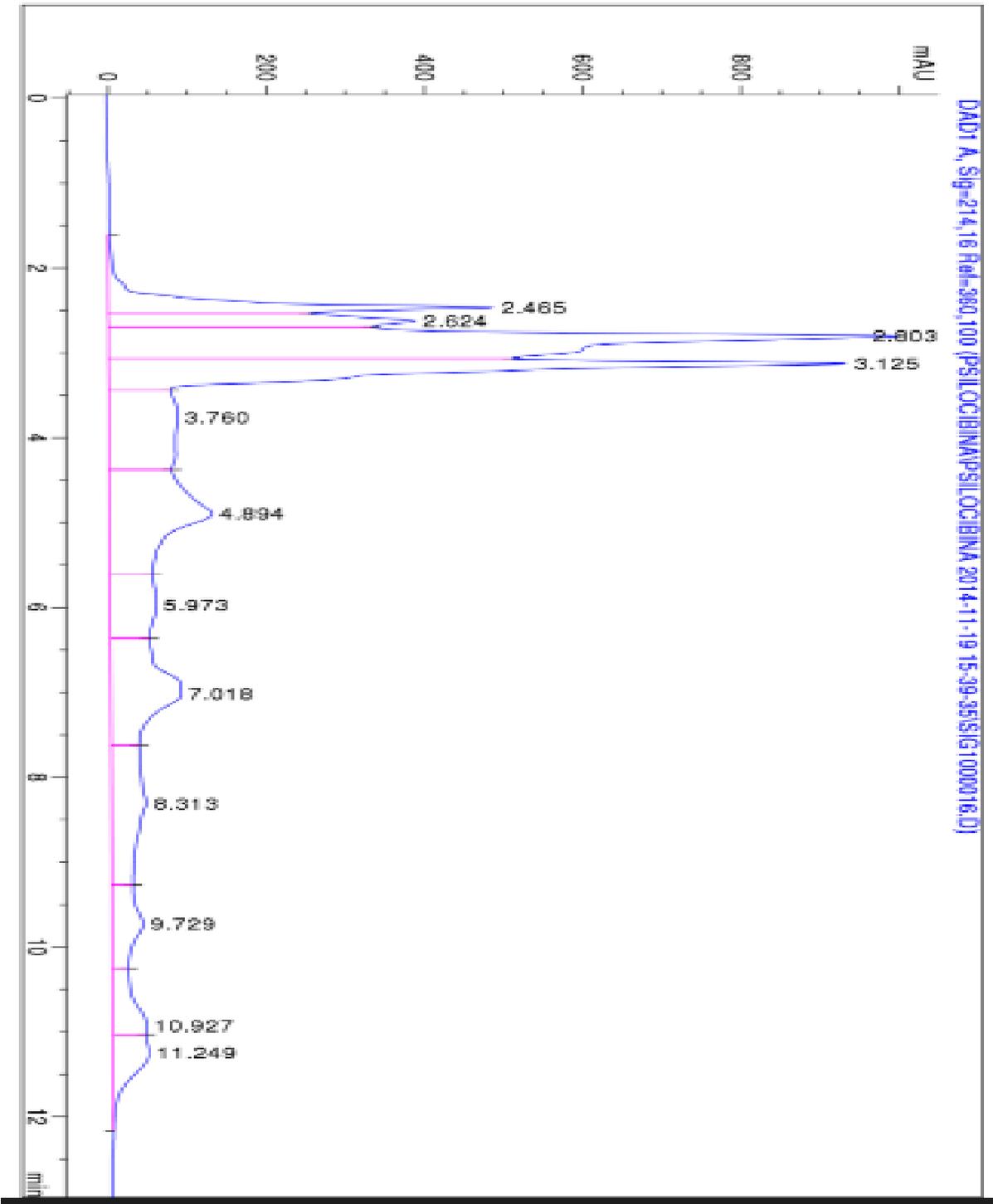


Imagen 11: M1At8

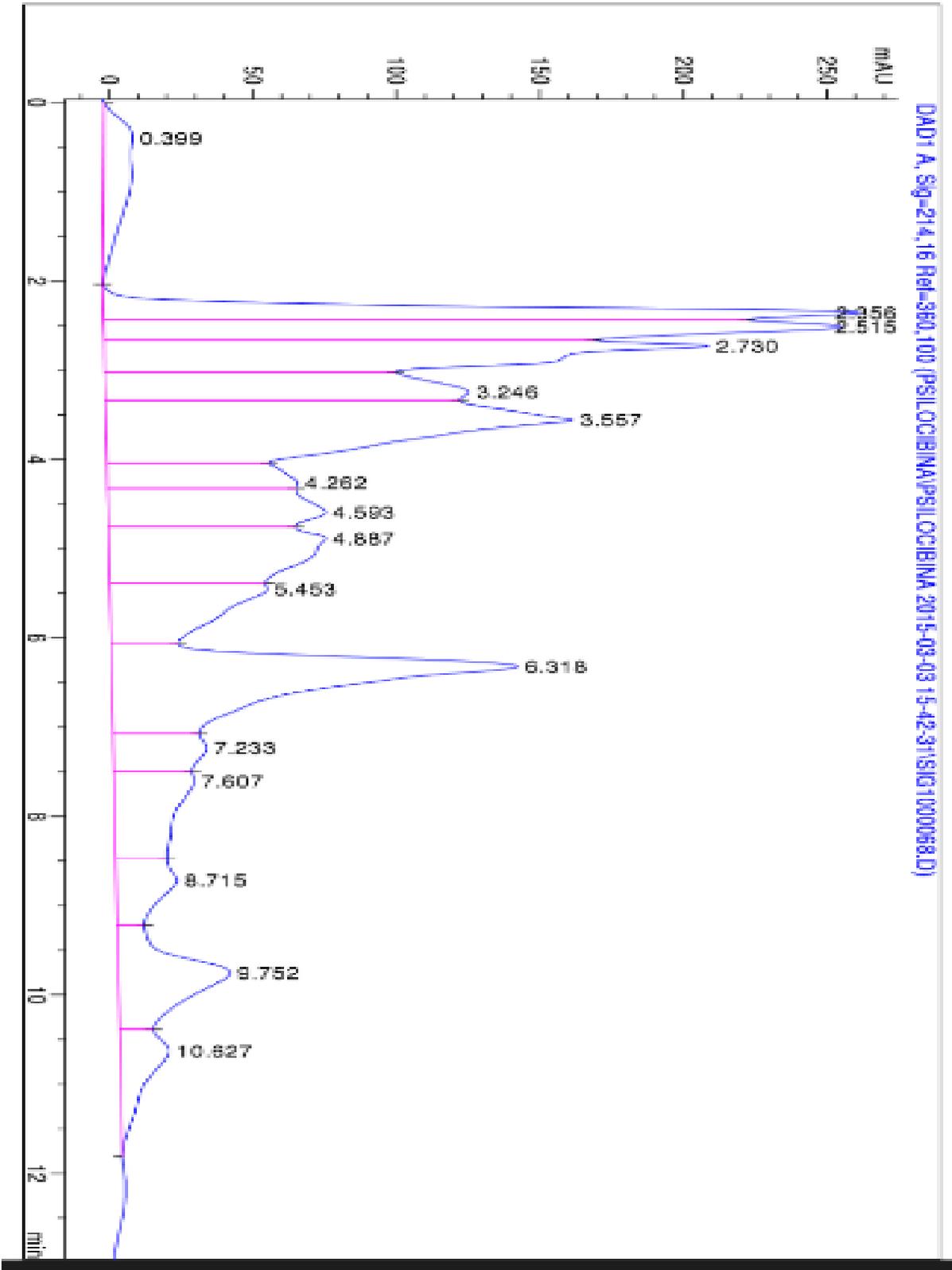


Imagen 12: M1Bt8s

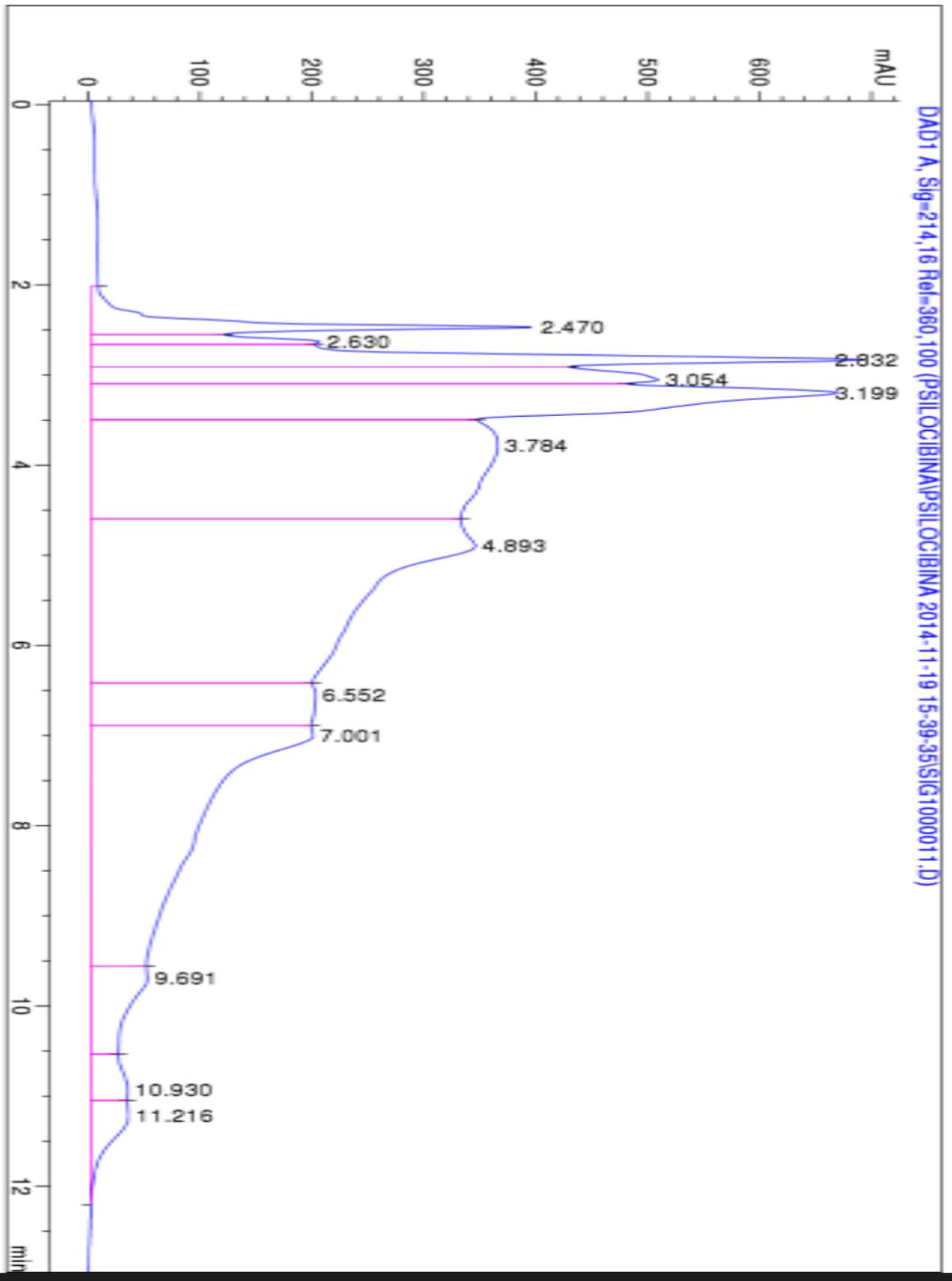


Imagen 13: M2Bt8

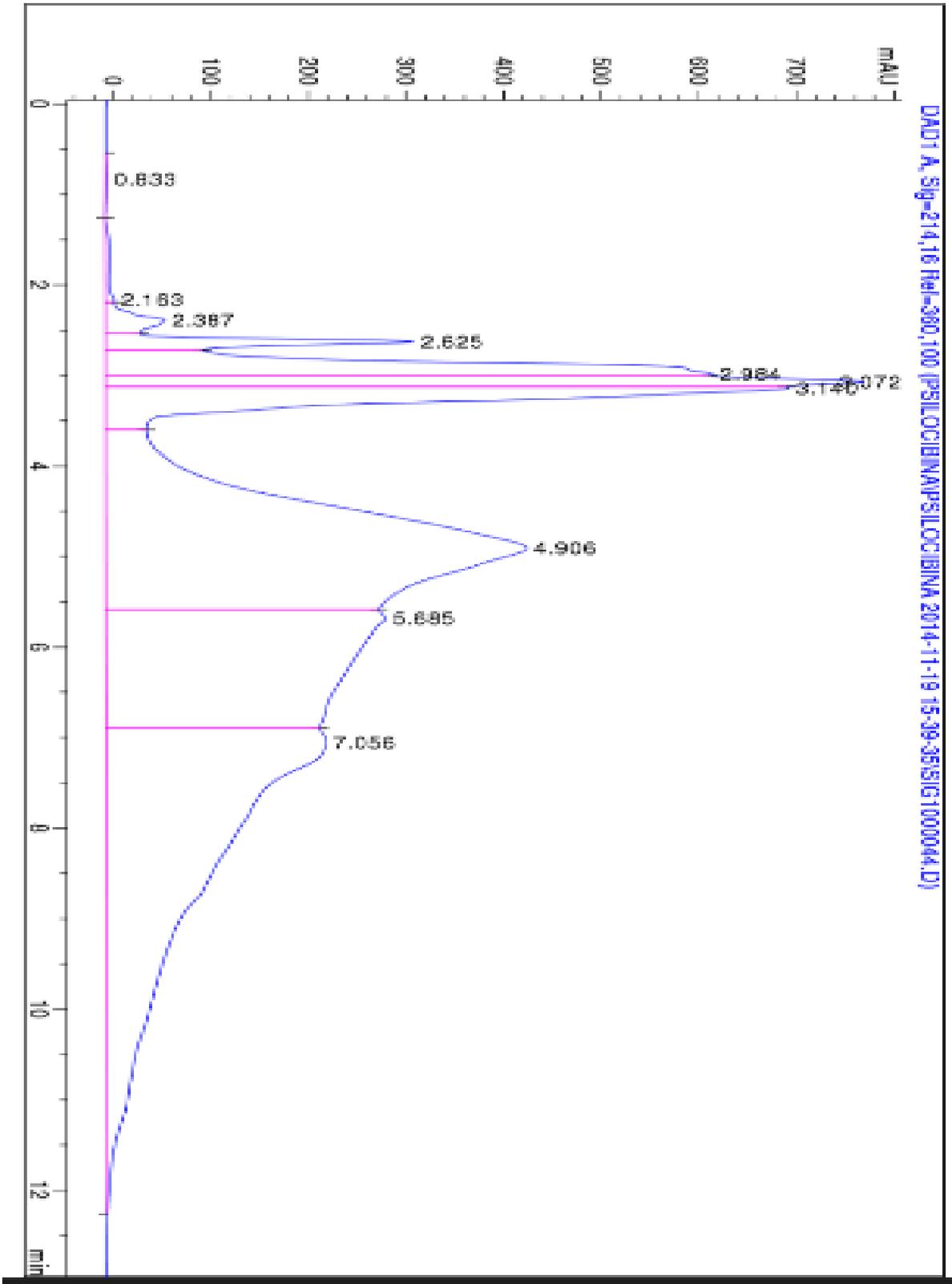


Imagen 14: M3Ct8

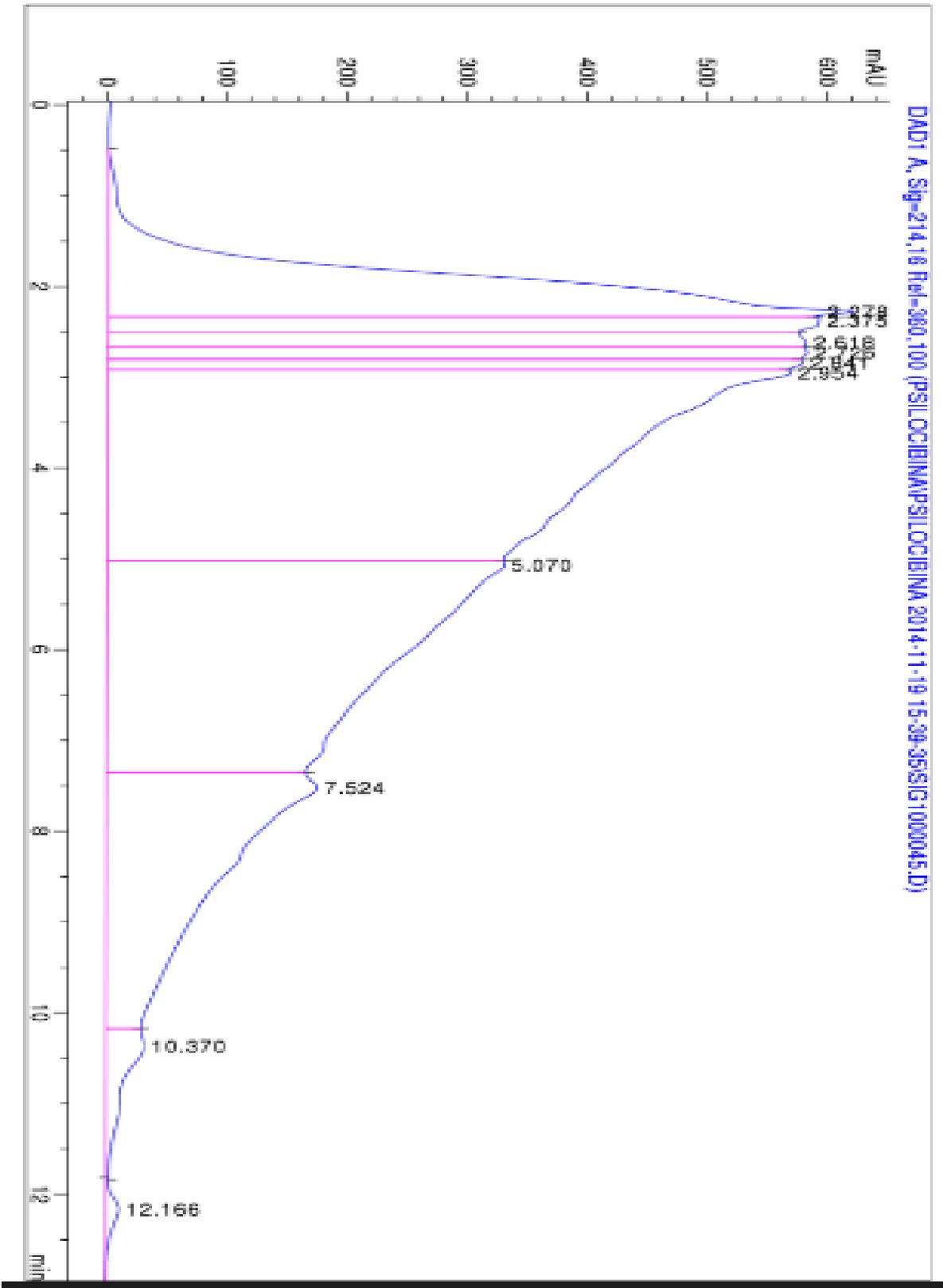


Imagen 15: M3At8s

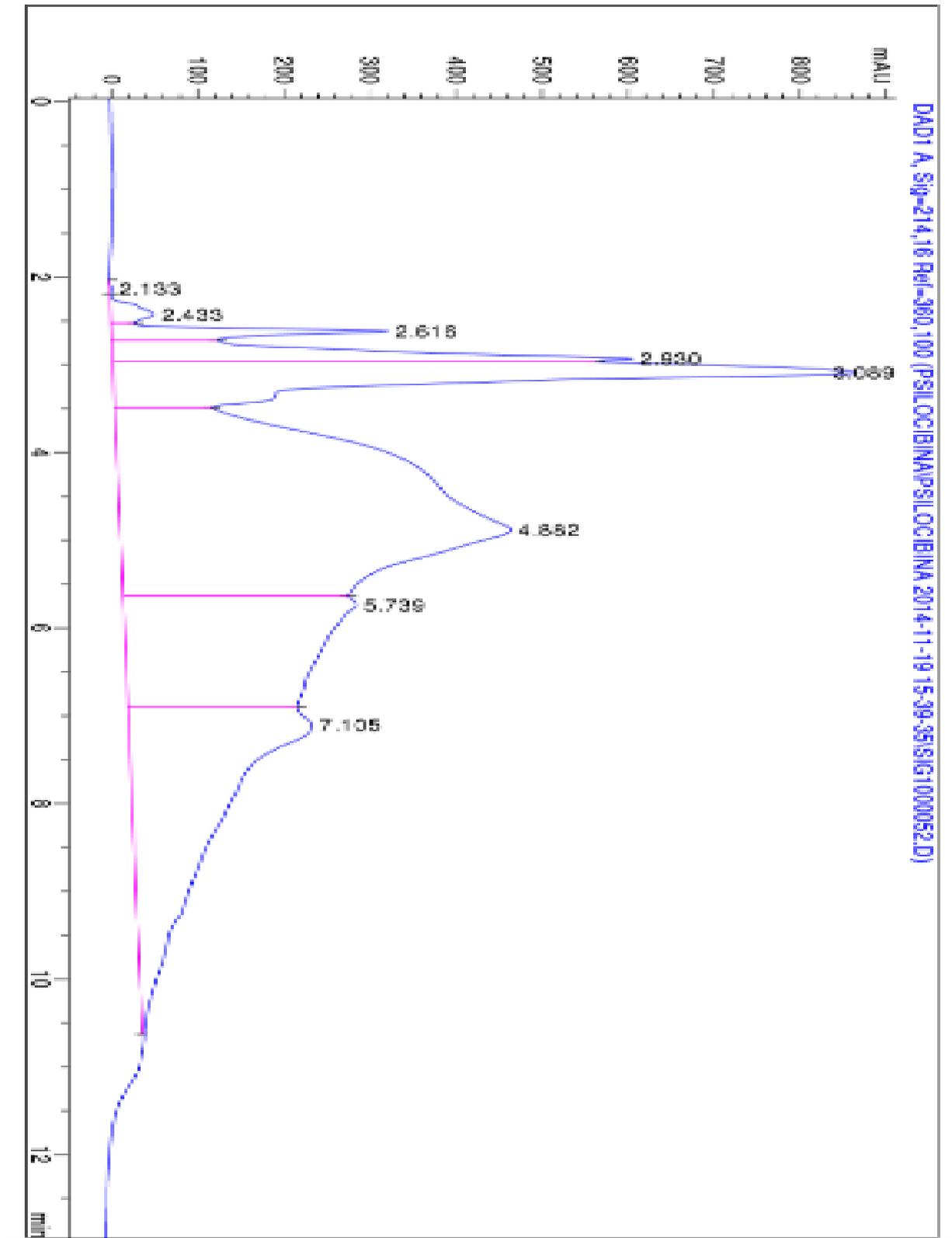


Imagen 16: M4At8

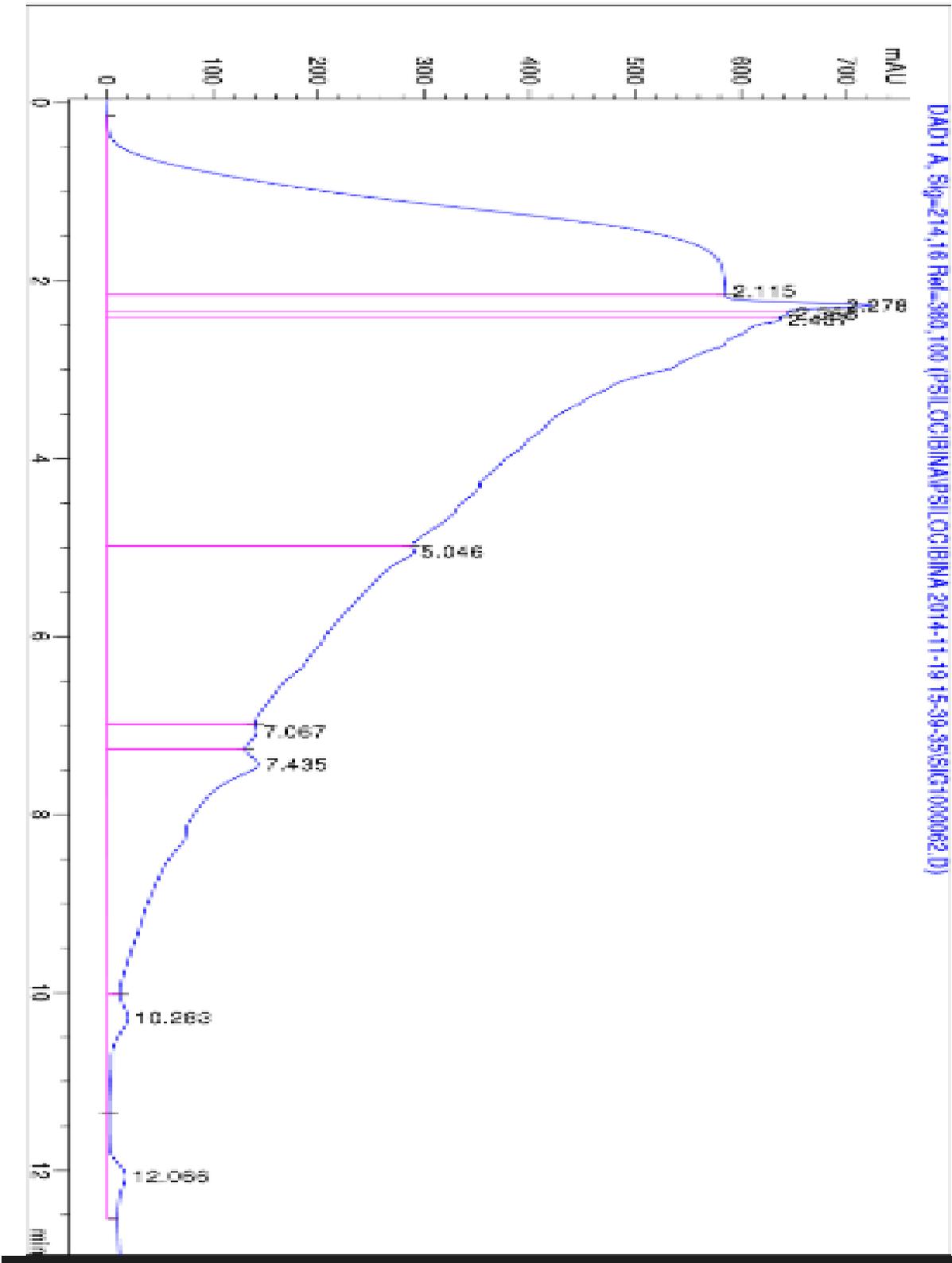


Imagen 17: M4At8s

9.5 ANEXO 5. Cromatogramas (HPLC) del día 9 de fermentación

Biomasa				
t _{Días}	M1	M2	M3	M4
	Área (mAU*s)	Área (mAU*s)	Área (mAU*s)	Área (mAU*s)
9	4904.31	1457.57	25713.53	8331.16
Sobrenadante				
t _{Días}	M1	M2	M3	M4
	Área (mAU*s)	Área (mAU*s)	Área (mAU*s)	Área (mAU*s)
9	1757.60	0.00	12450.90	13104.36

Tabla 17: Áreas obtenidas de los cromatogramas para el *Psilocibe sp* en los medios base y modificados en el día 9 de las fermentaciones

A continuación se presentan los cromatogramas obtenidos para el *P. cubensis* en los medios Fang y Zhong y modificados en el día 9 de las fermentaciones, donde la nomenclatura es así:

M#: Medio en el cual fue cultivado

Letra (A,B,C): Muestra (fueron 3 muestras por día)

t#: día de la fermentación

s: sólo está presente cuando es un sobrenadante, de lo contrario se entiende que es biomasa.

Ej: M2At8s

La muestra fue cultivada en el medio M2, es la muestra A, en el día 8 de la fermentación, y es el sobrenadante.

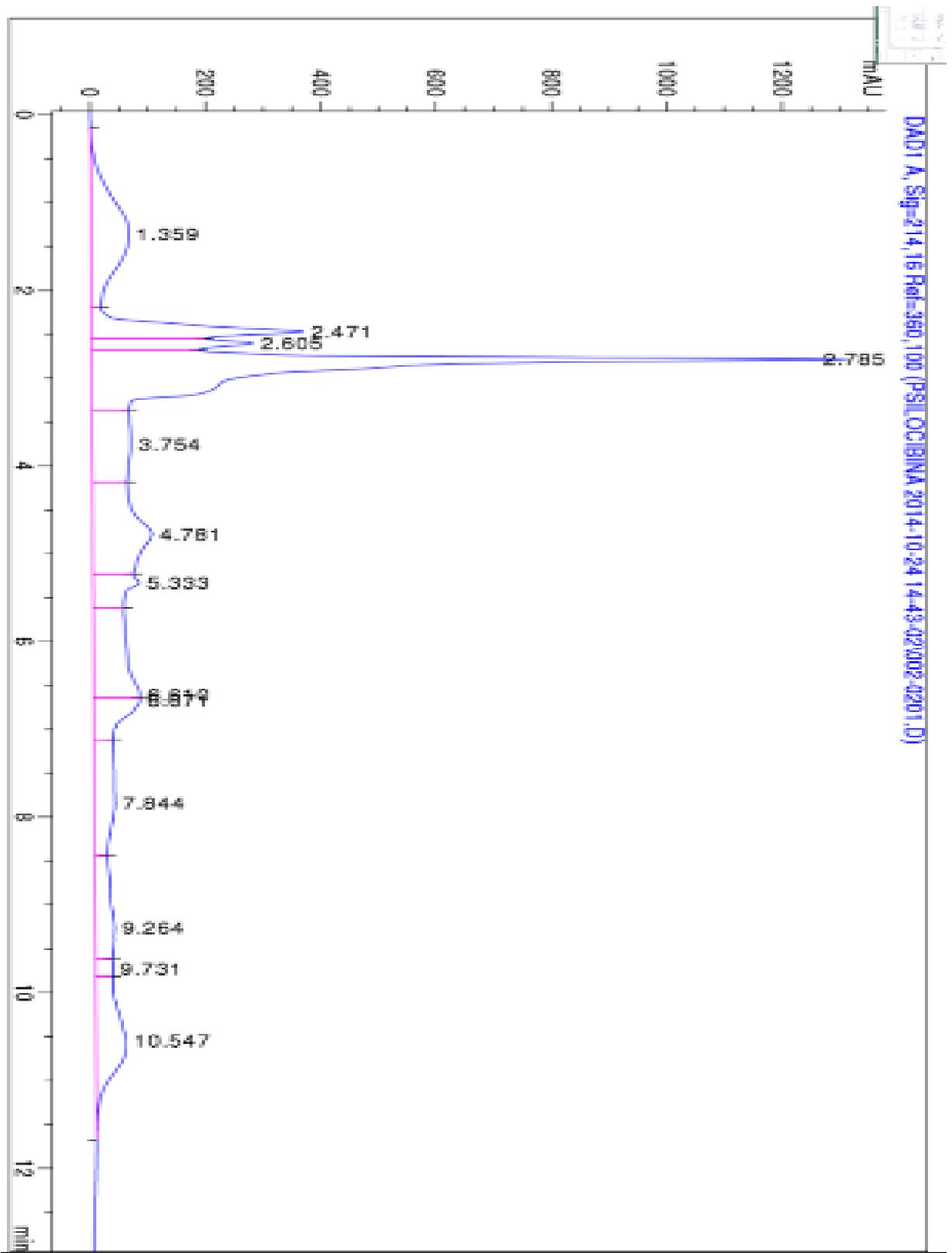


Imagen 18: M1Bt9

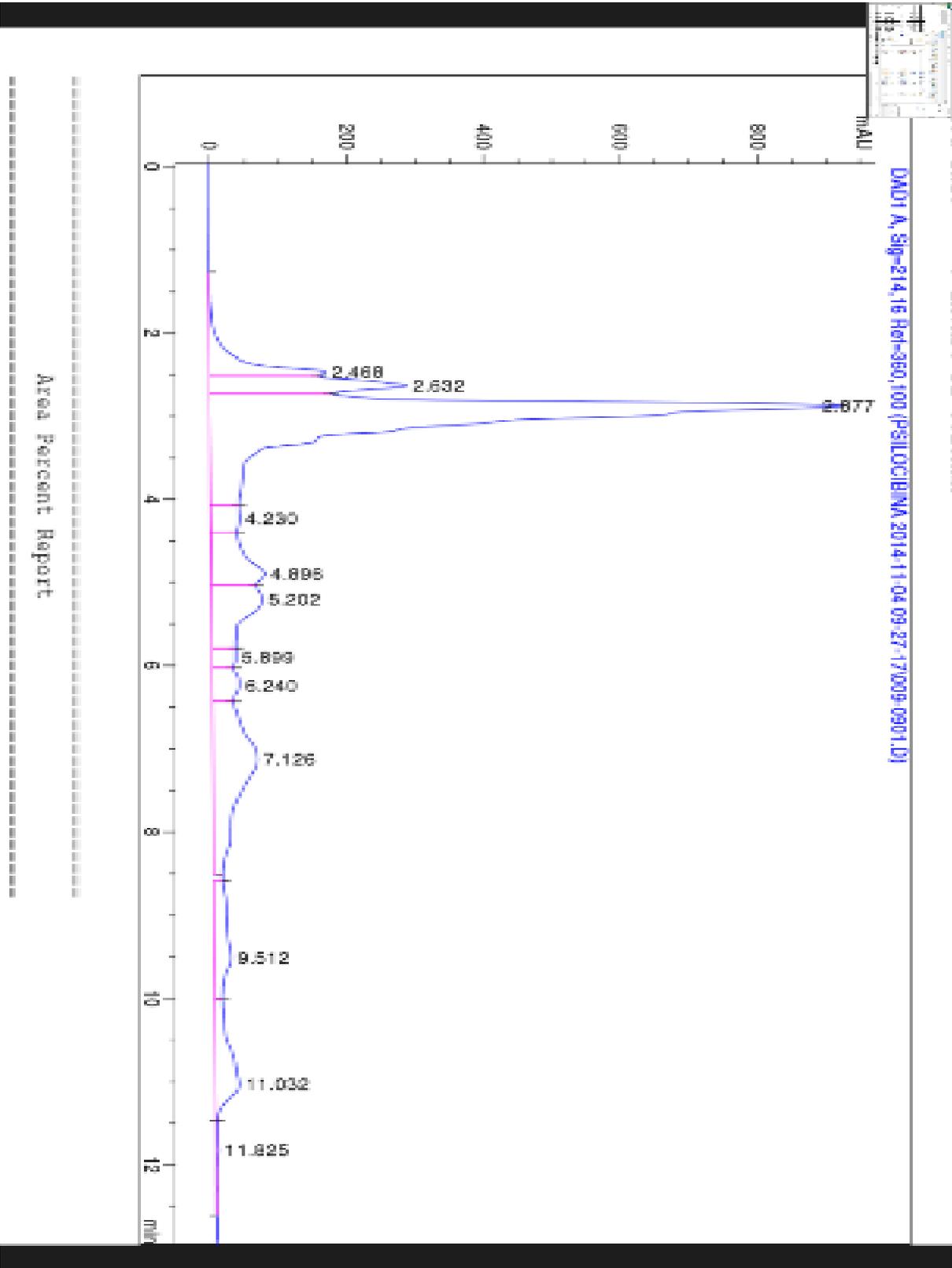


Imagen 19: M2At9

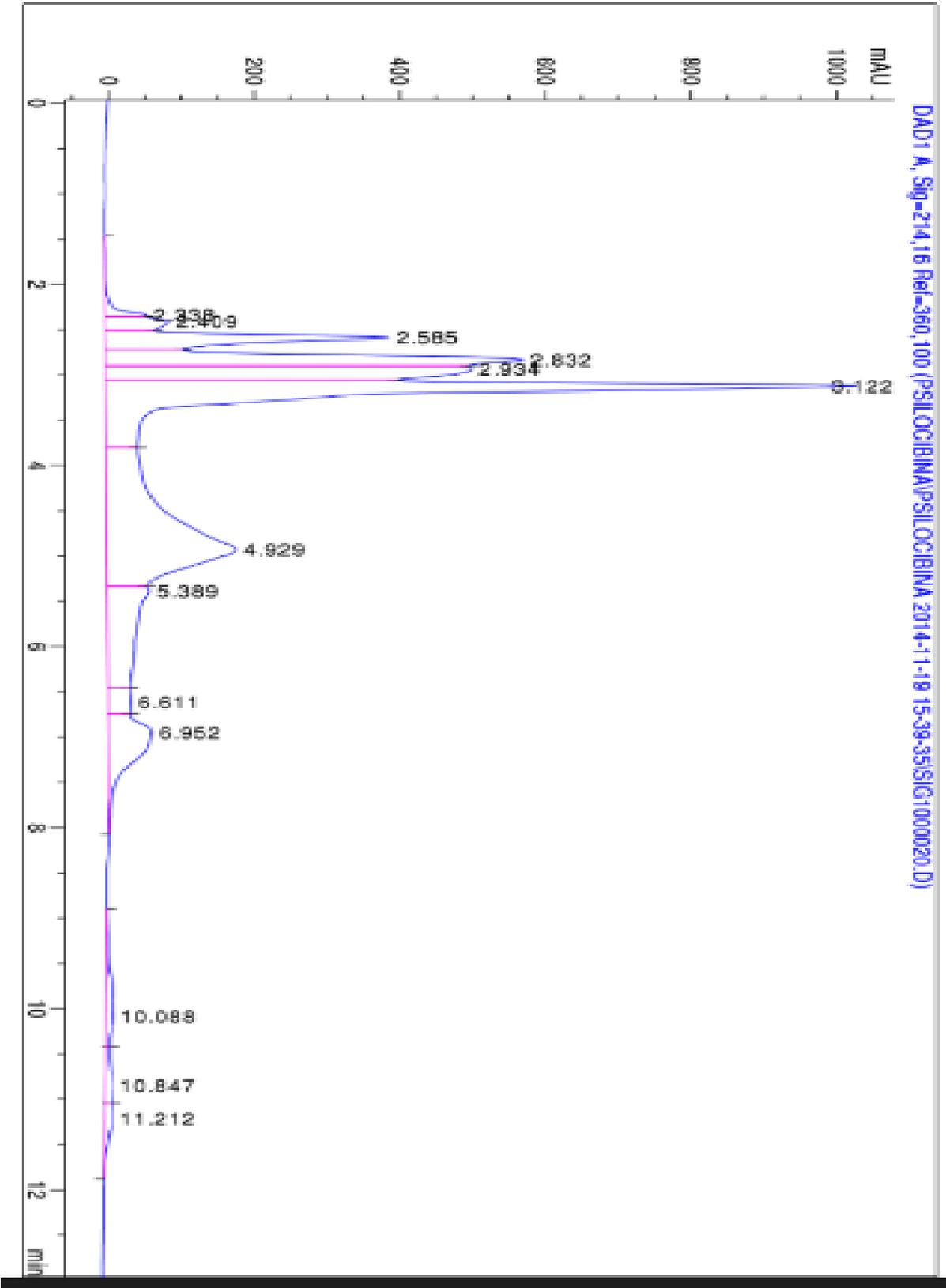


Imagen 20: M4At9

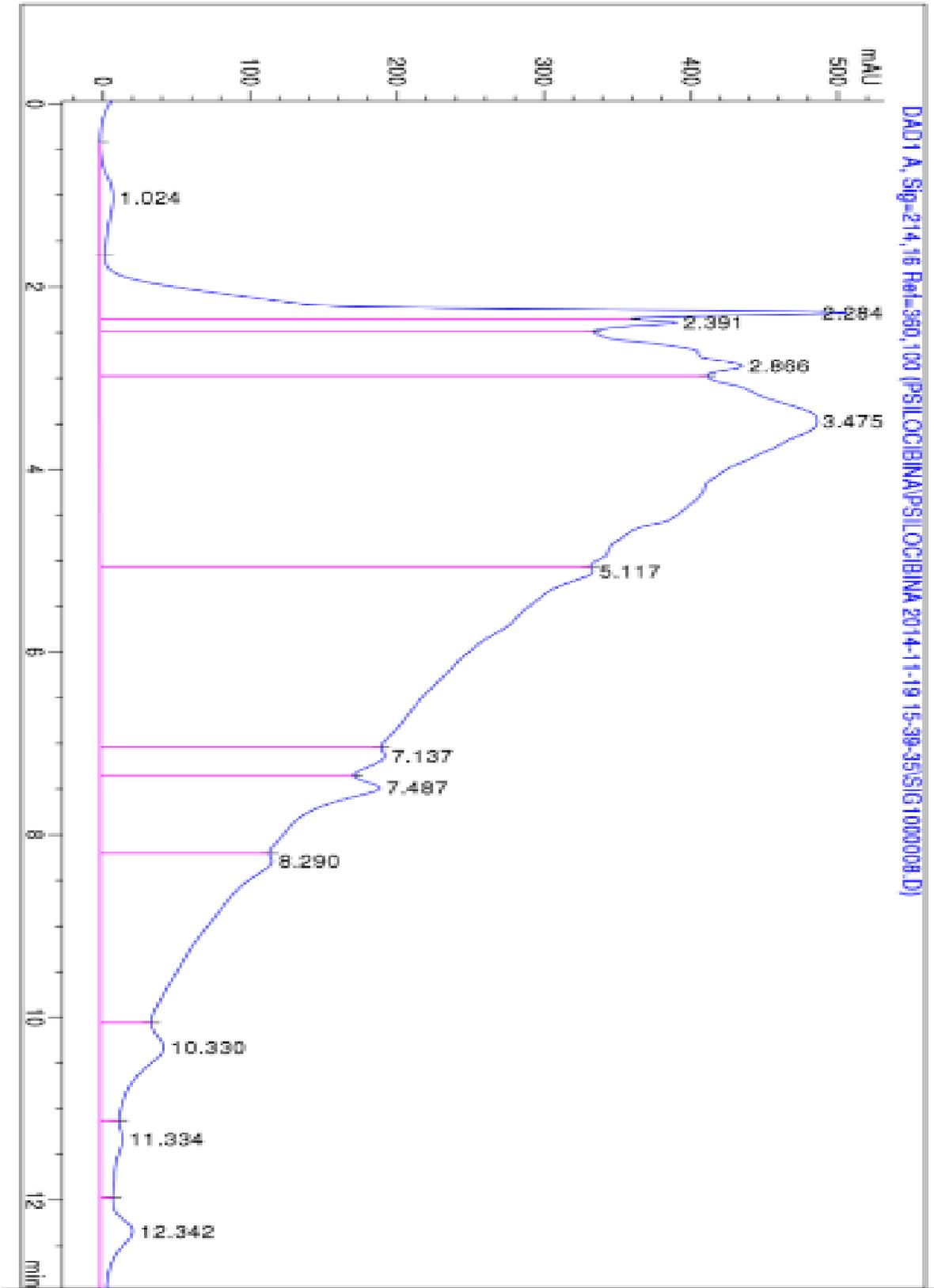


Imagen 21: M4At9s

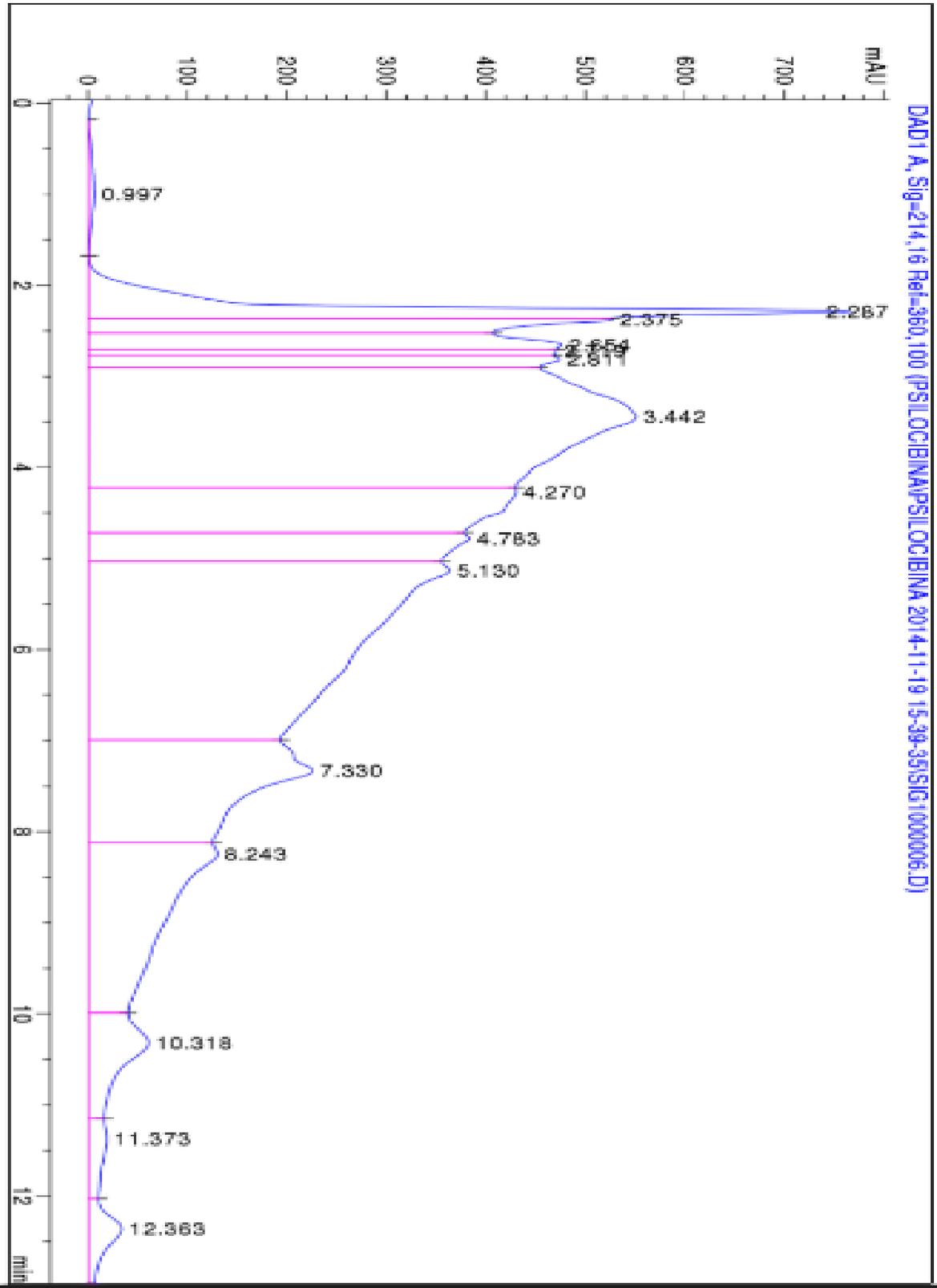


Imagen 22: M4Ct9s

9.6 ANEXO 6. Cromatogramas (HPLC) del día 10 de fermentación

Biomasa				
t	M1	M2	M3	M4
Días	Área (mAU*s)	Área (mAU*s)	Área (mAU*s)	Área (mAU*s)
10	2295.67	2217.28	13173.55	7275.53
Sobrenadante				
t	M1	M2	M3	M4
Días	Área (mAU*s)	Área (mAU*s)	Área (mAU*s)	Área (mAU*s)
10	4245.95	627.11	248.90	5249.30

Tabla 18: Áreas obtenidas de los cromatogramas para el *Psilocibe sp* en los medios base y modificados en el día 10 de las fermentaciones

A continuación se presentan los cromatogramas obtenidos para el *P. cubensis* en los medios Fang y Zhong y modificados en el día 9 de las fermentaciones, donde la nomenclatura es así:

M#: Medio en el cual fue cultivado

Letra (A,B,C): Muestra (fueron 3 muestras por día)

t#: día de la fermentación

s: sólo está presente cuando es un sobrenadante, de lo contrario se entiende que es biomasa.

Ej: M2At8s

La muestra fue cultivada en el medio M2, es la muestra A, en el día 8 de la fermentación, y es el sobrenadante.

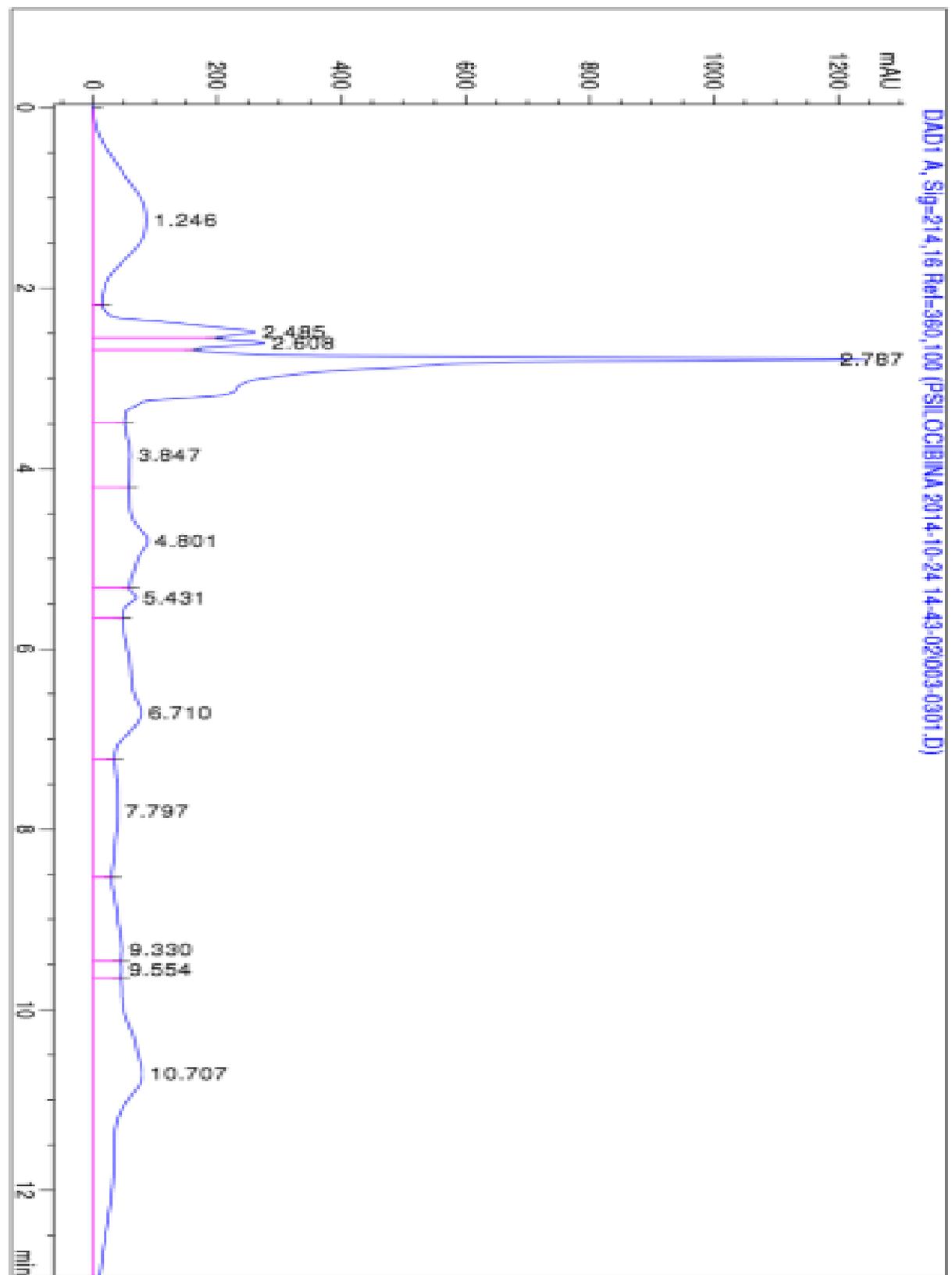


Imagen 23: M1Bt10

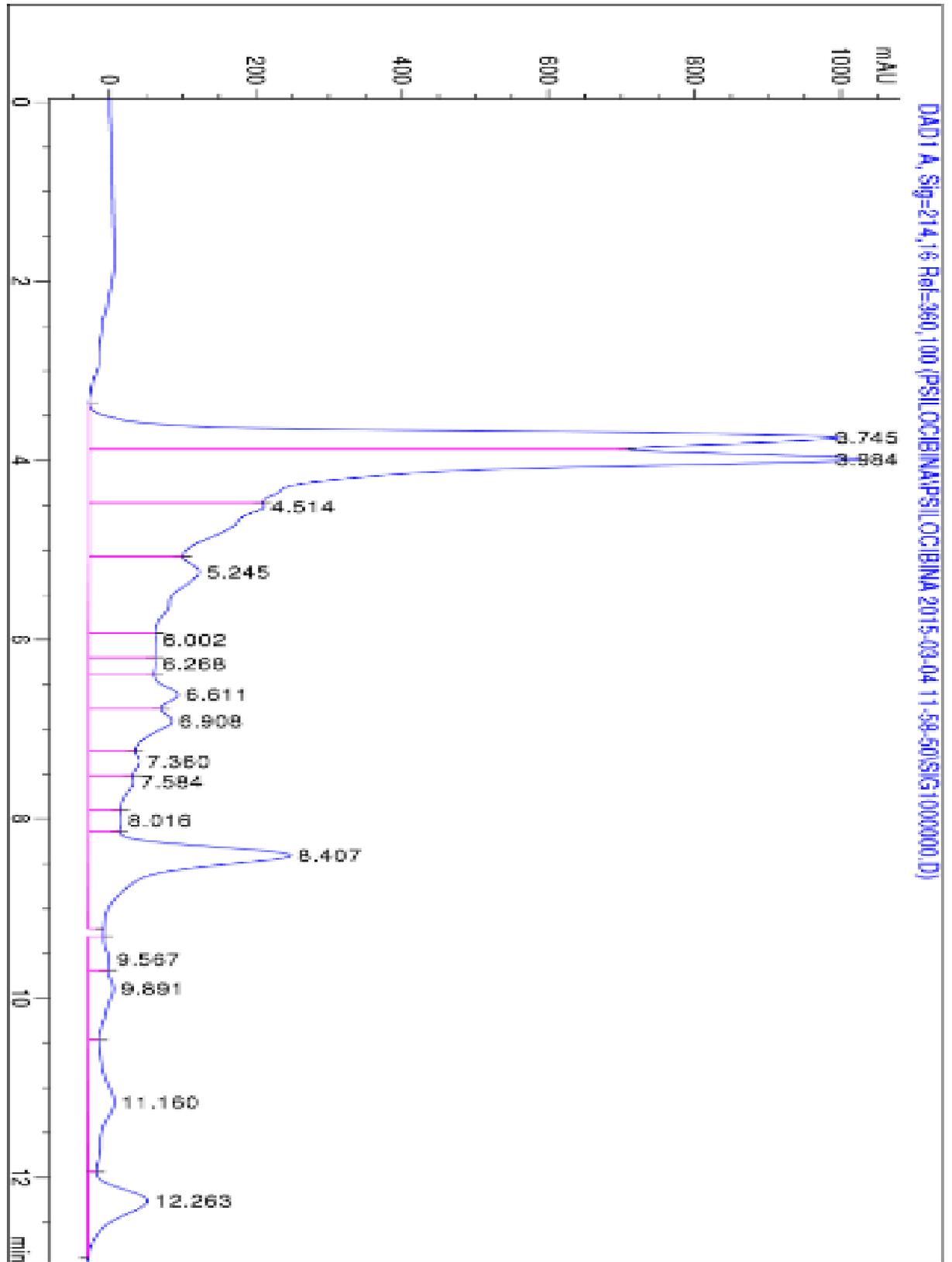


Imagen 24: M1At10s

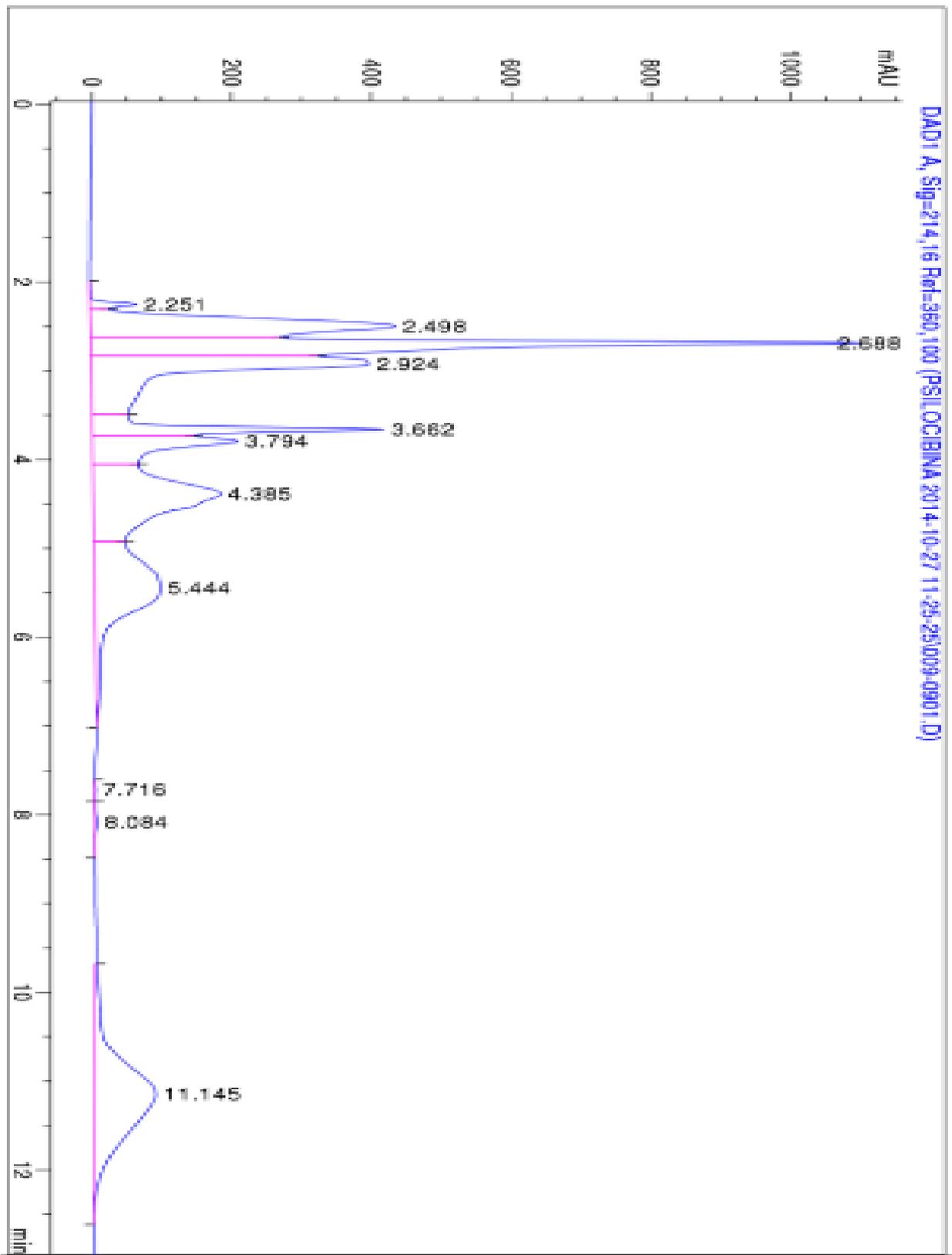


Imagen 25: M2Ct10

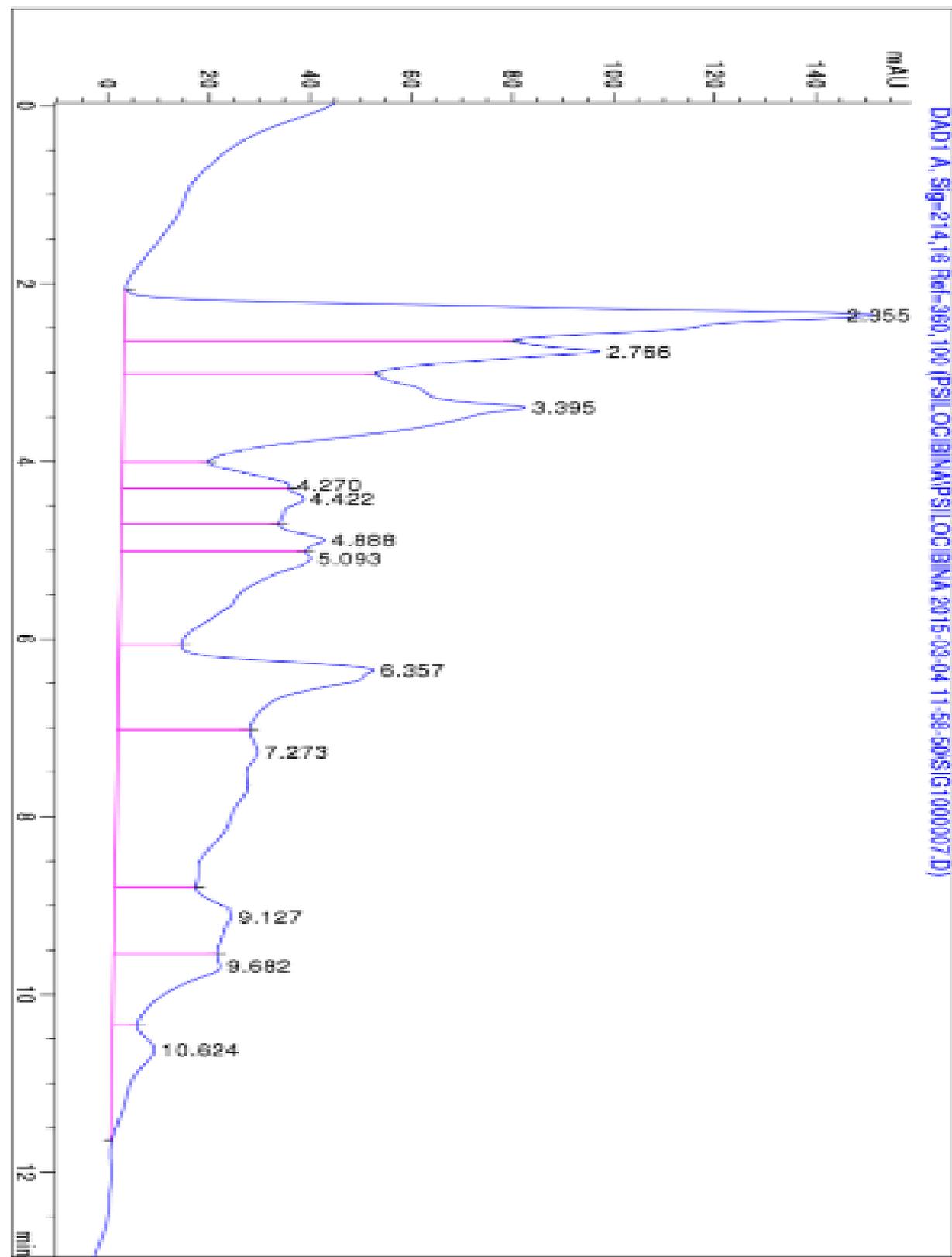


Imagen 26: M2Bt10s

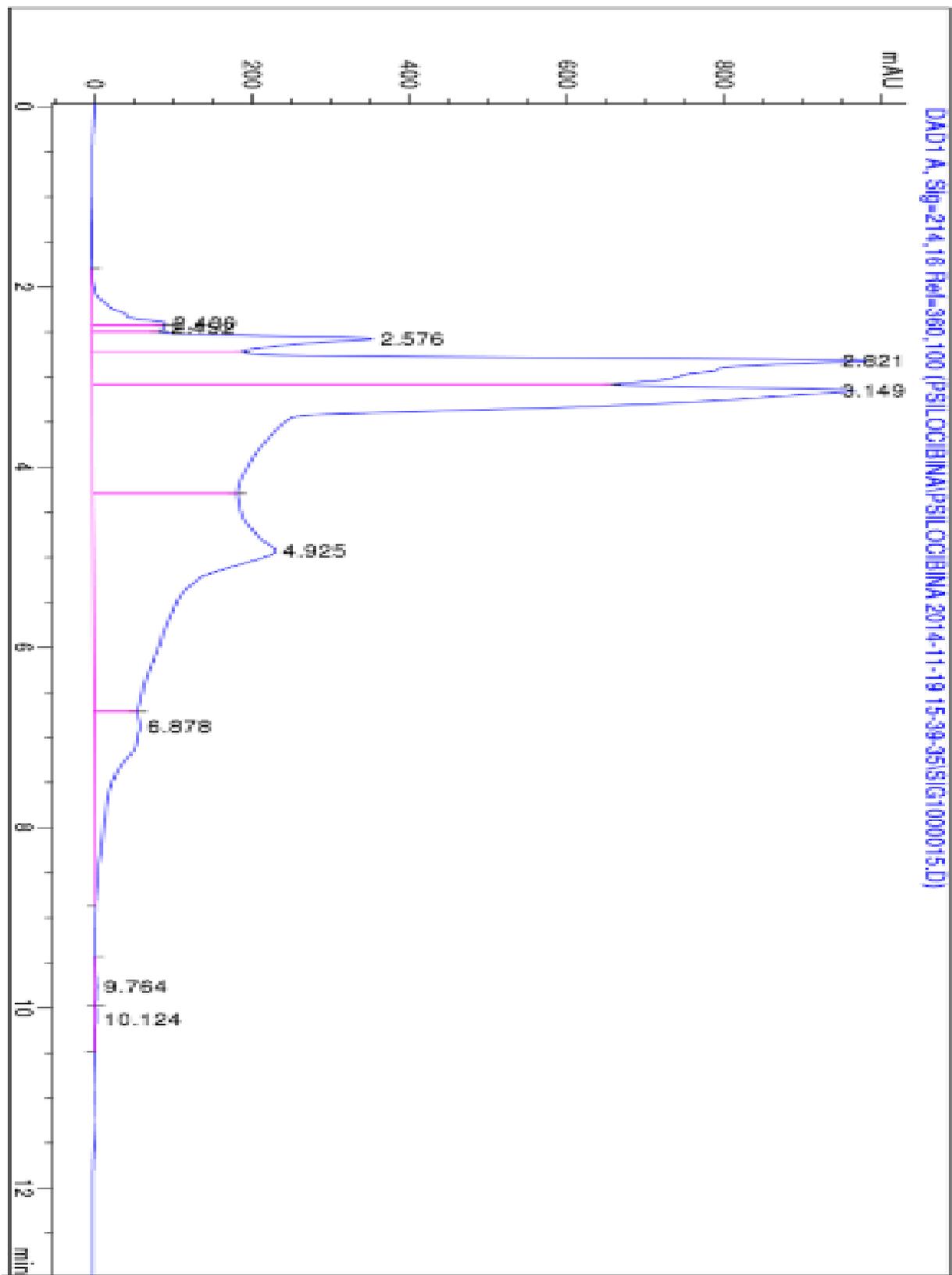


Imagen 27: M3At10

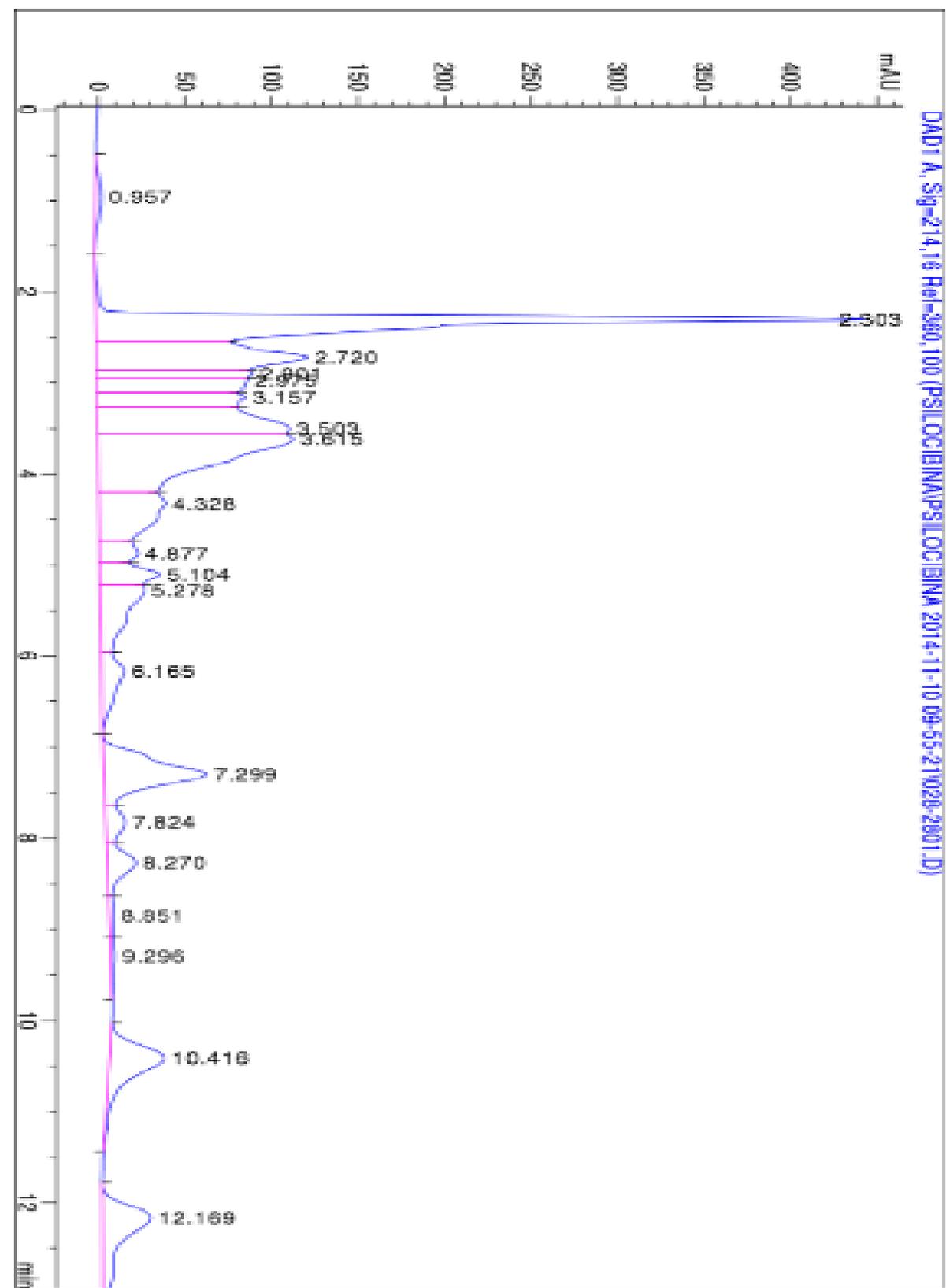


Imagen 28: M3At10s

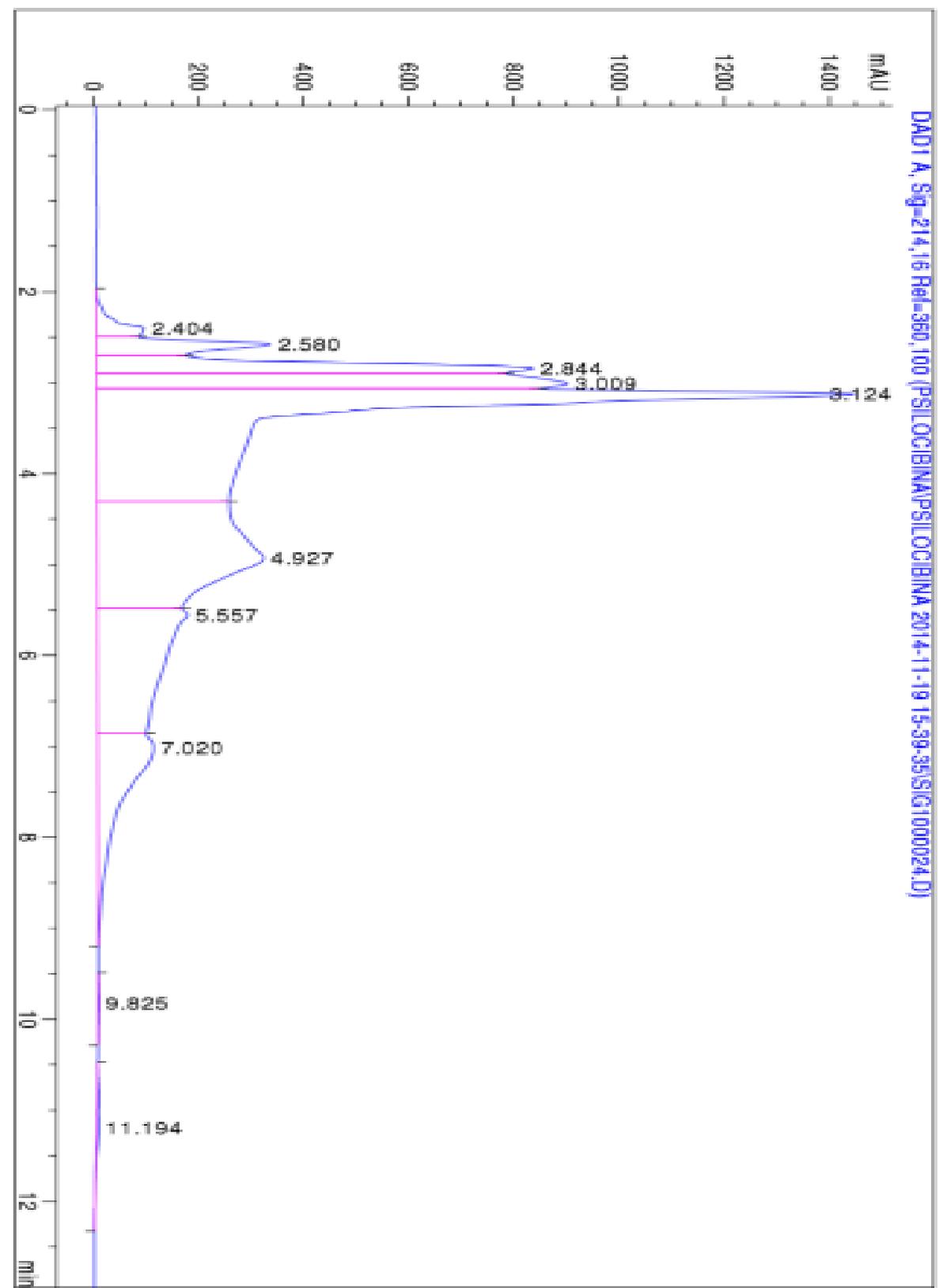


Imagen 29: M4Bt10

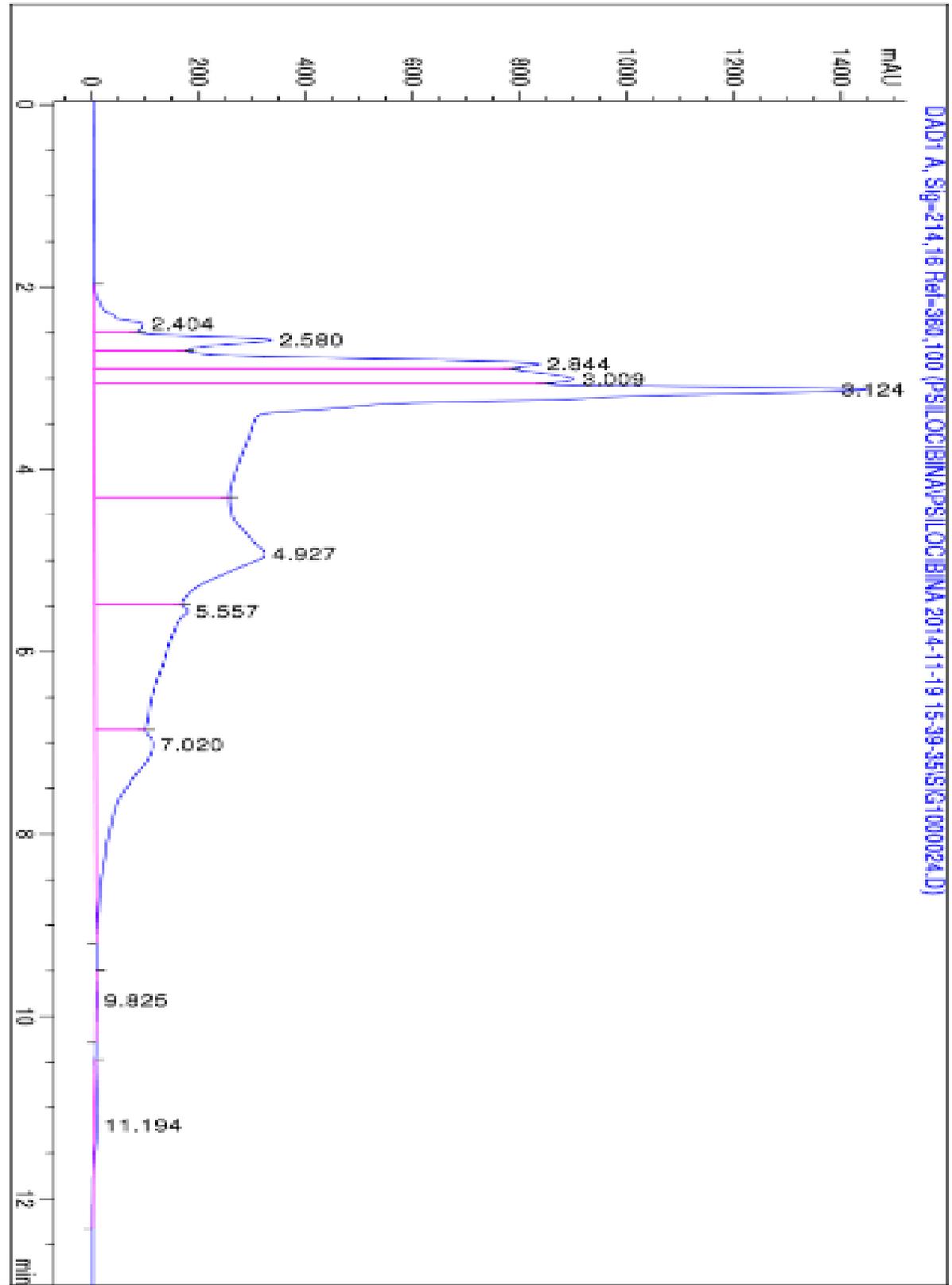


Imagen 30: M4Bt10s

10 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arora, D. (1986). *Mushroom Demystified*. Secaucus, NJ, U.S.A.: Ten Speed Press.
- Bailey JE, D. S. (1986). Studies of host-plasmid interactions in recombinant microorganisms. *Ann N Y Acad Sci*, 469:194-211.
- Bas, C. (1998). Orders and families in agarics and boleti. *Flora agaricina neerlandica*, 1: 40–49.
- Bigwood, J. M., & Beug, W. (1982). *Ethnopharmacol.* 5: 287– 291.
- Brailowsky, S. (2013). *Las Sustancias De Los Sueños: Neuropsicofarmacología*. México: Darkest Marck.
- Christiansen, K., Rasmussen, E., & Tonnesen, F. (. (1981). Determination of psilocybin in *Psilocybe semilanceata* using high performance liquid chromatography on a silica column. *Journal of chromatography*, 210: 13-167.
- Domínguez, R. y. (2003). Submerged fermentation in wheat substrates for production of *Monascus* pigments. *World Journal of microbiology and biotechnology*, 19(3): 329-336.
- Fang, Q. Z. (2002). Submerged fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum* for production of valuable bioactive metabolites-ganoderic acid and polysaccharide. *Biochem Eng J*, 10:61–65.
- Furst, P. (1994). Alucinógenos y Cultura. *Fondo de Cultura Económica*, 8: 30-35.
- García, V. (1995). Introducción a la microbiología.
- García, V. (2004). *Introducción a la microbiología*. Costa Rica: EUNED Universidad Estatal a Distancia.
- Gottlieb, A. (1997). *Psilocybin Producers Guide*. Berkeley, California: Ronin Publishing.
- Griffiths, R., Richards, W., Johnson, M., McCann, U., & Jesse, R. (2008). Mystical-type experiences occasioned by psilocybin mediate the attribution of personal meaning and spiritual significance 14 months later. *Psychopharmacol*, 22(6): 621–632.
- Hanes, K. R. (1996). Serotonin, psilocybin and body dysmorphic disorder: A case report. *Clinical Psychopharmacology*, 16(2):188-189.

- Hibbett, D.S. y Thorn, R.G. (2001). The Mycota. Systematics and Evolution. En *Basidiomycota: Homobasidiomycetes*. (págs. 2: 121–168). Berlin: Springer-Verlag: McLaughling/Lemke.
- Hwang, H., Kim, S., & Choi, J. (2004). Morphological and rheological properties of the three different species of basidiomycetes *Phellinus* in submerged cultures. *Journal of applied microbiology*, 20: 1296-1305.
- Instituto Nacional de Biodiversidad. (s.f.). *HONGOS de Costa Rica*. Obtenido de HONGOS de Costa Rica: <http://www.inbio.ac.cr/papers/hongos/intro.htm>
- Kimie, S., Toshimasa, T., Masaru, K., Takeshi, F., Osamu, S., & Yukihiro, G. (2005). Determination of psilocybin in hallucinogenic mushrooms by reversed-phase liquid chromatography with fluorescence detection. *School of Pharmaceutical Sciences*, 66: 562-568.
- Kirk, P., Cannon, P., & David, J. (2001). Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi. *CAB International*, 9: 20-23.
- Kuo, M. (Enero de 2007). *Key to major groups of mushrooms*. Obtenido de theMushroomExpert.Com: http://www.mushroomexpert.com/major_groups.html.
- Lee, B., Bae, J., Pyo, H., Choe, T., Kim, S., Hwang, H., & Yun, J. (2004). Submerged cultural conditions for the production of micelial biomass and exopolysaccharides. The edible Basidiomycete *Grifola frondosa* Enzyme and Microbial Technology. *Enzyme and Microbial Technology*, 35(5):369-376.
- Lindequist, U., & Niedermeyer, J. (2005). The pharmacological potential of mushrooms. *Oxford journal*, 2(3): 285-299.
- Mandrile, E.; Bongiorno, G.; Nájera, M. (1983). Principios activos naturales con acción alucinógena: Psilocina y Psilocibina. Su presencia en ciertos géneros de Basidiomicete. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 2(2): 105-117.
- María P, C., & Marisol, V. (2010). Evaluación del crecimiento del hongo *Psilocybe cubensis* en medios de cultivo sólidos. 56. Medellín.
- Mercano, D., & Hasegawa, M. (1991). Fitoquímica Orgánica. En D. Mercano, & M. Hasegawa, *Fitoquímica Orgánica* (págs. 2: 67-72). Caracas, Venezuela: Universidad Central de Venezuela.
- Miles, P. y. (1999). Biología de las setas. Fundamentos básicos y acontecimientos actuales. Bogotá: Bogotá, World Cientific.
- Miller, G. L. (March de 1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent. *ANALYTICAL CHEMISTRY*, Vol 31. No 3.

- Musshoff, F., Madea, B., & Beike, J. (Septiembre 11, 2000). Hallucinogenic mushrooms on the German market; simple instructions for examination and identification. *Forensic Science International*, 389 - 395.
- Navarro, G., Márquez, G., Rocha, F., & Sánchez, J. (1998). Producción de biomasa y enzimas ligninolíticas por *Pleurotus ostreatus* en cultivo sumergido. *Revista iberoamericana de micología*, 15: 302-306.
- Paris, M. y Hurabielle, M. (1981). Pharmacognosie. En R.-R. Paris, *Abrégé de matière médicale: pharmacognosis* (págs. 2: 128-154). Paris: Masson.
- Perrine, D. (1999). Hallucinogens and Obsessive-Compulsive Disorder. *Psychiatry*, 156:1123.
- Seigler, D. (1981). Recent development in the chemistry and biology of cyanogenic glycosides and lipids. *Revista latinoamericana de química*, 12: 36-48.
- Stamets, P. (1996). Psilocybin Mushrooms of the World. En P. Stamets, *Psilocybin Mushrooms of the World: An Identification Guide*. Washington: Ten speed press.
- Stamets, P. (1996). Psilocybin Mushrooms of the World. Washington: Ten speed press.
- Téllez Mosquera, J. (2014). Yajé y Hongos Alucinógenos. *Avances en Enfermería*, 92-102.
- Téllez, J. (2005). Yajé y Hongos Alucinógenos. *Enfermería, Aspectos Relacionados con su Toxicidad*, 92-102.
- Tsujikawa, K., Kanamori, T., Iwata, Y., Ohmae, Y., Sugita, K., Inove, H., & Kishi, T. (2003). Morphological and chemical analysis of magic mushrooms in Japan. *Forensic Science International*, 138(1-3): 85-90.
- Wurst, M., Semerdzieva, M., & Vokoun, J. (1984). Analysis of psychotropic compounds in fungi of the genus *Psilocybe* by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Journal of chromatography*, 286: 229-235.