



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE
INSTITUTO DE POSTGRADO
MAESTRÍA EN GESTIÓN SUSTENTABLE DE
RECURSOS NATURALES



TEMA:

“DESARROLLO DE UN PROCESO PARA EL AISLAMIENTO, CONSERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE HONGOS ALUCINÓGENOS (*Psilocybe spp.*) A PARTIR DE LA BIODIVERSIDAD ECUATORIANA”

Trabajo de Investigación previo a la obtención del Título de Magíster en
Gestión Sustentable de Recursos Naturales

AUTORA: Rosero Yépez Patricia Isabel

DIRECTOR: Pineda Insuasti Julio Amilcar, PhD

IBARRA - ECUADOR

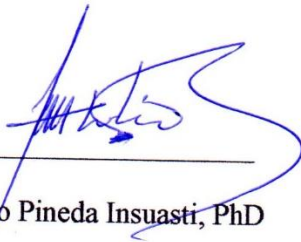
2018

APROBACIÓN DEL TUTOR

En calidad de tutor del Trabajo de Grado, presentado por la Ingeniera Patricia Isabel Rosero Yépez, para optar por el grado de Magíster en Gestión Sustentable de Recursos Naturales, doy fe de que dicho trabajo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a presentación (pública o privada) y evaluación por parte del jurado examinador que se designe.

En la ciudad de Ibarra, a 27 días del mes de octubre de 2018

Lo certifico



Ing. Julio Pineda Insuasti, PhD

C. I.: 1001914470

DIRECTOR



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE
BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN A FAVOR DE LA
UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE



1. IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA

En cumplimiento del Art. 144 de la Ley de Educación Superior, hago la entrega del presente trabajo a la Universidad Técnica del Norte para que sea publicado en el Repositorio Digital Institucional, para lo cual pongo a disposición la siguiente información:

DATOS DE CONTACTO			
CÉDULA DE IDENTIDAD:	1713958120		
APELLIDOS Y NOMBRES:	Rosero Yépez Patricia Isabel		
DIRECCIÓN:	Venustiano Carranza 122 y Pablo Neruda, Santo Domingo-Santo Domingo de los Tsáchilas		
EMAIL:	patricia-rosero@hotmail.com		
TELÉFONO FIJO:	022756016	TELÉFONO MÓVIL:	0986499909
DATOS DE LA OBRA			
TÍTULO:	“DESARROLLO DE UN PROCESO PARA EL AISLAMIENTO, CONSERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE HONGOS ALUCINÓGENOS (<i>Psilocybe spp.</i>) A PARTIR DE LA BIODIVERSIDAD ECUATORIANA”		
AUTOR (ES):	Rosero Yépez Patricia Isabel		
FECHA:	2018/10/27		
SOLO PARA TRABAJOS DE GRADO			
PROGRAMA:	<input type="checkbox"/> PREGRADO <input checked="" type="checkbox"/> POSGRADO		
TÍTULO POR EL QUE OPTA:	Magíster en Gestión Sustentable de Recursos Naturales		
ASESOR /DIRECTOR:	Ing. Julio Amílcar Pineda Insuasti, (PhD)		

2. CONSTANCIAS

La autora manifiesta que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrolló, sin violar derechos de autor de terceros, por lo tanto, la obra es original y que es el titular de los derechos patrimoniales, por lo que asume la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldrá en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

En la ciudad de Ibarra, al 27 de octubre de 2018

LA AUTORA



Patricia Isabel Rosero Yépez

C.C.: 1713958120

REGISTRO BIBLIOGRÁFICO

Guía: POSTGRADO - UTN

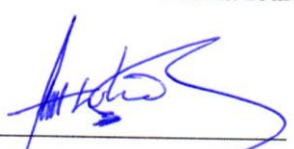
Fecha: Ibarra, 27 de octubre de 2018

PATRICIA ISABEL ROSERO Desarrollo de un proceso para el aislamiento, conservación y almacenamiento de hongos alucinógenos (*Psilocybe spp.*) a partir de la biodiversidad ecuatoriana/TRABAJO DE GRADO DE. Magíster en Gestión Sustentable de Recursos Naturales. UTN. Universidad Técnica del Norte, Ibarra.

DIRECTOR DE TESIS: Ing. Julio Amilcar Pineda Insuasti, (PhD)

El principal objetivo de la presente investigación fue, desarrollar un proceso a escala de laboratorio para la conservación de cepas de hongos alucinógenos (*Psilocybe spp.*), mediante bioprocesos que permitan el aprovechamiento sustentable de los recursos genéticos microbianos del país; entre los objetivos específicos se encuentran: aislar, identificar y caracterizar la especie de *Psilocybe spp.* a partir de la biodiversidad fúngica ecuatoriana, establecer el protocolo para la conservación de la cepa pura de *Psilocybe spp.* por liofilización, determinar el mejor medio de cultivo para la cepa nativa de *Psilocybe spp.* a partir de su velocidad de crecimiento y proponer un catálogo de cepas puras de *Psilocybe spp.*

Fecha: Ibarra 27 de octubre de 2018



Ing. Julio Amilcar Pineda Insuasti, (PhD)

Director



Patricia Isabel Rosero Yépez

Autora

TABLA DE CONTENIDO

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	¡Error! Marcador no definido.
BIBLIOTECA UNIVERSITARIA	iii
AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE	iii
SOLO PARA TRABAJOS DE GRADO.....	iii
REGISTRO BIBLIOGRÁFICO	¡Error! Marcador no definido.
TABLA DE CONTENIDO.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
RESUMEN.....	xii
SUMARY	xiv
CAPÍTULO I.....	1
1. Introducción	1
1.1. Situación problemática.....	2
1.2. Problema científico	3
1.3. Objeto.....	3
1.4. Objetivos	4
1.4.1. Objetivo general	4
1.4.2. Objetivos específicos	4
CAPÍTULO II	5
ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO.....	5
2.1. Revisión bibliográfica del estado del arte sobre <i>Psilocybe spp.</i>	5
2.1.1. La salud mental: un desafío mundial	5
2.2. Situación actual	6
2.3. Situación futura	9
2.4. La salud mental: un desafío local.....	9
2.4.1. Latinoamérica y el Caribe	9

2.4.2. Ecuador	11
2.5. Una propuesta al desafío	12
2.5.1. Los hongos alucinógenos	14
2.5.2. <i>Psilocybe spp.</i>	14
2.5.3. La psilocibina	16
2.6. Recolección	17
2.7. Aislamiento	22
2.8. Identificación.....	23
2.9. Caracterización.....	25
2.10. Conservación.....	26
2.11. Proceso de producción de <i>Psilocybe spp.</i>	26
2.12. Factores que afectan la producción de <i>Psilocybe spp.</i>	29
2.13. Escalado	31
2.14. Extracción triptaminas	31
CAPÍTULO III.....	35
DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	35
3. Desarrollo experimental.....	35
3.1. Aislamiento, identificación y caracterización de la cepa nativa de <i>Psilocybe spp.</i> ..	35
3.1.1. Materiales y métodos	35
3.1.2. Resultados	40
3.1.3. Discusión.....	46
3.2. Protocolo de conservación para la especie <i>Psilocybe cubensis</i> por liofilización.....	47
3.2.1. Materiales y métodos	47
3.3. Resultados	51
3.3.1. Discusión.....	52
3.4. Determinación de la velocidad de crecimiento de la cepa de <i>Psilocybe cubensis.</i> ..	52
3.4.2. Resultados	53
3.4.3. Discusión.....	59
3.5. Catálogo de cepas puras de <i>Psilocybe spp.</i>	60

3.5.1. Uso de catálogo	60
3.5.2. Medios de cultivos	60
3.5.3. Medios y condiciones de cultivo de <i>Psilocybe cubensis</i> CEBA-SPE-PC-20031761	
3.5.4. Fórmula medio de cultivo	61
3.5.5. Suministro de cultivos.....	62
3.5.6. Conservación de los cultivos.....	62
3.5.7. Identificación.....	62
3.5.8. Depósito de cultivos.....	62
3.5.9. Precios de cepas y otros servicios	63
3.5.10. Listado de <i>Psilocybe</i> disponibles	63
3.5.11. Descripción de las cepas	66
3.5.12. Recuperación de cultivos liofilizados	66
3.5.13. Ficha de depósito de la cepa.....	67
CAPITULO IV	69
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	69
4.1. Conclusiones	69
4.2. Recomendaciones.....	70
Referencias Bibliográficas	71
ANEXOS	83
Anexo 1. Informe N° A-018. Identificación de la muestra aislada.	83
Anexo 2. Protocolo para la secuenciación de ADN total genómico.	86
Anexo 3. Ensamblaje de la cadena de ADN de <i>Psilocybe</i>	89
Anexo 4. Análisis proximal y de minerales totales de la muestra de <i>Psilocybe cubensis</i> . Informe 18-002.....	90

ÍNDICE DE TABLAS

	PAG.
Tabla 1. Sustratos específicos para algunas especies de <i>Psilocybe spp.</i>	17
Tabla 2. Características macroscópicas de <i>Psilocybe spp.</i>	19
Tabla 3. Código de muestra de <i>Psilocybe spp.</i>	39
Tabla 4. Resultados de la identificación.....	45
Tabla 5. Tratamiento térmico.....	49
Tabla 6. Secado primario	49
Tabla 7. Datos de la velocidad de crecimiento en dos medios de cultivo.....	54
Tabla 8. Resumen Estadístico para Velocidad	55
Tabla 9. ANOVA para Velocidad por Medio	56
Tabla 10. Medias para Velocidad por Medio con intervalos de confianza del 95,0%....	56
Tabla 11. Pruebas de Múltiple Rangos para Velocidad por Medio, Método: 95,0 porcentajes LSD.....	58
Tabla 12. Listado de cepas de <i>Psilocybe</i>	64

ÍNDICE DE FIGURAS

	PAG.
<i>Figura 1. P. cubensis</i>	21
<i>Figura 2. P. pelliculosa</i>	21
<i>Figura 3. P. semilanceata</i>	21
<i>Figura 4. P. mexicana</i>	21
<i>Figura 5. a) Esporas y b) basidios de Psilocybe cubensis. (Hernández, 2007)</i>	24
<i>Figura 6. Kit de cultivo PF-Tek (Innervisions, s. f.)</i>	26
<i>Figura 7. Jeringa flameada (a) e inoculación de bioceldas (b) (Innervisions, s. f.)</i>	28
<i>Figura 8. Bioceldas en bolsas con aireación.</i>	29
<i>Figura 9. (a) Biocelda empleada en el método PF-Tek y (b) su tapa perforada. (McPherson, 1991).</i>	31
<i>Figura 10. Estructura molecular de la psilocibina</i>	32
<i>Figura 11. Estructura molecular de psilocina.</i>	32
<i>Figura 12. Área de recolección de muestras de Psilocybe spp.</i>	36
<i>Figura 13. Psilocybe spp. recolectado en su medio natural.</i>	38
<i>Figura 14. Muestras de hongos recolectados.</i>	41
<i>Figura 15. Preparación de medios de cultivo PDA.</i>	41
<i>Figura 16. Esterilización de medios de cultivo</i>	42
<i>Figura 17. Preparación de muestras de hongo para inocular los medios de cultivo PDA y MEA (a, b).</i>	42
<i>Figura 18. Inoculación de medios de cultivo.</i>	43
<i>Figura 19. Cepas de Psilocybe spp. obtenidas en laboratorio.</i>	43
<i>Figura 20. Carpóforos de Psilocybe spp. en su medio natural</i>	44
<i>Figura 21. Vista microscópica de Psilocybe spp. en proceso de oxidación</i>	44
<i>Figura 22. Equipo liofilizador “VirTis wizard 2.0”</i>	51
<i>Figura 23. Se presenta los tubos con cultivo de Psilocybe cubensis para ser liofilizados.</i>	51
<i>Figura 24. Gráfico de medias para velocidad</i>	57

<i>Figura 25. Medición de la velocidad de crecimiento de Psilocybe cubensis. (a) En sustrato PDA y (b) en sustrato MEA.</i>	58
<i>Figura 26. Cultivo de Psilocybe cubensis en MEA y PDA.</i>	64
<i>Figura 27. Carpóforos de P. azurescens</i>	64
<i>Figura 28. Carpóforos de P. baeocystis</i>	64
<i>Figura 29. Carpóforos de P. cyanescens</i>	64
<i>Figura 30. Carpóforos de P. pelliculosa</i>	65
<i>Figura 31. Carpóforos de P. semilanceata</i>	65
<i>Figura 32. Carpóforos de P. sylvatica</i>	65
<i>Figura 33. Carpóforos de P. stuntzii</i>	65
<i>Figura 34. Carpóforos de P. weilii</i>	65
<i>Figura 35. Formato de ficha de ingreso del microorganismo al BRGM (propuesta).</i>	67

RESUMEN

Psilocybe spp. es un hongo alucinógeno empleado ancestralmente por sus propiedades neurotrópicas que le dan un carácter mágico-religioso; dichas propiedades son otorgadas por las triptaminas que poseen, como psilocibina, psilocina, baeocistina, ni-baeocistina, norbaeocistina, aeruginascina; las cuales han mostrado ser útiles en el tratamiento de trastornos psiquiátricos, siendo notable su potencial en la industria farmacéutica. No obstante, existe limitado conocimiento acerca del protocolo de purificación de cepas, lo que dificulta el éxito de la operación. Bajo este contexto, el objetivo de este trabajo fue describir el proceso de obtención de cepas puras de *Psilocybe spp.* con fines industriales, mediante una amplia revisión de la literatura, que promueva la valorización de la biodiversidad nativa del Ecuador. La purificación de cepas de *Psilocybe spp.* presenta varias fases: recolección, aislamiento, identificación, caracterización y conservación. Las fases más importantes son la identificación y la conservación; la primera porque de ella depende la adecuada asignación de propiedades y potencialidades a las especies, de modo que los resultados de su uso a nivel industrial sean los deseados; la segunda porque de ella depende la viabilidad y estabilidad genética de las cepas. Como consecuencia de ello, se obtuvo como resultado que la cepa aislada se identificó como *Psilocybe cubensis* con un 99% de identidad genética. En el presente trabajo se liofilizó la cepa de *Psilocybe cubensis* ya que es una manera de conservar la especie a largo plazo. Este protocolo consta de un proceso de sublimación con presión de 200 atm para el congelado y 300 atm para el secado, a una temperatura que varía entre -50 y 30 °C. El proceso de producción de *P. cubensis*. varía dependiendo del tipo de fermentación elegido, puede ser Fermentación en Estado Sólido (FES) o Fermentación en Estado Líquido (FEL), de las cuales la primera es la más empleada. Dentro de este proceso de escalado se emplean los medios de cultivos más eficientes para el crecimiento del micelio. Por ello, el objetivo de este experimento fue seleccionar el medio de cultivo que permita la mayor velocidad de activación de cepas liofilizadas de *Psilocybe cubensis*.

Como resultado, se activaron las cepas liofilizadas en dos medios de cultivo en estudio: PDA y MEA. Se encontró que el mejor medio de cultivo para activar cepas liofilizadas de *P. cubensis* es el Agar Extracto de Malta (MEA), con una velocidad de activación de 2.79 mm/día. Además, se afirmó con un nivel de confianza del 95%, que los efectos de cada medio de cultivo en la velocidad de activación de la cepa presentan diferencias estadísticamente significativas. La propuesta del catálogo de cepas se fundamentó en el Catálogo de Cepas Microbianas del Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar, ICIDCA y consta de: solicitud para el depósito de cepas y ficha de información de la cepa a depositar en el BRGM.

Palabras clave: *Psilocybe cubensis*, identificación, conservación, medio de cultivo, fermentación, cepas, velocidad de activación, viabilidad, potencial industrial, ICIDCA, BRGM.

SUMMARY

Psilocybe spp. is a hallucinogenic mushroom used ancestrally for its neurotropic properties that give it a magic-religious character; these properties are granted by the tryptamines they possess, such as psilocybin, psilocin, baeocystin, ni-baeocystin, norbaeocystin, aeruginascin; which have been shown to be useful in the treatment of psychiatric disorders and notable in the pharmaceutical industry. However, there is limited knowledge about the strains purification protocol, which hinders the success of the operation. In this context, the objective of this work was to describe the process of obtaining pure strains of *Psilocybe spp.* for industrial purposes, through an extensive review of the literature, which promotes the valuation of Ecuador's native biodiversity. The purification of *Psilocybe spp.* strains, presents several phases: collection, isolation, identification, characterization and conservation. The most important phases are identification and conservation; the first because it depends on the proper allocation of properties and potentialities to the species, so that the results of their use at an industrial level are the desired ones; the second because the viability and genetic stability of the strains depend on it. As a consequence, the result was that the isolated strain was identified as *Psilocybe cubensis* with 99% genetic identity. In this work, the strain of *P. cubensis* was lyophilized since it is a way to conserve the species in the long term. This protocol consists of a sublimation process at pressures of 200 atm for freezing and 300 atm for drying, and at a temperature that varies between -50 and 30 ° C. The *Psilocybe cubensis* production process varies depending on the type of fermentation chosen, it can be Fermentation in Solid State (FES) or Fermentation in Liquid State (FEL), the first is the most used. The most efficient culture media for mycelial growth are used within this scaling process. Therefore, the objective of this experiment is to select the culture medium that allows the highest activation speed of lyophilized strains of *Psilocybe cubensis*. As a result, lyophilized strains were activated in two culture media under study: PDA and MEA. It was found that the best culture medium to activate lyophilized strains of *P. cubensis* is the Malt Extract Agar (MEA), with an activation speed of 2.79 mm / day. In addition, it was

stated with a confidence level of 95%, that the effects of each culture medium on the strain activation speed shows statistically significant differences. The strains catalog proposal was based on the Microbial Strains Catalog of the Cuban Sugar Cane Research Institute, ICIDCA, and consists of: application for the deposit of strains and information sheet of the strain to be deposited in the BRGM. Key words: *Psilocybe cubensis*, identification, conservation, culture medium, fermentation, strains, activation rate, viability, industrial potential, ICIDCA, BRGM.

CAPÍTULO I

1. Introducción

En el Ecuador el manejo racional de la biodiversidad resulta indispensable para su desarrollo, si consideramos que este es un país megadiverso, que ofrece un potencial enorme y que no ha sido todavía adecuadamente valorado. En ese sentido se han dado algunos pasos que buscan la definición de un marco jurídico que regule el manejo de este recurso.

A partir de los recursos genéticos, la biotecnología puede dar respuesta a enfermedades incurables; puede incrementar las ganancias de las industrias alimenticia y farmacéutica, pero también puede servir para el desarrollo de armas biológicas. Se calculaba que el valor de los recursos genéticos del Sur para la industria farmacéutica alcanzará 47 mil millones de dólares en el año 2000.

Psilocybe spp. es un hongo alucinógeno empleado ancestralmente por sus propiedades neurotrópicas que le dan un carácter mágico-religioso; dichas propiedades son otorgadas por las triptaminas que poseen, como psilocibina, psilocina, baeocistina, ni-baeocistina, norbaeocistina, aeruginascina; las cuales han mostrado ser útiles en el tratamiento de trastornos psiquiátricos, siendo notable su potencial en la industria farmacéutica. No obstante, existe limitado conocimiento acerca del protocolo de purificación de cepas, lo que dificulta el éxito de la operación. Bajo este contexto, el objetivo de este trabajo fue describir el proceso de obtención de cepas puras de *Psilocybe spp.* con fines industriales, mediante un amplia revisión de la literatura, que promueva la valorización de la biodiversidad nativa del Ecuador. La purificación de cepas de *Psilocybe spp.* presenta varias fases: recolección, aislamiento, identificación, caracterización y conservación.

Las fases más importantes son la identificación y la conservación; la primera porque de ella depende la adecuada asignación de propiedades y potencialidades a las especies, de modo que los resultados de su uso a nivel industrial sean los deseados; la segunda porque de ella depende la viabilidad y estabilidad genética de las cepas. La purificación de cepas puras de *Psilocybe spp.* ecuatoriano presenta beneficios potenciales para la bioindustria nacional, teniendo en cuenta su alta biodiversidad.

La presente investigación pretende aportar al sector de la salud, a través de la producción eficiente de *Psilocybe spp.*, una alternativa natural para el uso de psicofármacos capaces de tratar la depresión, el trastorno de estrés postraumático, la ansiedad e incluso la adicción. De acuerdo como lo plantea una de las estrategias del Plan Nacional del Buen Vivir enfatizando el bioconocimiento y su aplicación para la producción de nuevos bienes y servicios ecológicamente sustentables y la distribución de sus beneficios, alcanzando el desarrollo de la matriz productiva a mediano y largo plazo. En el mismo, señala que, en el plano de comercio internacional se deberá priorizar la exportación de bienes y servicios derivados del bioconocimiento (biofarmacéuticos) hacia aquellos países con déficit en estos productos.

1.1. Situación problemática

La drogodependencia es un fenómeno universal que afecta a casi todos los países, aunque sus características difieren en cada región. El abuso de drogas, aumenta globalmente afectando especialmente a los jóvenes siendo la droga más ampliamente consumida el cannabis. En tres cuartas partes de los países del mundo se describen casos de abuso de heroína y en dos terceras partes de abuso de cocaína. El consumo de estas sustancias se relaciona con el crimen, la violencia, la susceptibilidad a la infección por los virus de la hepatitis y VIH, así como con la demanda en las salas de urgencias de hospitales y alteraciones en el comportamiento social. A finales del siglo pasado el desarrollo de campos como la química y la farmacología han permitido la síntesis de sustancias cada

vez más fuertemente adictivas, como la cocaína y la heroína y las nuevas drogas de síntesis. (Gainza et al., 2003)

Desde finales de la década de 1950 hasta principios de 1970, la investigación llevó a cabo la exploración del uso de alucinógenos para tratar la ansiedad existencial, la desesperación y el aislamiento a menudo asociado con el cáncer en estado avanzado. Esos estudios describieron individuos críticamente enfermos en epifanías psicoespirituales, a menudo con una gran y mantenida mejoría en el estado de ánimo y ansiedad, así como una disminución de la necesidad por medicación narcótica para el dolor. (Grob et al., 2010)

1.2. Problema científico

En Ecuador, se evidencia un limitado conocimiento sobre el manejo sustentable de la especie nativa *Psilocybe spp.* tanto en sus procesos de: ciclo de vida natural, simbiosis con la naturaleza (estado en su medio natural), protocolo de aislamiento, protocolo de propagación o crecimiento celular (clon), protocolo de conservación, protocolo de reproducción hasta la obtención de cuerpos fructíferos, protocolo de almacenamiento y protocolo de repoblación.

1.3. Objeto

El proceso de aislamiento, conservación y almacenamiento de una cepa pura de hongos filamentosos.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Desarrollar un proceso a escala de laboratorio para la conservación de cepas de hongos alucinógenos (*Psilocybe spp.*), mediante bioprocesos que permitan el aprovechamiento sustentable de los recursos genéticos microbianos del país.

1.4.2. Objetivos específicos

- Aislar, identificar y caracterizar la especie de *Psilocybe spp.* a partir de la biodiversidad fúngica ecuatoriana.
- Establecer el protocolo para la conservación de la cepa pura de *Psilocybe spp.* por liofilización.
- Determinar el mejor medio de cultivo para la cepa nativa de *Psilocybe spp.* a partir de su velocidad de crecimiento.
- Proponer un catálogo de cepas puras de *Psilocybe spp.*

CAPÍTULO II

ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO

2.1. Revisión bibliográfica del estado del arte sobre *Psilocybe spp.*

2.1.1. La salud mental: un desafío mundial

En los últimos años, el tema de la salud mental ha tomado gran importancia como problema de salud pública, en el año 2010 el Centro de datos de investigación del Programa de Acción en Salud Mental (mhGAP) publicó la “Guía de intervención para los trastornos mentales, neurológicos y por uso de sustancias en el nivel de atención de la salud no especializada” (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2012). Posteriormente, en 2013 se adoptó el primer Plan de acción sobre salud mental 2013-2020 de la Organización Mundial de la Salud (World Health Organization [WHO], 2014b), el cual se fundamenta en “cuatro objetivos: reforzar un liderazgo y una gobernanza eficaces en el ámbito de la salud mental; proporcionar en el ámbito comunitario servicios de asistencia social y de salud mental completos, integrados y con capacidad de respuesta; poner en práctica estrategias de promoción y prevención en el campo de la salud mental; fortalecer los sistemas de información, los datos científicos y las investigaciones sobre la salud mental” (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2016f).

La salud mental tiene una importancia fundamental en lo relativo al bienestar personal, las relaciones familiares y el éxito en las contribuciones a la sociedad. Se relaciona con el desarrollo de las sociedades y los países (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2008). Los factores socio-culturales, políticos, económicos y ambientales son igual de concluyentes para la salud mental y de los trastornos mentales como las características individuales tales como la capacidad psico-afectiva, la herencia genética y la salud física. (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2016f).

La mala salud mental está directamente relacionada con la pobreza, provocando un ciclo negativo del desarrollo social: un problema de salud mental obstaculiza el aprendizaje y la productividad de los individuos para ocuparse de su economía, mientras la pobreza aumenta el riesgo de contraer trastornos mentales y reduce la capacidad de la gente de obtener acceso a los servicios de salud mental (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2008).

Los trastornos mentales son enfermedades caracterizadas “por una combinación de alteraciones del pensamiento, la percepción, las emociones, la conducta y las relaciones” interpersonales; sus manifestaciones varían dependiendo del caso. Entre los trastornos mentales más comunes se encuentran: “la depresión, el trastorno afectivo bipolar, la esquizofrenia y otras psicosis, la demencia, las discapacidades intelectuales y los trastornos del desarrollo, como el autismo” (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2016f). Es importante resaltar que la depresión asociada a enfermedades crónicas puede empeorar la salud de los pacientes (Moussavi et al., 2007).

La OMS hace referencia, en el marco de los derechos humanos y desarrollo socioeconómico a nivel mundial, a que la prevalencia de los trastornos mentales continúa en aumento, y a su vez causa efectos considerables en la salud de las personas (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2016a). Por tanto, las implicaciones de esta situación global en el ámbito local constituyen un vacío conceptual con urgencia de llenar.

2.2. Situación actual

Los trastornos mentales afectan a una de cada cuatro personas en algún momento de sus vidas, pero tan sólo un tercio de ellas buscan ayuda de un profesional de la salud mental, pese a que existen servicios disponibles; ello se debe a la estigmatización, la discriminación y el abandono (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2016d).

Según estadísticas, más de 350 millones de personas sufren depresión, 60 millones de personas en todo el mundo padecen de trastorno afectivo bipolar, alrededor de 21 millones de personas padecen de esquizofrenia, y unos 47,5 millones de personas padecen demencia. “Se calcula que aproximadamente el 20% de los niños y adolescentes del mundo tienen trastornos o problemas mentales; cerca de la mitad” de ellos tienen menos de 14 años y viven por lo general en países que disponen de pocos recursos para salud mental (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2016a). En el rango etario de la población mayor de 60 años, los trastornos neuropsiquiátricos representan el 6,6% de la discapacidad total. Se reporta que al menos el 15% de los adultos de 60 años o mayores sufren algún trastorno mental, lo cual es grave, teniendo en cuenta que la población mundial está envejeciendo rápidamente. Se prevé que la proporción de personas de este rango etario con respecto a la población mundial pasará del 12% al 22% de 2015 a 2050; en cifras, esto corresponde a un aumento de 900 millones a 2 000 millones (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2016c).

Una gama limitada de medicamentos es suficiente para tratar la mayoría de los trastornos mentales; sin embargo, alrededor del 25% de los países no cuenta con los tres medicamentos más comúnmente recetados en el tratamiento de la esquizofrenia, la depresión y la epilepsia a nivel de atención primaria de salud (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2016d). Además, según la OMS, los países en desarrollo cuentan con tan sólo el 17 % del mercado mundial de los medicamentos y alrededor de un tercio de dicha población no tiene acceso a medicamentos en una base regular debido principalmente a cuatro factores: La selección y uso racional de los medicamentos, la asequibilidad de los precios, la financiación sostenible, y la fiabilidad de los sistemas de salud y de suministro (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2016b, 2016e).

Los trastornos mentales y los trastornos ligados al consumo de sustancias son la principal causa de discapacidad a nivel mundial, corresponde al 32 %. Dichos trastornos desencadenan por lo general en el suicidio, que es la segunda causa de muerte en el rango

etario de los 15 a 29 años y ocurre en un 75 % en países de ingresos bajos y medios (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2016a). Muchos trastornos mentales tienen sus orígenes en la infancia-adolescencia y tienen efectos adversos significativos sobre posteriores etapas de la vida (Kessler et al., 2009). La tasa anual de suicidios es de aproximadamente 11 por cada 100 mil habitantes, de los cuales el 65 % corresponde a hombres y el restante a mujeres. No obstante la tasa varía dependiendo de los ingresos económicos; por ejemplo en países desarrollados, la cantidad de suicidios en hombres es tres veces mayor que en las mujeres, mientras que en países en desarrollo, es tan sólo 1,5 veces mayor. Pese a que estudios científicos indican que numerosos suicidios son evitables, este es un tema con escasa prioridad para los gobiernos y con alta estigmatización por parte de la sociedad, por lo cual las personas no solicitan ayuda (World Health Organization [WHO], 2014b).

Los sistemas de salud todavía no han dado una respuesta adecuada a la carga de trastornos mentales; por lo que la divergencia entre la demanda de tratamientos mentales y su prestación es grande en todo el mundo, esto se intensifica en los países de escasos recursos, donde el porcentaje de personas con trastornos mentales graves que no reciben tratamiento oscila entre el 76 % y el 85 % (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2016f). Además, alrededor del 40% de los países no tienen una política de salud mental, más del 30 % no tienen ningún programa de salud mental, aproximadamente el 25 % de los países no tienen legislación al respecto y más del 33% de los países asignan menos del 1 % de sus presupuestos totales de salud para la salud mental, mientras otro 33 % asigna sólo un 1 % (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2016d).

Frente a toda esta problemática, la Organización Mundial de la Salud, (OMS) lanzó en el año 2008 el Programa Global de Acción en Salud Mental, que tiene como meta disminuir la carga de los trastornos mentales y neurológicos, así como los relacionados con el consumo de sustancias, en todo el mundo; dirigiendo sus esfuerzos principalmente a los países con ingresos bajos y medios, con carga elevada (Organización Panamericana de

Salud [OPS], 2009). También existe el Plan de acción sobre salud mental 2013-2020, mencionado anteriormente; Por otro lado, existe un proyecto denominado “Atlas de salud mental”, el cual proporciona información actualizada sobre la disponibilidad de los servicios y recursos de salud mental en todo el mundo, incluidos las asignaciones de fondos, recursos humanos y centros especializados (World Health Organization [WHO], 2014a).

2.3. Situación futura

Para lograr un aumento en la disponibilidad de servicios de salud mental, hay que superar estos obstáculos fundamentales: la no inclusión de la atención de salud mental en los programas de salud pública y la falta de iniciativa en el terreno; la falta de integración de la salud mental en la atención primaria; la actual organización y escasez de recursos humanos de los servicios de salud mental (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2016a). Es de resaltar, que la expansión del tratamiento de los trastornos mentales podría ser rentable tanto desde el empleador y perspectivas de la sociedad (Kessler et al., 2009).

2.4. La salud mental: un desafío local

2.4.1. Latinoamérica y el Caribe

La creciente carga de trastornos mentales y neurológicos que afecta a las poblaciones de América Latina y el Caribe es demasiado grande para hacer caso omiso de ella (Kohn et al., 2005), pues representa el 22,2% de la carga total de enfermedad. Los trastornos neuropsiquiátricos predominantes son los trastornos depresivos unipolares (13,2%) y los producidos por el uso excesivo de alcohol (6,9%) (Organización Panamericana de Salud [OPS], 2009), los cuales constituyen un factor de riesgo que puede conllevar al suicidio. La tasa de suicidio promedio por cada 100 mil se encuentra cercana al 6,7 %; siendo Cuba,

Uruguay y Nicaragua, los países que presentaron mayores tasas, del 13 %, 13,6 % y 14,1 %, respectivamente (Organización Panamericana de Salud [OPS], 2013).

La actual brecha en el tratamiento de los trastornos mentales en Latinoamérica y el Caribe sigue siendo abrumadora, siendo del 37 al 71 % (Kohn et al., 2005; Organización Panamericana de Salud [OPS], 2013); esto puede deberse a la falta de políticas y planes de salud mental en un tercio de los países de la zona, y a que existen países que aún tienen un sistema altamente centralizado, donde la respuesta está concentrada en los hospitales psiquiátricos, con un desarrollo escaso o nulo de los servicios de atención a nivel primario o secundario. Por ello, la organización de los servicios de salud mental no es homogénea y la oferta de profesionales de la salud mental es dispar entre países (Organización Panamericana de Salud [OPS], 2013).

La escasez de profesionales competentes en atención de salud mental es uno de los principales obstáculos para el eficaz tratamiento de los pacientes en los países de ingresos bajos y medios. Los países de ingresos bajos cuentan con 0,05 psiquiatras y 0,42 enfermeras psiquiátricas por cada 100 mil habitantes, mientras que en los países de ingresos altos la tasa de profesionales por persona es 170 veces mayor y 70 veces mayor, respectivamente (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2016a).

Si bien se ha mencionado, muchas personas que padecen estos trastornos podrían llevar una vida normal siempre y cuando reciban tratamiento adecuado con fármacos psicotrópicos y psicoterapia; pero adicional a esto, la insuficiente oferta de profesionales especializados, la poca disponibilidad y asequibilidad de los medicamentos es un limitante del tratamiento eficaz de los trastornos mentales.

En América del sur, el promedio subregional para adquirir una dosis diaria de medicamentos antipsicóticos equivale al 8 % del salario mínimo, siendo Ecuador el país con el porcentaje más alto (20 %) y Perú con el más bajo (1 %). En América Central,

México y el Caribe latino, el porcentaje promedio del salario mínimo requerido para obtener estos medicamentos diariamente es del 11 %, siendo El Salvador (46 %), el país con el porcentaje más alto (Organización Panamericana de Salud [OPS], 2013).

2.4.2. Ecuador

Los servicios de salud mental han tenido un desarrollo significativo en los últimos años, de modo que ya se cuenta con cinco hospitales psiquiátricos, ubicados en las principales ciudades del país. Incluso en la mayoría de los hospitales provinciales ya se efectúa el concurso de profesionales de la salud mental, aunque las unidades de atención mental no sean fijas y permanentes (World Health Organization [WHO], 2008).

En el Ecuador se invierte el 1,2 % del presupuesto de salud pública en acciones de salud mental, además varios cuerpos legales estipulan disposiciones referentes a diversos aspectos de la salud mental de los ecuatorianos (World Health Organization [WHO], 2008), tal es el caso del Plan Nacional para el Buen Vivir, la ley orgánica de salud, la ley orgánica de discapacidades, los acuerdos y convenios internacionales, entre otros. La primera Política Nacional de Salud Mental fue inaugurada en Febrero de 2014, y se enfoca en cuatro lineamientos relacionados con la equidad, la promoción, la participación y la inclusión. Luego se promulgó el Modelo de Atención de Salud Mental, en el marco del Modelo de Atención Integral de Salud (MAIS) – con enfoque Familiar, Comunitario e Intercultural (Ministerio de Salud Pública del Ecuador [MSP], 2014a, 2014b).

La enfermedad mayoritariamente diagnosticada en hospitales psiquiátricos es la esquizofrenia, mientras en los servicios ambulatorios son los trastornos de ansiedad (World Health Organization [WHO], 2008).

El Cuadro Básico de Medicamentos del Ecuador incluye todos los grandes grupos de psicofármacos (antipsicóticos, antidepresivos, estabilizadores del estado de ánimo,

ansiolíticos y antiepilépticos) y su disponibilidad a nivel de los hospitales psiquiátricos es permanente, lo cual no sucede en los servicios ambulatorios (World Health Organization [WHO], 2008). Sin embargo, la disponibilidad de medicamentos en el sector público es de tan sólo el 42 %, en contraste con el sector privado que presenta el 71 %; a causa de esto, la asequibilidad de medicamentos se ve limitada, ya que del total de medicamentos comercializados tan sólo el 13 % corresponde a medicamentos genéricos, el resto corresponde a medicamentos comerciales, los cuales tienen un precio de venta 167 veces mayor (Consejo Nacional de Salud [CNS], 2007; Organización Mundial de la Salud [OMS], 2016e; World Health Organization [WHO], 2011). El promedio nacional para adquirir una dosis diaria de medicamento antipsicótico equivale al 8% del salario mínimo legal mensual (Organización Panamericana de Salud [OPS], 2013).

2.5. Una propuesta al desafío

A pesar de la naturaleza crónica y persistente de algunos trastornos mentales, con el tratamiento adecuado, las personas que sufren de trastornos mentales pueden vivir una vida productiva. Se calcula que más del 80% de las personas con esquizofrenia puede estar libre de recaídas al final de un año de tratamiento con fármacos antipsicóticos combinados con la intervención familiar; y hasta el 60% de las personas con depresión puede recuperarse con una combinación adecuada de los fármacos antidepresivos y la psicoterapia (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2016d).

No obstante, la disponibilidad de servicios de salud mental es insuficiente, los medicamentos son poco asequibles y los tratamientos de los trastornos mentales están estigmatizados por parte de la población, por lo cual las personas no reciben el tratamiento adecuado para afrontar su enfermedad. Esto desencadena una baja calidad de vida para los enfermos y para las personas a su entorno, conllevando muchas veces a la violencia, el suicidio e incluso al asesinato. Bajo este contexto, el uso de sustancias de origen natural y de venta libre para el tratamiento independiente de los trastornos psiquiátricos constituye

una alternativa para el déficit atención en materia de salud mental, teniendo en cuenta que estas enfermedades mentales afectan no sólo la calidad de vida de la población sino también su sobrevivencia.

Debido al cambio de mentalidad de la población, con una inclinación mayor hacia los productos de origen natural, toman más importancia las sustancias bioactivas de origen microbiano, esto debido a que su producción es rápida e inocua, en contraste con las sustancias de origen sintético. La psilocibina es una sustancia indólica producida por hongos alucinógenos, que presenta propiedades antidepresivas, ansiolíticas y antiadictivas (dos Santos et al., 2016); siendo efectiva en el tratamiento de los trastornos mentales como el desorden obsesivo compulsivo; la ansiedad en pacientes terminales; la cefalea crónica; la esquizofrenia; la depresión persistente; y las adicciones al alcohol, a la cocaína y al tabaco; sin inducir a largo plazo al deterioro de la memoria, delirio o adicción; siempre y cuando se empleen dosis adecuadas (Bogenschutz et al., 2015; dos Santos et al., 2016; Grob et al., 2011; Halberstadt, 2015; Hasler, Grimberg, Benz, Huber, & Vollenweider, 2004; Johnson, Garcia-Romeu, Cosimano, & Griffiths, 2014; Moreno, Wiegand, Taitano, & Delgado, 2006; Patra, 2016; Tylš, Páleníček, & Horáček, 2014; Vollenweider, Vontobel, Hell, & Leenders, 1999).

Los hongos psilocíbicos que pertenecen a los géneros *Psilocybe*, *Panaeolus* y *Gymnopilus*; han sido empleados ancestralmente por los indígenas de México y Centroamérica en sus ceremonias con fines religiosos y medicinales, ya que las sustancias indólicas que producen tienen carácter psicotrópico (Bozal, 2013; Catafolmo & Tyler, 1964; Hofmann, Heim, Brack, & Kobel, 1958; Peredy & Bradford, 2014), por lo que al ser consumidas inducen las visiones y los estados de trance (Metzner, 2005). Su cultivo constituye una alternativa viable para la producción de psilocibina, con fines potenciales en la industria farmacéutica para el tratamiento de trastornos mentales.

2.5.1. Los hongos alucinógenos

Se estima que existen en la naturaleza más de 1,5 millones de especies de hongos, de las cuales sólo se han descrito alrededor de 69 000 (Hawksworth, 1991). Aproximadamente 14 000 especies de hongos presentan basidiocarpo, de las cuáles más de 3 000 pueden ser consideradas como comestibles y tan sólo 10 producidas a escala industrial (Chang & Miles, 2004). Tan sólo en el Ecuador se han estimado más de 100 000 especies de hongos (Hawksworth, 2001), aunque sólo se han descrito 5 000 (Freire Fierro, 2004).

El término “Hongos alucinógenos” es el nombre dado a los hongos psicoactivos, pertenecientes a los géneros *Psilocybe*, *Panaeolus* y *Gymnopilus*, que contienen compuestos alucinógenos de carácter indólico como psilocibina, psilocina y sus análogos baeocistina, norbaeocistina y aeruginascina. A estos hongos se les concede un carácter mágico-religioso, ya que eran empleados por los indígenas de México y Centroamérica en sus ceremonias con fines religiosos y medicinales (Bozal, 2013; Catafolmo & Tyler, 1964; Hofmann et al., 1958; Peredy & Bradford, 2014). Los chamanes antiguos los usaban para la inducción de visiones y estados de trance, los cuales eran semejantes a estados de sueño o de psicosis aguda (Metzner, 2005). En la actualidad son consumidos como droga recreativa por algunos sectores de la población, principalmente adolescentes, aunque su posesión es ilegal (Vega-Villasante, Ruiz-González, Guerrero-Galván, & Guzmán-Dávalos, 2013). Los hongos alucinógenos están disponibles en forma fresca, conserva (por ejemplo, deshidratados, cocidos, congelado...) o incluso como polvos secos o cápsulas (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, 2015).

2.5.2. *Psilocybe spp.*

Psilocybe spp. es un género de hongos alucinógenos consumido ancestralmente por sus propiedades neurotrópicas, otorgadas por las triptaminas que contiene. Entre las principales triptaminas se encuentran: psilocibina, psilocina, baeocistina, ni-baeocistina

(European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, 2015; Gottlieb, 1976; Leung & Paul, 1966), norbaeocistina y aeruginascina (Zhuk et al., 2015).

Es un hongo fácil de obtener, fácil de cultivar, resistente a enfermedades y psicoactivamente fuerte; puede producirse en tan sólo 28 a 56 días, y en algunos casos como el de *P. caeruleascens* puede tardar desde 55 a 85 días (Gottlieb, 1976).

La mayoría de las especies del género se congregan en dos clados separados. Un clado corresponde a las especies alucinógenas y el otro a las no alucinógenas; por lo que la producción de triptaminas es una sinapomorfia para esos taxones (Redhead, Moncalvo, Vilgalys, & Matheny, 2007). Guzmán, Guillén, Hyde y Karunarathna (2012) hicieron una revisión de las especies reportadas en la literatura hasta el momento y describieron nueve nuevas especies del género. Las especies alucinógenas más estudiadas del género son *P. cubensis* y *P. mexicana*, mientras *P. semilanceata* es la más promisoría, ya que es gran productora de psilocibina (Andersson, Kristinsson, & Gry, 2009; Peredy & Bradford, 2014). Por otro lado, entre las especies no alucinógenas se destacan *P. perzevalii* (Guzmán & Kasuya, 2004) y *P. atrobrunnea* (Borovička et al., 2015).

En la actualidad, los carpóforos de *Psilocybe spp.* son consumidos como droga recreativa por algunos sectores de la población, principalmente adolescentes, aunque su posesión es ilegal (Vega-Villasante et al., 2013). Para su consumo, los hongos alucinógenos están disponibles en forma fresca, conserva (por ejemplo, deshidratados, cocidos, congelado...) o incluso como polvos secos o cápsulas. Se pueden encontrar en tiendas en presentaciones de esporas, bolsas de micelio y kits de cultivo. La mayoría de las tiendas en línea ofrecen el envío internacional, aunque la mayoría de los sitios no envían a países donde se prohíben la venta (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, 2015).

2.5.3. La psilocibina

La Psilocibina (4-fosforiloxi-N, N-dimetiltriptamina) es una indolealquilamina o triptamina que está presente en los hongos alucinógenos, también llamados “hongos mágicos” (Hofmann et al., 1958). Las triptaminas son compuestos naturales, que pueden derivarse del aminoácido triptófano por varias rutas biosintéticas (Tittarelli, Mannocchi, Pantano, & Romolo, 2015), y presentan alta afinidad para receptores serotonina 5-hidroxitriptamina (5-HT) (Halberstadt, 2015). En dosis bajas, el consumo de esta sustancia psicotrópica genera como efectos primarios distorsiones de la percepción y alteraciones del pensamiento o el estado de ánimo, con la presencia de la conciencia lúcida y efectos mínimos sobre la memoria y la orientación (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, 2015). Con dosis mayores puede considerársele como tóxico porque presenta un efecto psicodisléptico, es decir, que provoca alucinaciones visuales y auditivas; así como también puede causar trastornos de ansiedad, ataxia, convulsiones severas, desorientación, hipotensión, hipertensión, parestesia, disforia, espasmos musculares, midriasis, náuseas, salivación, sudoración, taquicardia, inconsciencia, hiperventilación, agresividad, suicidio e incluso la muerte como consecuencia de reacciones alérgicas graves (Asselborn, Wenning, & Yegles, 2000; Beug, Shaw, & Cochran, 2006; Johnson, Andrew Sewell, & Griffiths, 2012; Peden, Pringle, & Crooks, 1982).

Todavía se desconoce la dosis adecuada de esta sustancia, antes de presentar reacción alérgica, y las condiciones de cultivo del hongo óptimas para ejercer una mayor bioactividad en el consumidor (Psychedelic Times, 2016).

La psilocibina y sus derivados han demostrado ser efectivos en el tratamiento de trastornos psiquiátricos como el desorden obsesivo compulsivo; la ansiedad en pacientes terminales; la cefalea crónica; la esquizofrenia; la depresión persistente; y las adicciones al alcohol, a la cocaína y al tabaco (Bogenschutz et al., 2015; dos Santos et al., 2016; Grob et al.,

2011; Johnson et al., 2014; Moreno et al., 2006; Patra, 2016; Vollenweider et al., 1999). Por otro lado, la psilocibina puede inhibir el crecimiento de varios hongos de la rizósfera, con excepción de *Trichoderma spp.* (Keay & Brown, 1989).

2.6. Recolección

Los hongos del género *Psilocybe spp.* crecen por lo general en o cerca del estiércol de vaca en los pastos, solitario o en clústers, durante los períodos calientes y lluviosos, desde el ártico a los trópicos (Gottlieb, 1976; Stafford, 2003c). Sin embargo, algunas especies pueden crecer sobre otros sustratos, como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1.

Sustratos específicos para algunas especies de Psilocybe spp.

Especie	Sustrato	Referencia
<i>P. caerulescens</i>	Deslizamientos de tierra, caña de azúcar mantillo, alrededor de plantaciones de maíz o de café.	(Gottlieb, 1976)
<i>P. caerulipes</i>	Troncos en descomposición y restos de árboles de madera dura (especialmente abedul y arce).	(Gottlieb, 1976)
<i>P. cyanescens</i>	Tierra, entre hojas y ramas.	(Gottlieb, 1976)
<i>P. mexicana</i>	Musgos e hierbas junto a los caminos, en los prados húmedos, en los campos de maíz y cerca de los bosques de pino.	(Gottlieb, 1976)
<i>P. pelliculosa</i>	Humus y escombros, en o cerca de los bosques de coníferas.	(Gottlieb, 1976)
<i>P. quebecensis</i>	Suelos arenosos que contienen restos vegetales inundados regularmente por la crecida del río y en la descomposición de la	(Gottlieb, 1976)

	madera (especialmente de abedul, aliso, pino y abeto).	
<i>P. semilanceata</i>	Suelo, entre los pastos, bordes de caminos y bosques de coníferas, pero nunca en el estiércol.	(Gottlieb, 1976)
<i>P. strictipes</i>	Madera en descomposición y troncos de árboles como los pinos.	(Gottlieb, 1976)
<i>P. sylvatica</i>	Mantillo de hojas, madera (especialmente de haya), y suelo alrededor de los tocones y troncos.	(Gottlieb, 1976)
<i>P. cubensis var. Cyanescens</i>	Praderas afuera de las zonas forestales, estiércol de vaca o de caballo, paja, serrín o mezcla con estiércol.	(Gottlieb, 1976; Stafford, 2003b)
<i>P. coprophila</i>	Estiércol de conejo o de vaca.	(Masiulionis, Weber, & Pagnocca, 2013; Stamets, 1996)
<i>P. samuiensis</i>	No fructifica directamente en el estiércol, pero aparece disperso o gregario en el suelo endurecido de arrozales.	(Gartz, Allen, & Merlin, 1994)

Hay que tener mucha precaución porque estos hongos pueden confundirse con otros de carácter tóxico que crecen bajo las mismas condiciones, por lo que se aconseja que el recolector emplee claves taxonómicas (Gottlieb, 1976). Un buen libro para la identificación de especies a nivel macro es "Poisonous and Hallucinogenic Mushrooms" (Haard & Haard, 1975). En la tabla 2 se resumen algunas de las principales características macroscópicas necesarias para identificar las especies del género *Psilocybe spp.* en campo:

Tabla 2.*Características macroscópicas de Psilocybe spp.*

Especies	Características microscópicas			
	Estípite	Píleo	Lamelas	Ref.
<i>P. semilanceata</i>	Sólido, color blanco a amarillo.	Cónico a color café rojizo.	Adnatas a anexas.	(Cole, 2003)
<i>P. cubensis</i>	Hueco, curvado, de color blanco a amarillo verdoso, con anillo blanco fibroso.	Cónico a convexo, color ocre a crema.	Adnatas a anexas, color verde grisáceo.	(Cole, 2003; Stamets, 1996)
<i>P. aztecorum</i>	Corto.	Convexo.	Verde grisáceas.	(Stamets, 1996)
<i>P. mexicana</i>	Hueco, color rosa amarillento.	Cónico a campanulado, color café a ocre.	Ondeada, adnata o anexa.	(Cole, 2003)
<i>P. baeocystis</i>	Céntrico, curvado y color café.	Ondulado y parecido a la tapa de una botella.		(Stafford, 2003a)
<i>P. coprophila</i>	Céntrico, ahusado hacia arriba, hueco, subcartilaginoso, a menudo floccoso y luego Glabro, color ocre.	Inicialmente convexo, luego glabro plano o Incluso deprimido. Color avellano a marrón.	Subdistantes, desiguales, adnadas a subdecurrentes, color amarillo a multicolor.	(Gilmore, 1926)

<i>P. squamosa</i>	Cilíndrico, céntrico, color crema, con anillo fibroso.	Convexo, de ligeramente umbonado, sedoso, amarillo.	Adnadas, anexas y color lila.	(Hernández, 2007)
<i>P. percevalii</i>	Color blanquecino ocre, con anillo fibroso blanco.	Convexo a subumbonado o subcampanulado, liso, color pálido a marrón.	Adnadas, color violáceo-marrón y bordes blanquecinos.	(Guzmán & Kasuya, 2004)
<i>P. pseudobullacea</i>	Color blanco a gris pálido, anillo membranoso blanco.	Convexo, a veces subumbonado, liso, pero ligeramente estriado, color marrón rojizo a marrón amarillento.	Adnadas, decurrentes, color marrón violáceo oscuro, con bordes blanquecinos.	(Guzmán & Kasuya, 2004)
<i>P. samuiensis</i>	Hueco, liso a ligeramente subbulboso, color blanco paja pálido con fibrillas blancas.	Subconvexa a cónica-convexa, umbonado o campanulado, estriado, sulcado en el margen e higrófono, de color marrón rojizo a paja en fresco y arcilla cuando está seco.	Adnadas a anexas, de color arcilla en fresco y marrón violáceo a marrón chocolate con bordes blancos cuando está seco.	(Gartz et al., 1994)

En las figuras 1, 2, 3 y 4 se ve la representación fotográfica de algunas especies del género (Stamets, 1996):



Figura 1. *P. cubensis*



Figura 2. *P. pelliculosa*



Figura 3. *P. semilanceata*



Figura 4. *P. mexicana*

En la literatura se han reportado varias pruebas de campo para la identificación de especies psilocíbicas. Una de ellas es la exposición del tejido interno de los carpóforos al aire, la cual se tornará azulada después de 30 minutos tras oxidación de sustancias a base de indol, sin embargo, puede que algunas especies venenosas como *Boletus Eastwoodiae* respondan positivo a esta prueba mientras algunas que sí son psilocíbicas no lo hagan. Otra prueba reportada en la literatura es el tratamiento de los tejidos con metol, un producto químico utilizado en los desarrolladores de fotos, el cual acelera la coloración azul de los hongos de psilocibina; sin embargo, varias setas que contengan sustancias indólicas de cualquier tipo va a responder positivamente a esta prueba y la mayoría de los organismos vivos contienen aminoácidos a base de indol como el triptófano (Gottlieb, 1976).

Según Gottlieb (1976) no existe prueba de campo para la identificación de los hongos de psilocibina, sin embargo, hay una prueba relativamente simple para identificar la presencia de la psilocina y psilocibina mediante cromatografía en papel, para ello el hongo se seca, se pulveriza y se extrae por maceración dinámica con una pequeña cantidad de metanol durante media hora; luego de que los residuos se han asentado, el sobrenadante es vertido sobre el papel en una zona de unos 2 mm. La zona manchada es tratada con agua saturada de butanol durante aproximadamente dos horas, posteriormente es secada y pulverizada ligeramente con una solución saturada de p-dimetil-aminobenzaldehído en alcohol y luego de nuevo con ácido clorhídrico 1 N. El papel es secado de nuevo y analizado. Si se ha desarrollado un color rojizo indica presencia de psilocibina, mientras que si el color desarrollado es azul-violeta indica presencia de psilocina (Gottlieb, 1976).

2.7. Aislamiento

El aislamiento se puede realizar a partir de un cuerpo fructífero o de unas pocas esporas del hongo; para la toma de un tejido se disecciona el tallo del carpóforo; mientras que para realizar la impresión de esporas se corta el estípite desde la base y se deposita el píleo boca abajo sobre una hoja de papel blanco o un portaobjetos, luego se cubre con una tapa

de una caja de Petri y se esperan 24 horas hasta obtener la esporada (Gottlieb, 1976; Stamets, 1996).

Las muestras son cultivadas en medios Agar Sabouraud (Leung, Smith, & Paul, 1965), Agar Papa Dextrosa (PDA, por sus siglas en inglés) o Agar Extracto de Malta (MEA, por sus siglas en inglés) a 21-24 °C durante 10-12 días. En cuanto a medios líquidos se reporta caldo de Papa-Levadura-Dextrosa (PDY, por sus siglas en inglés). El medio de cultivo tiene que haber sido previamente esterilizado a 65 °C durante 30 minutos; una temperatura mayor provoca la caramelización de los azúcares, lo que inhibe el crecimiento del micelio y la producción de psilocibina (Gottlieb, 1976). Se deben seleccionar las cepas de mayor y más rápido crecimiento, y por supuesto, que no estén contaminadas (Gottlieb, 1976).

2.8. Identificación

Para la identificación morfológica de las especies de hongos, mediante observación de características microscópicas se emplean dos reactivos: una solución amoniacal al 10 % y el reactivo de Melzer; el primero se emplea como agente de limpieza suave y de rehidratación de la carne del hongo, mientras el segundo se emplea para visualización de caracteres, al aplicarse da un color azulado-negro, púrpura-marrón o dorado a amarillento. La muestra se sumerge primero en solución amoniacal y luego se monta en el reactivo de Melzar sobre un portaobjetos, luego se tapa con el cubre objetos y se observa. El tamaño de la muestra debe ser al menos como el de una cabeza de alfiler, con un espesor igual o inferior a 1 mm. Los principales caracteres estudiados son las esporas, el cistidio, la estructura de la capa externa del píleo y la estructura básica del tejido inter-branquial (Watling, 1983).

Para tener en cuenta al momento de la identificación se describen a continuación algunas características generales del género *Psilocybe spp.*, son hongos cuyas hifas son apiculadas y con punta hialina; el micelio se observa de color blanco y algodonoso; y la esporada en

masa es púrpura cuando se derrama por primera vez y más tarde se torna de coloración marrón negruzca. Los basidios son tetrasporosos en forma de botella; el pleurocistidio puede ser escaso ventricoso a ausente, con una base corta y estrecha o subcilíndrica; las esporas son de color marrón amarillento oscuro, subhexagonales en vista frontal y subelípticas en vista lateral, aunque pueden ser subelipsoides por todas las vistas, con una base estrecha y un amplio poro germinal. Cuando las esporas comienzan a formarse se produce una curvatura negativa geotrópica del estípite (Badham, 1982; Guzmán & Kasuya, 2004; Stamets, 1996). Para la consulta de claves taxonómicas más específicas remitirse al trabajo de Watling (1983). En la figura 5 se representan algunas de estas características mencionadas.

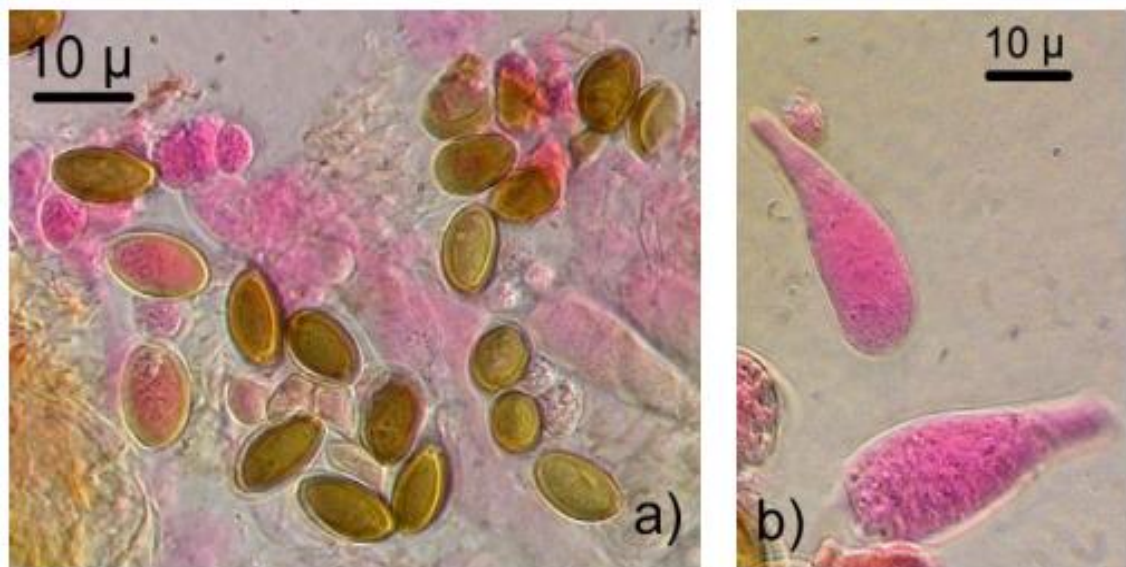


Figura 5. a) Esporas y b) basidios de *Psilocybe cubensis*. (Hernández, 2007)

Lee, Cole y Linacre (2000) emplearon un método para identificación de las especies del género, mediante el uso de secuencias de ADN específicas dentro del espaciador transcrito interno del complejo de genes ribosomales. La amplificación de un producto de ADN común y de dos metabolitos específicos del género facilita la identificación inequívoca de los contenidos de estos hongos a nivel de género (Lee et al., 2000).

Los métodos de análisis molecular identifican un mayor número de especies en contraste con el método morfológico (Gambaro et al., 2016; Kowalczyk et al., 2015), que consta principalmente de una impresión de esporas sobre una superficie plana y la observación de sus características microscópicas (Gottlieb, 1976). Hasta el momento se han descrito 435 secuencias de ADN y ARN; 69 secuencias de proteínas; 36 secuencias fijas de estudios filogenéticos y de población; y un catálogo de nomenclatura y clasificación taxonómica (National Center for Biotechnology Information [NCBI], 2016a).

Lo mejor es emplear métodos moleculares, ya que muchas especies pueden parecerse demasiado morfológicamente, pero en términos genéticos pueden ser muy distantes; tal es el caso de *P. laetissima*, que recientemente se cambió al género *Leratiomyces* (Borovička et al., 2015).

2.9. Caracterización

Como producto de su metabolito secundario, *Psilocybe spp.* produce algunas sustancias como psilocibina (4-fosforiloxi-N, N-dimetiltriptamina), psilocina (4-hidroxi-N, N-dimetiltriptamina), baeocistina (4-fosforiloxi-N-metiltriptamina), norbaeocistina (4-fosforiloxi-triptamina) (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, 2015; Gottlieb, 1976; Leung & Paul, 1966), 4-hidroxitriptamina (Repke, Leslie, & Guzman, 1976), aeruginascina (Zhuk et al., 2015), gliceraldehído 3-fosfato dehidrogenasa (National Center for Biotechnology Information [NCBI], 2016b), lecitinas (Hernandez, Ortiz, Pez, Maso, & Zenteno, 1993), fenoles (Nowacka et al., 2015), entre otras.

Algunos hongos alucinógenos contienen diversas cantidades de feniletilamina, una amina simpaticomimética, que puede ser responsable de sus efectos cardiovasculares (taquicardia) y otras reacciones no deseadas (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, 2015). Varias de estas sustancias actúan como alérgenos y pueden estar presentes tanto en el micelio como en las esporas, aunque no necesariamente han de ser los mismos (Helbling, Horner, & Lehrer, 1993).

2.10. Conservación

Se aconseja que para el mantenimiento de los medios se alternen los medios PDA y MEA, mediante subcultivos periódicos (Gottlieb, 1976; Keay & Brown, 1990). Los carpóforos se pueden secar a 25 °C, sellar en bolsas de plástico y almacenar a -10 °C (Gartz & Moller, 1989). El hongo puede todavía ser potente después de un largo periodo de almacenamiento (Christiansen & Rasmussen, 1982); y las esporas pueden germinar después de 9 meses de almacenamiento a 20 °C (Gartz, 1992).

2.11. Proceso de producción de *Psilocybe spp.*

El método de cultivo de hongos psicodélicos más común es el PF-Tek, inventado por Robert McPherson (McPherson, 1991) en 1991. Este método es muy popular para el cultivo artesanal porque es fácil, sencillo, barato y fiable; los materiales necesarios son baratos y fáciles de conseguir. Originalmente se empleaban granos de centeno, pero más tarde se incluyó harina de arroz integral y vermiculita. Es indispensable el uso de bolsas y cajas de cultivo con filtro de aire, una jeringa, un atomizador y clips como se muestra en la figura 6 (Innervisions, s. f.). En caso de que no se cuente con filtro de aire, se puede pegar cinta de enmascarar en los orificios de la tapa por el reverso (McPherson, 1991).



Figura 6. Kit de cultivo PF-Tek (Innervisions, s. f.)

Sustratos: se ha reportado el uso de abono vegetal (Gottlieb, 1976), aserrín (Gartz, 1992), troncos de madera de roble decaída, vainas de frijol, estiércol de conejo, estiércol de vaca (Gilmore, 1926), estiércol de búfalo (Gartz et al., 1994), copos de avena, paja de avena (Gabriel, Švec, Koliňová, Tlustoš, & Száková, 2016), paja de trigo (Acosta-Urdapilleta & Medrano-Vega, 2006), turba tamizada de musgos del género *Sphagnum* (Keay & Brown, 1990), granos de arroz (Gartz & Moller, 1989), granos de centeno, semillas de pasto, harina de arroz, vermiculita (McPherson, 1991). Puede suplementarse con una mezcla de arena de sílice/piedra caliza (Gottlieb, 1976).

Preparación de Inóculo: hay que preparar primero un Stock, que consta de agar con micelio, empleado para transportar la cepa del hongo a los granos, con los cuales se va a inocular el sustrato. Se emplean por lo general Agar Papa Dextrosa (PDA, por sus siglas en inglés) y Agar Extracto de Malta (MEA, por sus siglas en inglés); a veces se prepara una variación del MEA, el medio Malta-Levadura -Peptona (MYP, por sus siglas en inglés). Las colonias a los 7-20 días de edad en cajas de Petri con el medio seleccionado muestran una apariencia blanca y viscosa. Estos medios stock se pueden repicar en nuevas cajas de Petri cuantas veces sean necesario. Para la preparación de los inóculos se esterilizan granos de centeno, trigo o cebada a 15-20 lb de presión por 45 minutos; luego de enfriarse, se humedecen con agua destilada y se suplementan con carbonato de calcio, el cual evita que se aglomeren. Posteriormente se inoculan con varios tacos de agar stock e incuban con agitación esporádica durante 10 días a 21-27 °C y 95 % de humedad relativa. La temperatura y humedad relativa afectan significativamente el tiempo de incubación mientras el pH e iluminación no influyen significativamente. Por otro lado, la agitación permite la aireación del medio de cultivo (Oss & Oeric, 1991). En el método PF-Tek, el inóculo consta de una suspensión de esporas (McPherson, 1991), mientras en otros casos consta directamente de cubos de agar con micelio (Keay & Brown, 1990).

Fermentación: al frasco con el inóculo se adiciona suelo pre-humedecido y pre-esterilizado, aunque el agua se puede adicionar con un spray luego de mezclar con el

inóculo. El sustrato debe absorber la cantidad de agua necesaria de modo que se torne uniformemente oscuro y al exprimir con el puño de la mano no escurra agua. Los frascos se incuban en un ambiente con alta humedad relativa, así como con una aireación y una temperatura adecuada para evitar la evaporación del agua del medio de cultivo (Oss & Oeric, 1991). Los hongos fructifican a las 8-12 semanas después de la inoculación (Gartz, 1992).

Según el método PF-Tek, los sustratos (harina de arroz y vermiculita) son adicionados a los frascos y humedecidos; luego los frascos son tapados, envueltos en papel aluminio y esterilizados a 121 °C durante 60 minutos. Posteriormente se debe inyectar la suspensión de esporas con una jeringa flameada a través de cada orificio de la tapa (Keay & Brown, 1990), como se indica en la figura 7. La incubación debe hacerse en un lugar oscuro y caliente a una temperatura de 20 °C, siendo aceptable todavía hasta los 28 °C (Innervisions, s. f.). Luego de que el micelio invade el sustrato, se introducen los frascos en bolsas con filtro de aire y se humedecen con un spray (ver figura 8) e incuban a 20-25 °C. Después de 14 días aparecen los primordios, y luego de 7 días más, los carpóforos están listos para cosecharse. El tiempo óptimo de cosecha es cuando los píleos empiecen a abrirse (McPherson, 1991).

a)



b)



Figura 7. Jeringa flameada (a) e inoculación de bioceldas (b) (Innervisions, s. f.).



Figura 8. Bioceldas en bolsas con aireación.

2.12. Factores que afectan la producción de *Psilocybe spp.*

Fuente de carbono: Se reporta que el almidón de papa es la mejor fuente de carbono y la harina de soya es la mejor fuente de nitrógeno (Stafford, 2003c). Es importante tener en cuenta que la composición del sustrato se refleja en la composición de los cuerpos fructíferos; por ejemplo, los carpóforos de *P. cubensis* pueden absorber el mercurio del medio de cultivo (Gabriel et al., 2016).

Micronutrientes: Usualmente se emplea el triptófano para inducir la producción de psilocibina (Heim & Wasson, 1958). Algunos oligoelementos también son adicionados a los medios de cultivo, tal es el caso de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{MO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Keay & Brown, 1990).

Temperatura: Es importante controlar este factor, ya que de él depende el crecimiento y desarrollo del micelio. Se reportan un intervalo de temperatura de 20-30 °C para la producción de cuerpos fructíferos del género *Psilocybe*. Si la temperatura es muy alta puede ocurrir muerte térmica, después de 35 °C para *P. caerulescens* y después de 40 °C

para *P. cubensis* var. *Cyanescens* (Gottlieb, 1976), pero si la temperatura es muy baja se retrasa el crecimiento del hongo, hasta que se detiene a menos de 15 °C (Innervisions, s. f.); no obstante, especies como *P. quebecensis* pueden desarrollarse a temperaturas menores, entre 6 a 15 °C. La temperatura también afecta la producción de metabolitos; por ejemplo, a 24°C hay un crecimiento más rápido pero una menor producción de psilocibina en contraste con lo ocurrido a 21 ° C (Gottlieb, 1976).

pH: se puede adicionar carbonato de calcio para equilibrar el pH, ya que un medio básico favorece la contaminación bacteriana. La máxima producción de psilocibina ocurre a pH ácido, logrando un rendimiento hasta de 5,2 % en base seca del hongo (Andersson et al., 2009).

Iluminación: la luz inhibe el alargamiento del estípite, aunque es necesaria en al menos dos fases del ciclo de vida de *Psilocybe spp.*: la aparición de primordios y la producción de esporas (Badham, 1982). Para la producción de carpóforos se utiliza desde iluminación limitada hasta iluminación natural, ya que en la oscuridad el hongo no puede fructificar adecuadamente. A gran escala se emplean tubos fluorescentes de amplio espectro uniformemente distribuidos en el techo y encendidos durante 10-12 horas diarias (Gottlieb, 1976), mientras a escala laboratorio se reportan fotoperiodos de 16 horas (Keay & Brown, 1990).

Humedad: La humedad es importante para que el hongo se desarrolle adecuadamente, si es baja el medio se seca y el hongo no se desarrolla, pero si es alta el medio se compacta y el hongo se ahoga (Oss & Oeric, 1991).

Aireación: cuando existe una mala aireación, se acumula en exceso en dióxido de carbono, lo que inhibe la fructificación o previene la maduración de los carpóforos (Oss & Oeric, 1991).

2.13. Escalado

Se ha reportado una pequeña sala de 10 x 15 pies de superficie con 8 pies de alto, acondicionada con estantes de 1 pie de profundidad por 5 pies de largo para ubicar cajas de Petri y estantes de 3 de pies de profundidad por 3 por pies de largo para ubicar frascos Erlenmeyer. Con esto se pueden producir 5 000 dosis de alucinógeno por semana, teniendo en cuenta que una dosis va de 6-20 mg, con una media de 10 mg (Gottlieb, 1976). En el método PF-Tek se emplean bioceldas de aproximadamente 300-500 ml, constan de frascos de vidrio con tapa, la cual tiene cuatro orificios para permitir la inoculación del medio de cultivo posterior a la esterilización (ver figura 9). Es necesario tener en cuenta que las perforaciones deben hacerse por el revés de la tapa y sellarse con cinta de enmascarar, para evitar que el sustrato absorba mayor humedad que la necesaria (McPherson, 1991).

a)



b)

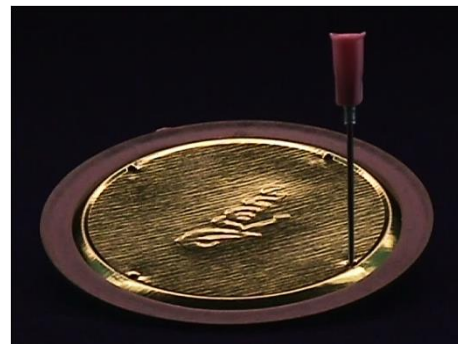


Figura 9. (a) Biocelda empleada en el método PF-Tek y (b) su tapa perforada.

(McPherson, 1991).

2.14. Extracción triptaminas

La psilocibina y la psilocina son indolealquilaminas estructuralmente similares al neurotransmisor serotonina (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, 2015), son derivados psicotomiméticos de triptamina 4-sustituida y se aislaron por primera vez a partir de *Psilocybe mexicana* (Hofmann et al., 1958). La producción de la psilocibina

en cultivo sumergido se investigó por primera vez por Catafolmo y Tyler (Catafolmo & Tyler, 1964).

Teóricamente la psilocina tiene el mismo efecto sobre el usuario como la psilocibina, la única diferencia es que este último contiene enlaces de fosfato que desaparecen después de la asimilación en el cuerpo (Casale, 1985); en las figuras 10 y 11 se muestran las estructuras de la psilocina y psilocibina. El contenido de psilocina es por lo general menor que el de psilocibina; se reporta que se extrae un 8 % frente un 76 % respectivamente (Andersson et al., 2009). *P. mexicana* puede contener entre 0,2 a 0,4 % de psilocibina en base seca del cuerpo fructífero, y entre 0,2 a 0,3 % en base seca de micelio (Hofmann et al., 1959). Por otro lado, *P. semilanceata* reporta un 0,6 % y *P. cubensis* un 1,0 %; algunas otras especies como *P. azurens* y *P. bohémica* pueden contener más del 1% (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, 2015).

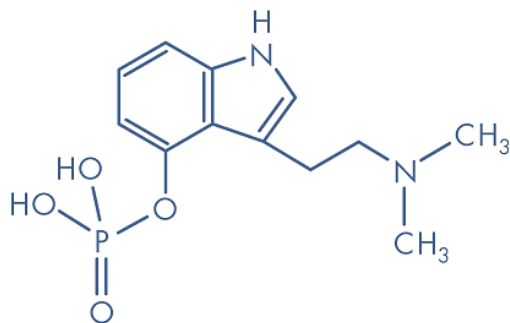


Figura 10. Estructura molecular de la psilocibina

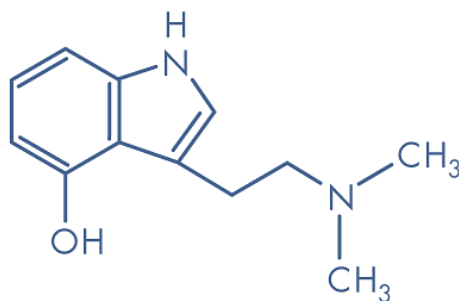


Figura 11. Estructura molecular de psilocina.

Para la extracción de estas triptaminas se desmenuzan y pulverizan los micelios secos, se disuelven en metanol y se ponen al baño maría durante cuatro horas. Se filtra y conserva el filtrado, luego se vuelve a extraer la misma muestra de micelio con etanol por dos veces más y se conserva también el filtrado. Para comprobar que todos los alcaloides han sido extraídos se hace una prueba de color, que consiste en extraer un poco de muestra con reactivo de Keller (ácido acético glacial, cloruro ferroso, y ácido sulfúrico concentrado) y se observa la coloración, si es violeta indica que los alcaloides siguen presentes y se debe hacer otra extracción con metanol. Una vez se termine la extracción se evapora el filtrado hasta sequedad total (Gottlieb, 1976). El contenido de baeocistina y la psilocibina es más alto en el píleo de las setas que en el estípite. Los niveles de psilocibina pueden variar desde 0,11% hasta 1,34% en peso seco (Gartz, 1992). Es importante, resaltar que antes de la extracción acuosa con disolventes orgánicos es necesario desfosforilar la psilocibina a psilocina debido a su baja solubilidad (Casale, 1985). La extracción de estas triptaminas también puede hacerse por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC, por sus siglas en inglés), Cromatografía de Capa Fina (TLC, por sus siglas en inglés) o Cromatografía en Columna de Celulosa (Gartz, 1989).

La concentración y la detectabilidad de la psilocina y psilocibina están limitadas por una serie de condiciones:

- La ausencia de glucosa restringe la producción de psilocibina (Catafolmo & Tyler, 1964).
- Los bajos niveles de succinato de amonio disminuyen los rendimientos de producción de psilocibina (Catafolmo & Tyler, 1964).
- El medio de cultivo requiere un pH de menor que 7 (Catafolmo & Tyler, 1964).
- La producción máxima de psilocibina se produce en el séptimo día después de la germinación, mientras que la producción máxima del micelio se alcanza alrededor

del noveno día (Catafolmo & Tyler, 1964). Aunque otros autores aseveran que la máxima producción de psilocibina se da cuatro días después de acabarse el azúcar del medio de cultivo (Gottlieb, 1976).

- La pérdida completa de la psilocina y psilocibina de los carpóforos cosechados se da tras exposición a temperatura ambiente durante un período prolongado de tiempo (Beug & Bigwood, 1981). Así mismo, tras exposición prolongada al aire, que provoca su oxidación, es evidente una coloración azul (Horita & Weber, 1961).
- Sus propiedades psicoactivas varían y se deterioran en el tiempo como consecuencia del largo ciclo de mercado del producto. Además, algunos comerciantes abren el producto para que absorba humedad y gane peso, ocasionando que se oxiden las sustancias psilocíbicas (Stafford, 2003b).

CAPÍTULO III

DESARROLLO EXPERIMENTAL

3. Desarrollo experimental

3.1. Aislamiento, identificación y caracterización de la cepa nativa de *Psilocybe spp.*

El principal objetivo de este experimento fue realizar el aislamiento, identificación y caracterización de la cepa nativa de *Psilocybe spp.*

3.1.1. Materiales y métodos

El trabajo experimental se realizó en el laboratorio de Biotecnología Fúngica del Centro Ecuatoriano de Biotecnología y Ambiente (CEBA) con el apoyo del Ingenio Azucarero del Norte (IANCEN).

3.1.1.1. Ubicación

3.1.1.1.1. Recolección

- Provincia: Pichincha
- Cantón: Rumiñahui
- Parroquia: Sangolquí (en terrenos empleados como potreros para ganadería)
- Coordenadas geográficas: UTM WGS84 ZONA 17S, ESTE 786588,58, NORTE 9964474,54.

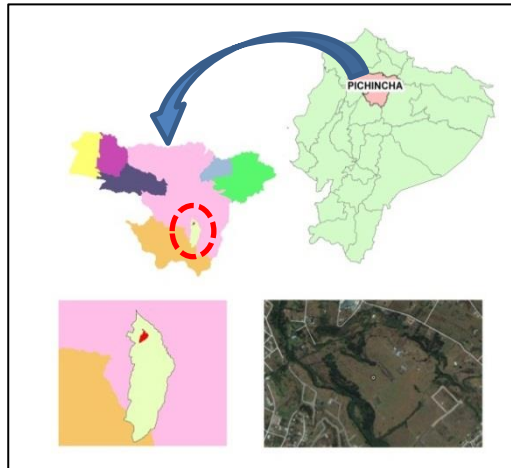


Figura 12. Área de recolección de muestras de *Psilocybe* spp.

3.1.1.2. Fase experimental

3.1.1.1.2. Aislamiento

- Provincia: Imbabura
- Cantón: Ibarra
- Laboratorio del Banco de Recursos Genéticos Microbianos, BRGM
- Identificación
- Provincia: Pichincha
- Cantón: Quito
- Laboratorio IDgen- Identificación molecular

3.1.1.3. Materiales y equipos.

Para la recolección de muestras de *Psilocybe* spp. se utilizó lo siguiente:

Equipo:

- Navegador
- Cámara fotográfica

Materiales:

- Libreta de campo
- Marcador de tinta permanente
- Guantes desechables
- Fundas de papel
- Cinta Masking
- Cooler
- Fundas ziploc
- Gel refrigerante

Para el aislamiento de las cepas se utilizó lo siguiente:

Equipo:

- Balanza
- Auto clave

Materiales:

- Pinzas
- Tijeras
- Agua destilada
- Pipetas
- Embudo de vidrio
- Vaso de precipitación
- Mechero de bunsen
- Tubos de ensayo con tapa rosca
- Matraz
- Frascos de vidrio esterilizados
- Mechero
- 20 Cajas Petri esterilizables

Medios de cultivo:

- Agar de papa y dextrosa
- Agar extracto de malta

El 20 de marzo de 2017 se procedió a recolectar las muestras de *Psilocybe spp.* en terrenos empleados como potreros para ganado.



Figura 13. Psilocybe spp. recolectado en su medio natural.

El aislamiento se realizó en medio de cultivo Agar de papa y dextrosa (PDA) y Agar Extracto de Malta (MEA).

Se tomó un bisturí estéril y se hizo un corte longitudinal sobre el carpóforo del hongo, luego con unas pinzas metálicas asépticas se tomaron fragmentos de tejido interno de aproximadamente 2mm de longitud (Ortiz et al, 2016). Los trozos de tejido se depositaron en cajas de Petri que contenían el medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA) con antibiótico y se incubaron durante 6 días a 22 °C. Se consideraron como aislamientos positivos, todos aquellos con crecimientos y características miceliares uniformes, sin contaminaciones ni estados conidiales.

La cepa se purificó mediante el método de repiques sucesivos, se rotuló con la siguiente nomenclatura: PB2/NB2 en el Laboratorio de Identificación Molecular IDgen en la ciudad de Quito. Luego, se la transportó y almacenó a 4 °C en el Banco de Recursos Genéticos Microbianos (BRGM) del Centro Ecuatoriano de Biotecnología y Ambiente (CEBA).

Identificación: La identificación morfológica se realizó siguiendo la metodología descrita por Rosero y colaboradores (Rosero et al. 2016), que consiste en observar las características morfológicas de los cuerpos fructíferos, la estructura del tejido y del micelio, la forma de las hifas, el color del himenóforo, el tipo de zona pilosa y el tamaño de la capa medular. Luego se compararon con las claves taxonómicas reportadas por Gottlieb en 1976.

La identificación molecular de la cepa se realizó en el laboratorio especializado IDgen – Identificación molecular (ubicado en la ciudad de Quito, Av. De los Granados E14-285 y Eloy Alfaro). A partir de la muestra del cultivo de *Psilocybe spp.* creciendo en agar se realizó la identificación molecular por barcoding, para lo cual se realizó la extracción de ADN del micelio y el ensamblaje de PCR bajo cabina de bioseguridad con un flujo positivo, y en un termo bloque a -5 oC, se utilizaron tubos PCR de 200uL.

Se empleó una muestra de la cepa de *Psilocybe spp.*, con el siguiente código:

Tabla 3.

Código de muestra de Psilocybe spp.

CULTIVO	CODIGO MUESTRA
A	CEBA-PSYM1-03-17

Representa la codificación de las muestras. Fuente: Autora

Se utilizó la identificación molecular de microorganismos (Extracción de ADN, Amplificación de barcode, secuenciación estándar, ensamblaje de productos de PCR y búsqueda en base de datos). Los protocolos fueron desarrollados y probados por el laboratorio IDgen, los detalles técnicos se presentan en el informe Nro. A-018 (Anexo 1).

Los protocolos para la “Secuenciación de ADN total genómico proveniente de tejido fúngico” se presentan el informe Detalle de protocolos presentado por el laboratorio IDgen (Anexo 2).

La búsqueda en la base de datos Genbank, de la secuencia obtenida permitió identificar a las muestras analizadas como *Psilocybe cubensis*. (IDgen, 2017) (Anexo 3).

Caracterización: Se realizó la caracterización en el laboratorio de la Estación Experimental Santa Catalina del INIAP, ubicada en la dirección: Panamericana Sur Km. 1, sector Cutuglagua, cantón Mejía, Pichincha; para ello se realizaron dos análisis: Análisis Proximal (Bromatológico) método MO-LSAIA-01, método referencial U. Florida 1970 y Análisis de Minerales Totales, método MO-LSAIA-03, método referencial U. Florida 1980, para lo cual se utilizó 1Kg de cepa pura de *Psilocybe cubensis*, obtenido en el laboratorio del CEBA.

3.1.2. Resultados

Aislamiento: El aislamiento de *Psilocybe spp.* se realizó a partir del tejido del hongo y no de esporas debido a que los cultivos de tejidos son esencialmente clones del hongo, en contraste con los cultivos de esporas, que presentan variabilidad genética (Lopez, A. 2007).

En la figura 14, se presentan las muestras de cuerpos fructíferos recolectados en campo para obtener la cepa pura de *Psilocybe spp.*



Figura 14. Muestras de hongos recolectados.

En las figuras 15 y 16 se presenta el proceso de preparación de medios de cultivo PDA y MEA.



Figura 15. Preparación de medios de cultivo PDA.



Figura 16. Esterilización de medios de cultivo

En las figuras 17 y 18, se presenta el proceso para inocular los medios de cultivo y obtener la cepa de *Psilocybe spp.*



Figura 17. Preparación de muestras de hongo para inocular los medios de cultivo PDA y MEA (a, b).



Figura 18. Inoculación de medios de cultivo.

En la figura 19, se presentan las cepas de *Psilocybe spp.*



Figura 19. Cepas de *Psilocybe spp.* obtenidas en laboratorio.

Identificación: El hongo recolectado crece en estiércol de vaca, solitario o en clústers, presenta basidiocarpos en forma de sombrero, estípites huecos, curvados, de color blanco a amarillo verdoso, con anillo blanco fibroso, píleo cónico a convexo, color ocre a crema,

lamelas adnatas a anexas, color verde grisáceo. Una de las pruebas realizadas en campo fue la exposición del tejido interno de los carpóforos al aire, la cual se tornó ligeramente azulada (púrpura) tras su oxidación. Estas características macroscópicas coinciden con las reportadas por Cole y Stamets (Cole, 2003; Stamets, 1996), y por Gottlieb (Gottlieb, 1976).



Figura 20. Carpóforos de Psilocybe spp. en su medio natural

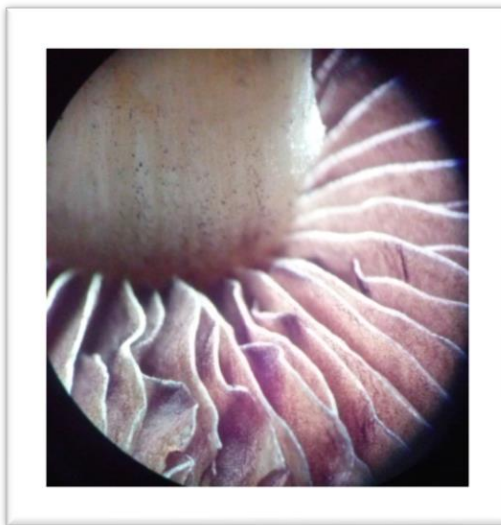


Figura 21. Vista microscópica de Psilocybe spp. en proceso de oxidación

Verificando con las claves taxonómicas descritas en la metodología se deduce que el hongo pertenece al género *Psilocybe*; sin embargo, es necesario un estudio filogenético

molecular para identificar la especie con exactitud (Badham, 1982; Guzmán & Kasuya, 2004; Stamets, 1996).

Una vez realizado el estudio de identificación molecular se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 4.

Resultados de la identificación

Codificación	Muestra	Longitud	% de Calidad	Organismo	Fragmento	% de identidad	Nº Accesoión
A	Pb2/Nb2	616	65	<i>Psilocybe cubensis</i>	ITS	99	KU640170.1

La tabla representa los datos obtenidos en la identificación realizada por IDgen. (IDgen, 2017).

La búsqueda en la base de datos Genbank, de la secuencia obtenida permitió identificar a la muestra analizada (A) como *Psilocybe cubensis*. (IDgen, 2017).

La especie se clasifica en:

- Reino: Hongos
- Filo: Basidiomycota
- Clase: Agaricomycetes
- Orden: Agaricales
- Familia: Strophariaceae
- Género: *Psilocybe*
- Especie: *Psilocybe cubensis* (Earle) Singer 1948

Estos datos se tomaron del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, 2017).

Se utilizó la identificación molecular de microorganismos (Extracción de ADN, Amplificación de barcode, secuenciación estándar, ensamblaje de productos de PCR y búsqueda en base de datos). Los productos de PCR fueron depurados previo a su secuenciación. El producto de amplificación limpio y los primers ITS5, ITS4 se utilizaron para secuenciación con el método SANGER. Las secuencias se ensamblaron mediante el programa bioinformático Geneious. De las muestras analizadas se obtuvo como resultado *Psilocybe cubensis*, para la identificación se utilizó la base de datos GenBank. Este análisis lo realizó el laboratorio especializado IDgen. Se aisló la cepa CEBA-PSYM1-03-17, de *Psilocybe spp.* (PB2/NB2), la cual se almacenó en el Banco de Recursos Genéticos Microbianos (BRGM) del CEBA.

Caracterización: La muestra de *Psilocybe cubensis* analizada, arrojó como resultado del análisis proximal el contenido de humedad en un 41.73%, 1.99% de cenizas, 1.65% de extracto etéreo (grasa), 17.43% de proteína, 3.88% de fibra, 75.05% de extracto libre de nitrógeno (carbohidratos). Para el análisis de minerales totales se trabajó la muestra seca obteniéndose: 0.14% de calcio (Ca), 0.52 % de fósforo (P), 0.16% de magnesio (Mg), 0.25% de potasio (K), 0.02% de sodio (Na), 2 ppm de cobre (Cu), 58 ppm de hierro (Fe), 27 ppm de manganeso (Mn) y 27 ppm de zinc (Zn).

3.1.3. Discusión

Para un adecuado manejo de las muestras de *Psilocybe spp.* estas fueron cultivadas en medios Agar Papa Dextrosa (PDA) y Agar Extracto de Malta (MEA), comparable con lo realizado por Leung, Smith, & Paul, en el año 1965, con el fin de obtener las cepas del hongo.

Para la identificación molecular de microorganismos se utilizaron técnicas basadas en la extracción de ADN, Amplificación, secuenciación, y ensamblaje de productos de PCR obteniendo como resultado *Psilocybe cubensis* de la muestra CEBA-PSYM1-03-17 con un 99% de identidad, con número de accesoión KU640170.1; se identificó a *P. cubensis* utilizando la base de datos del GenBank, resultados similares a los reportados por Wesselink, M., Ark, E. M. and Kuiper, I. en un protocolo de identificación realizado en 1994, adicional a eso se puede encontrar como alternativas para la identificación la base de datos de la Infraestructura Mundial de Información en Biodiversidad de Gbif del año 2017.

Según lo dicho por la FAO en el año 2018, los análisis proximales se pueden aplicar para el manejo de materiales que serán usados para formular una dieta, ya sea como fuente de proteína o de energía, por lo que *Psilocybe cubensis* es un hongo superior consumido por ingestión y presenta un alto contenido de carbohidratos y proteínas. El análisis de minerales totales, según división de agricultura de la Universidad de Arkansas, ayuda a describir la disponibilidad de nutrientes ya sea del suelo o de otros materiales.

3.2. Protocolo de conservación para la especie *Psilocybe cubensis* por liofilización.

El objetivo del presente estudio fue la conservación de *Psilocybe cubensis* utilizando la liofilización.

3.2.1. Materiales y métodos

Ubicación: Para la liofilización se utilizaron los equipos del laboratorio de la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Ambientales – FICAYA de la Universidad Técnica del Norte, calle Juan Montalvo, entre Juan de Velasco y Cristóbal Colón.

Cepa: Se empleó la cepa CEBA-SPE-PC-200317 de *Psilocybe cubensis*, perteneciente al Banco de Recursos Genéticos Microbianos (BRGM) del Centro Ecuatoriano de Biotecnología y Ambiente (CEBA); la cual fue aislada, caracterizada e identificada en el acápite anterior.

Medios de cultivo: Se emplearon los medios de cultivo Agar de Papa y Dextrosa (PDA) y Agar Extracto de Malta (MEA).

Equipos: Se empleó una cámara de flujo laminar diseñada por el CEBA a partir de un filtro HEPA (High Efficiency Particulate Air) H14 EN-1822-1, y un equipo liofilizador de bandejas, perteneciente a la Universidad Técnica del Norte (UTN).

Preparación de cepas de trabajo: Los medios de cultivo se prepararon siguiendo la técnica descrita por Stamets (7), se vertieron en tubos de ensayo (picos de flauta) de 5ml y se dejaron solidificar a temperatura ambiente en posición inclinada. Luego se inocularon con plugs o tacos de la cepa de reserva CEBA-SPE-PC-200317 y se incubaron durante 7 días a 22 °C.

Procedimiento: La cepa de *Psilocybe cubensis* utilizada para la liofilización fue producida en el experimento anterior. Se utilizaron 20 tubos de ensayo roscables de 10ml que se inocularon con la cepa puras de *Psilocybe cubensis*.

Liofilización: Se utilizó el equipo “VirTis wizard 2.0”, para el Tratamiento térmico (thermal treatment) y secado primario (primary drying) se siguieron los pasos que se los describen a continuación:

Tabla 5.*Tratamiento térmico (Thermal treatment).*

	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
Paso 1	15	120
Paso 2	0	120
Paso 3	-10	120
Paso 4	-15	120
Paso 5	-20	120
Paso 6	-30	120
Paso 7	-40	120

La tabla muestra los pasos que se siguieron para realizar el tratamiento térmico. Fuente: Autora

Tabla 6.*Secado primario (Primary drying).*

	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Vacío (atm)
Paso 1	-40	120	300
Paso 2	-30	120	300
Paso 3	-20	120	300
Paso 4	-10	120	300
Paso 5	0	120	300
Paso 6	10	120	300
Paso 7	20	120	300
Paso 8	30	120	300
Paso 9	40	120	300

La tabla muestra los pasos que se siguieron para realizar el secado primario. Fuente: Autora

Las cepas puras liofilizadas fueron trasladadas al banco de recursos genéticos del Centro Ecuatoriano de biotecnología y ambiente – CEBA.

Recuperación de cultivos liofilizados: La metodología utilizada es la recomendada por Escandino (2017) de la Colección Española de Cultivos Tipo; los tubos que contienen el cultivo liofilizado deben estar conservados a temperatura controlada y protegidos de la luz. Se utilizaron los siguientes materiales básicos: cámara de flujo laminar, medio de

cultivo Agar Extracto de Malta (MEA), pipetas Pasteur estériles, pipetero, recipiente con alcohol, agua estéril, pinzas metálicas.

Procedimiento: Se saca el tapón de algodón, se carga una pipeta Pasteur estéril con el medio de cultivo, el volumen para rehidratar el cultivo será 0,2 – 0,3 ml del medio líquido estéril. Resuspender cuidadosamente el cultivo liofilizado introduciendo el medio líquido, aspirando y expulsando varias veces la suspensión de células con la pipeta evitando la formación de burbujas, dejar la suspensión durante 20 o 30 minutos hasta conseguir una rehidratación completa. La suspensión conseguida se utiliza para inocular un medio de sólido (tubo con agar inclinado o placa petri), hay que utilizar todo el volumen ya que no se recomienda guardar parte de la suspensión. Por último hay que incubar los medios de cultivos inoculados en la temperatura y condiciones recomendadas (Escandino, 2017).

Tratamiento térmico (Thermal treatment). Para realizar el tratamiento térmico se siguieron siete pasos que se describen a continuación:

Se inició con una temperatura a 15 °C por 120 min, luego a 0 °C por 120 min y progresivamente se disminuye la temperatura hasta llegar a -40 °C todo el proceso transcurrió en 14 horas.

Secado primario (Primary drying), se inició en -40 °C por 120 min a 300 atm, aumentando la temperatura 10 °C cada 120 min, con el vacío de 300 atm constante hasta llegar a los 40 °C, este proceso tomó 18 horas en total.

El control del equipo “VirTis wizard 2.0” es computarizado en el software del liofilizador al que se le designó con el nombre de RECETA PRINC.rcw para realizar todo el proceso automatizado.

En la figura 22, el equipo liofilizador “VirTis wizard 2.0” utilizado para el proceso de liofilización.



Figura 22. Equipo liofilizador “VirTis wizard 2.0”

En la figura 23, se muestran los tubos inoculados con *Psilocybe cubensis*, que se utilizaron para la liofilización.



*Figura 23. Se presenta los tubos con cultivo de *Psilocybe cubensis* para ser liofilizados.*

3.3. Resultados

Liofilización y recuperación de cultivos liofilizados. Se obtuvieron 5 tubos con cepas viables de *Psilocybe cubensis* utilizando la metodología propuesta por la Colección Española de Cultivos Tipo.

3.3.1. Discusión

Dentro de los métodos más empleados para la conservación de microorganismos, La liofilización es uno de los más importantes y de mayor renombre, debido a sus numerosas ventajas, entre las que se pueden resaltar el mantenimiento de la viabilidad a largo plazo; en el presente estudio se empleó un protocolo alternativo para la conservación de *Psilocybe cubensis* utilizando el equipo “VirTis wizard 2.0”, siguiendo las técnicas de liofilización; comparable con lo realizado del Puerto en el año 2009, sin embargo, se aplicó un tratamiento térmico y de secado primario, con un vacío de 300 atm durante 32 horas a una temperatura que oscila entre los -40 °C y 40 °C obteniendo así cepas viables de *Psilocybe cubensis*.

Es aconsejable en protocolos de conservación de microorganismos como el *Psilocybe cubensis*, por su comodidad para el almacenamiento y para el envío de las cepas, las técnicas de conservación por liofilización pues una vez conseguidos los liófilos pueden almacenarse a temperatura ambiente entre 18 °C a 20 °C, según lo reporta del Puerto, en el año 2009. Según los resultados obtenidos en el presente estudio se recomienda, además, conservar cepas de *Psilocybe cubensis* por liofilización, ya que con el protocolo propuesto se obtienen cepas viables durante un tiempo prolongado, resultado que no se ha reportado en la literatura.

3.4. Determinación de la velocidad de crecimiento de la cepa de *Psilocybe cubensis*.

Para este experimento se planteó como objetivo seleccionar el mejor medio de cultivo para la producción de *Psilocybe cubensis*, a través de la velocidad de crecimiento lineal. Se utilizó la metodología propuesta por Pineda, Ramos, Soto, Freitas, & Pereira, 2015.

3.4.1. Materiales y métodos

Cepa: Se utilizó la cepa de *Psilocybe cubensis*, del banco de recursos genéticos microbianos del CEBA la cual fue liofilizada en el experimento anterior y codificada cómo CEBA-SPE-PC-200317.

Equipos: Se empleó una cámara de flujo laminar diseñada por el CEBA a partir de un filtro HEPA (High Efficiency Particulate Air) H14 EN-1822-1 y una incubadora Hova-Bator GQF, modelo 1602N.

Diseño experimental: La experimentación se planificó con un diseño completamente al azar (DCA) con 10 réplicas en un solo bloque. El factor de estudio fue el medio de cultivo Agar de papa y dextrosa (PDA) y Agar de extracto de malta (MEA), como variable de respuesta se estableció la velocidad de crecimiento lineal de la cepa liofilizada. Los parámetros de operación como la temperatura y el tiempo se mantuvieron constantes a 22°C y seis días respectivamente, como factor de ruido se identificó el nivel de luz. Se plantearon las siguiente hipótesis: Nula (H0): $\mu_{PDA} = \mu_{MEA}$ y Alternativa: $\mu_{PDA} \neq \mu_{MEA}$

3.4.2. Resultados

En la tabla 7 se presentan los resultados experimentales sobre el crecimiento promedio medido en mm, a partir del cual se calcula la velocidad de crecimiento, a través de la siguiente fórmula:

$$\mu = \frac{e}{t}$$

Donde:

μ = velocidad de crecimiento

e = espacio

t = tiempo

Tabla 7.*Datos de la velocidad de crecimiento en dos medios de cultivo.*

Nro.	Bloque	Medio	Crecimiento radial promedio (mm)	Velocidad (mm/día)
1	1	PDA	13	2,21
2	1	MEA	17	2,85
3	1	PDA	13	2,2
4	1	MEA	16	2,7
5	1	PDA	12	2
6	1	PDA	13	2,1
7	1	PDA	13	2,2
8	1	MEA	17	2,8
9	1	MEA	17	2,75
10	1	MEA	17	2,85

Resumen Estadístico para Velocidad

La tabla 8 muestra diferentes estadísticos de velocidad para cada uno de los dos niveles de medio. La intención principal del análisis de varianza de un factor es la de comparar las medias de los diferentes niveles enlistados aquí bajo la columna de promedio.

Tabla 8.*Resumen Estadístico para Velocidad*

Medio	Curtosis Estandarizada
MEA	-0,68
PDA	0,09
Total	-1,44

Medio	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango	Sesgo Estandarizado
MEA	5	2,79	0,07	2,34%	2,7	2,85	0,15	-0,49
PDA	5	2,14	0,09	4,26%	2	2,21	0,21	-1,12
Total	10	2,47	0,35	14,18%	2	2,85	0,85	-0,08

Análisis de varianza (ANOVA)

La tabla 9 presenta el análisis de varianza para la velocidad de crecimiento por medio de cultivo, como se observa la tabla ANOVA descompone la varianza de Velocidad en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de grupos. La razón -F, que en este caso es igual a 167.03, es el cociente entre el estimado entre grupos y el estimado dentro de grupos. Puesto que el valor -P de la prueba -F es menor que 0,05; existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Velocidad, entre un nivel de Medio y otro, con un nivel del 95,0% de confianza. Se requiere de precisión para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras por lo que se seleccionó Pruebas de Múltiples Rangos para realizar el análisis.

Tabla 9.*ANOVA para Velocidad por Medio*

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1,05	1	1,05	167,03	0,00
Intra grupos	0,05	8	0,01		
Total (Corr.)	1,10	9			

Tabla de medias

En la tabla 10 se presenta la tabla de medias, esta tabla muestra la media de Velocidad para cada nivel de Medio. También muestra el error estándar de cada media, el cual es una medida de la variabilidad de su muestreo. El error estándar es el resultado de dividir la desviación estándar mancomunada entre el número de observaciones en cada nivel. La tabla también muestra un intervalo alrededor de cada media. Los intervalos mostrados actualmente están basados en el procedimiento de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Están contruidos de tal manera que, si dos medias son iguales, sus intervalos se traslaparán un 95,0% de las veces.

Tabla 10.*Medias para Velocidad por Medio con intervalos de confianza del 95,0%.*

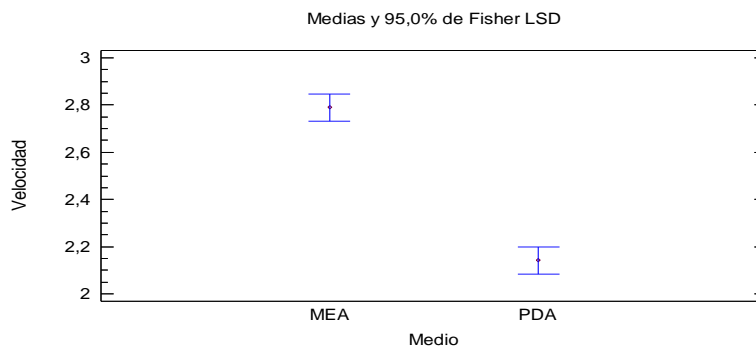
Medio	Casos	Media	Error Est. (s agrupada)	Límite Inferior	Límite Superior
MEA	5	2,79	0,04	2,73	2,85
PDA	5	2,14	0,04	2,08	2,20
Total	10	2,47			

Gráfico de medias

En la figura 24, se presenta el gráfico de medias. Como se observa no existe solapamiento entre los intervalos de las medias por lo que se concluye que existe diferencia significativa para la velocidad de crecimiento y los dos medios de cultivos.

Figura 24.

Gráfico de medias para velocidad



Prueba de múltiples rangos para velocidad por medio (Método: 95,0 porcentajes LSD).

En la tabla 11 se presenta la prueba de rangos múltiples, la misma aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. Se ha colocado un asterisco junto a un par, indicando que este par muestra diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado dos grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

Tabla 11.

Pruebas de Múltiple Rangos para Velocidad por Medio, Método: 95,0 porcentajes LSD.

Medio	Casos	Media	Grupos Homogéneos
PDA	5	2,14	X
MEA	5	2,79	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
MEA -PDA	*	0,65	0,12

*indica una diferencia significativa

En la figura 25 se presenta la técnica de medición de la velocidad de crecimiento de *Psilocybe cubensis*, la cual fue realizada utilizando una cinta métrica.

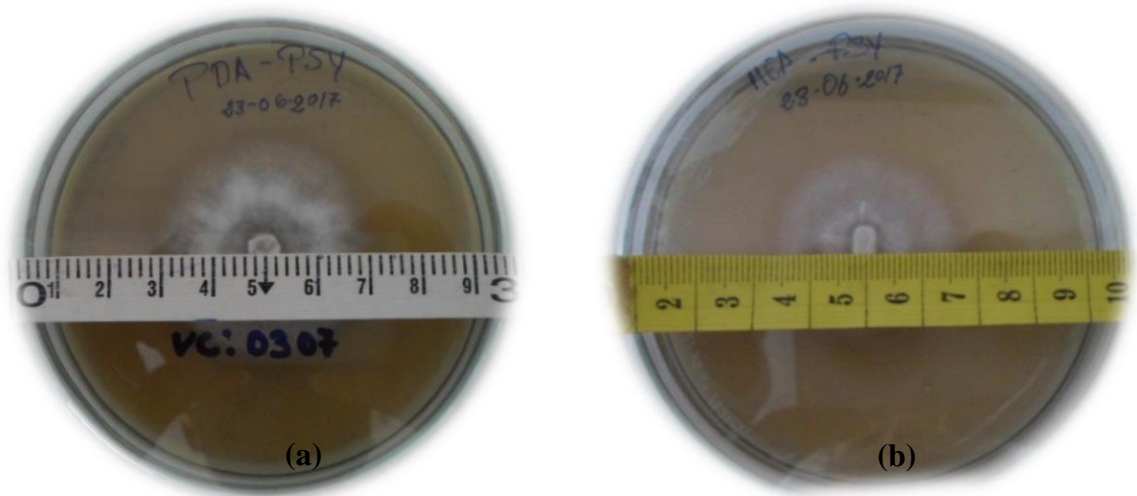


Figura 25. Medición de la velocidad de crecimiento de Psilocybe cubensis. (a) En sustrato PDA y (b) en sustrato MEA.

3.4.3. Discusión

Para la medición de la velocidad de crecimiento de la cepa de *Psilocybe cubensis*, en el presente estudio se utilizó la metodología publicada por Pineda et al., en el año 2015 donde realizando la medición del diámetro de las colonias en la placa, y dividiéndolo por el tiempo de cultivo, se obtuvieron resultados óptimos y obtener el mejor medio de cultivo para el desarrollo de las cepas. Así mismo, esta metodología ha sido utilizada también en la medición de crecimiento lineal de *Pleurotus ostreatus*, como lo reportan Pineda, en un estudio similar en el año 2014.

Es correcto afirmar que los medios de colonización normalmente afectarán a la morfología, crecimiento y color de las colonias, tanto si se forman estructuras particulares o no, y pueden determinar, incluso, si el hongo crecerá o no.

Por otra parte, para el experimento presentado se obtuvo 2.79 mm/día de crecimiento lineal en el agar MEA obteniendo mayor crecimiento que en el agar PDA (2.14 mm/día), esto probablemente se debe a que el hongo *Psilocybe cubensis* logra asimilar de mejor manera el Agar extracto de malta (MEA) por su composición basada en un azúcar, a diferencia del Agar dextrosa papa que se constituye básicamente de almidón y puede presentar variaciones nutricionales para el crecimiento de algunas cepas.

Según Anan Thawthong, en el año 2014, el mejor medio de cultivo ampliamente utilizado para el cultivo de hongos es el Agar de Dextrosa de Patata (PDA) por su buen crecimiento, este resultado se puede contradecir de acuerdo a lo encontrado en el presente estudio donde el mayor crecimiento fue observado en el Agar extracto de malta (MEA).

Sin embargo, también reportan que en los otros medios de colonización también se puede obtener crecimiento óptimo como: El agar de sacarosa de papa (PSA), el agar de levadura de dextrosa de patata (PDYA), el agar de extracto de malta (MEA), el agar de malta de

levadura (YMA) y Mulasaki y Skoog (MS), medios que también se usan para cultivar setas según Anan Thawthong.

3.5. Catálogo de cepas puras de *Psilocybe spp.*

El objetivo de este punto de la investigación fue crear una herramienta que brinde a estudiantes e investigadores un fácil manejo de cepas nativas, puesto que contiene información específica para el uso de estas.

3.5.1. Uso de catálogo

La información de las cepas contiene: el nombre científico, el código asignado, lugar de procedencia, medio de cultivo, temperatura de crecimiento y conservación de la cepa de *Psilocybe cubensis* aislada en el laboratorio del CEBA. Además, se presenta otras cepas del género *Psilocybe* identificadas por Paul Stamets.

3.5.2. Medios de cultivos

- Agar nutriente (AN)
- Glucosa, peptona y extracto de levadura (YPG)
- Papa Dextrosa Agar (PDA)
- Czapek Agar Dox
- Sabouraud Maltosa Agar (SMA)
- Czapek concentrado
- Czapek Extracto de Levadura Agar (CYA)
- Extracto de Malta Agar (MEA)
- 25 % Glycerol Nitrato Agar (G25N)
- Czapek Extracto de Levadura Agar con 20 % Sacarosa (CY20S)
- MRS líquido
- MRS sólido

- Medio B
- Tomado de (ICIDCA, 2003)

3.5.3. Medios y condiciones de cultivo de *Psilocybe cubensis* CEBA-SPE-PC-200317

Medio de cultivo

- Agar Extracto de Malta (MEA)
- Agar Papa Dextrosa (PDA)

Temperaturas de crecimiento

- *Psilocybe cubensis*: 24 - 25°C

Tiempo de incubación

- Siete días

Conservación

- Por liofilización

3.5.4. Fórmula medio de cultivo

Agar Papa Dextrosa (PDA)

- | | |
|---------------------|-----------|
| • Papa deshidratada | 250.0 g |
| • Glucosa | 20.0 g |
| • Agar | 15.0 g |
| • Agua destilada | 1000.0 mL |

Agar Extracto de Malta (MEA)

- Extracto de malta en polvo 20.0 g
- Peptona 1.0 g
- Glucosa 20.0 g
- Agar 20.0 g
- Agua destilada 750.0 mL

3.5.5. Suministro de cultivos

En el presente catálogo se presenta una cepa nativa aislada en el laboratorio del CEBA. El objetivo es que dicho material se encuentre, a futuro, a disposición de aquellos que trabajen en investigación (medicina y afines en el caso de *Psilocybe cubensis*), producción con fines medicinales y que asuman la responsabilidad sobre el manejo y uso de la cepa.

Las cepas deberán estar debidamente selladas y etiquetadas con la información necesaria acerca de las condiciones de crecimiento, almacenamiento, manipulación de la misma y forma de recuperación del cultivo liofilizado (ICIDCA, 2003).

3.5.6. Conservación de los cultivos

Por el método de liofilización empleando el equipo “VirTis wizard 2.0”.

3.5.7. Identificación

Identificación molecular de microorganismos y la base de datos del GenBank en el laboratorio especializado IDgen.

3.5.8. Depósito de cultivos

Se debe presentar una solicitud por escrito con toda la información del cultivo para su posterior aprobación una vez que se realicen los estudios necesarios.

3.5.9. Precios de cepas y otros servicios

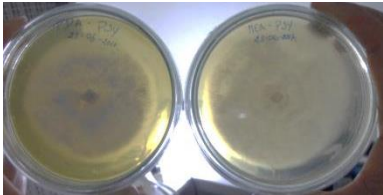



- Con fines investigativos: \$40 USD
- Para la Industria: NO DISPONIBLE
- Con fines docentes: \$60 USD






3.5.10. Listado de *Psilocybe* disponibles

En la tabla 12, se presenta un listado de hongos del género *Psilocybe*, incluido el aislado en el presente trabajo de investigación. Esta tabla servirá como modelo para el catálogo.

Tabla 12.

Listado de cepas de Psilocybe.

Especie	Código	Medio de Cultivo	Foto	Fuente
<i>Psilocybe cubensis</i>	CEBA-SPE-PC-200317	PDA, MEA		Autora
<i>Figura 26. Cultivo de Psilocybe cubensis en MEA y PDA.</i>				
<i>Psilocybe azurescens</i>	X	PDA, MEA		Paul Stamets
<i>Figura 27. Carpóforos de P. azurescens</i>				
<i>Psilocybe baeocystis</i>	X	PDA, MEA		Paul Stamets
<i>Figura 28. Carpóforos de P. baeocystis</i>				
<i>Psilocybe cyanescens</i>	X	PDA, MEA		Paul Stamets
<i>Figura 29. Carpóforos de P. cyanescens</i>				

<p><i>Psilocybe pelliculosa</i></p>	<p>X</p>	<p>PDA, MEA</p>	 <p>Paul Stamets</p>
<p>Figura 30. Carpóforos de <i>P. pelliculosa</i></p>			
<p><i>Psilocybe semilanceata</i></p>	<p>X</p>	<p>PDA, MEA</p>	 <p>Paul Stamets</p>
<p>Figura 31. Carpóforos de <i>P. semilanceata</i></p>			
<p><i>Psilocybe sylvatica</i></p>	<p>X</p>	<p>PDA, MEA</p>	 <p>Paul Stamets</p>
<p>Figura 32. Carpóforos de <i>P. sylvatica</i></p>			
<p><i>Psilocybe stuntzii</i></p>	<p>X</p>	<p>PDA, MEA</p>	 <p>Paul Stamets</p>
<p>Figura 33. Carpóforos de <i>P. stuntzii</i></p>			
<p><i>Psilocybe weilii</i></p>	<p>X</p>	<p>PDA, MEA</p>	 <p>Paul Stamets</p>
<p>Figura 34. Carpóforos de <i>P. weilii</i></p>			

3.5.11. Descripción de las cepas

Psilocybe cubensis

CEBA-SPE-PC-200317. Procedente del Centro de Ecuatoriano de Biotecnología y Ambiente (CEBA) Ibarra - Ecuador.

- Medio de cultivo de crecimiento: 3, 8
- Temperatura incubación: 25 °C
- Medio de cultivo de mantenimiento y conservación: 3, 8
- Temperatura de mantenimiento y conservación: 4-8 °C
- Medio en el que obtiene mejor velocidad de crecimiento lineal: 8

3.5.12. Recuperación de cultivos liofilizados

Se recomienda aplicar la metodología de la Colección Española de Cultivos Tipo (Escandino, 2017).

3.5.13. Ficha de depósito de la cepa

BANCO DE RECURSOS GENÉTICOS MICROBIANOS (BRGM)			FECHA DE INGRESO		
FICHA DE CONTROL DE MICROORGANISMOS DEPOSITADOS			CÓDIGO ASIGANDO		
INFORMACIÓN DEL MICROORGANISMO		 AISLAMIENTO			
Nombre del cultivo:		¿El microorganismo se receptó aislado?	SI		
Sinónimos:			NO		
Nombre común:		Fecha de aislamiento:			
Código de la cepa:		Responsable del aislamiento:			
Tipo de microorganismo:		Método de aislamiento:			
Cantidad/tipo de unidad:		IDENTIFICACIÓN			
Lugar de procedencia:		Responsable de la identificación:			
Fecha de recolección:		CONSERVACIÓN			
Sustrato del cual se recolectó:		Medio de conservación:			
Características morfológicas del microorganismo:		Temperatura de conservación:			
		Otra información:			
Tipo de requerimiento:	Aislamiento	Almacenamiento/ Reserva	Repique	Activación del cultivo	Otros*
* Especificar:					
Propósito del requerimiento:	Almacenamiento	Investigación	Comercial	Colección	Otros*
* Especificar:					
Nombre/Institución depositante:					
Fecha de solicitud:					
REVISÓ		AUTORIZÓ Y APROBÓ			

Figura 35. Formato de ficha de ingreso del microorganismo al BRGM (propuesta).

CAPITULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- Lograr el aislamiento de las cepas de hongos como los pertenecientes al género *Psilocybe spp*, utilizando el método de aislamiento a partir del cuerpo fructífero del mismo permite obtener mayor pureza de las cepas.
- La liofilización es uno de los métodos más empleados para la conservación de microorganismos debido a sus numerosas ventajas, entre las que podemos resaltar el mantenimiento de la viabilidad a largo plazo.
- La comparación de caracteres morfológicos con claves taxonómicas y la búsqueda en la base de datos de la secuencia de ADN obtenida, son dos herramientas muy importantes y específicas que permitieron identificar a la muestra analizada como *Psilocybe cubensis*.
- Se determinó que el mejor medio de cultivo para activar cepas liofilizadas de *Psilocybe cubensis* es el Agar Extracto de Malta (MEA) ya que el micelio del hongo presenta la mayor velocidad de crecimiento lineal.
- Se obtuvo información específica como lugares de recolección, medios de cultivos idóneos para el desarrollo de la cepa, temperatura y humedad, que permitieron establecer un protocolo para aislar, identificar y caracterizar la cepa nativa *Psilocybe cubensis*. Gracias a esto diseñar un catálogo de la cepa nativa *Psilocybe cubensis* y otras correspondientes al mismo género; este representa una herramienta para la ilustración y capacitación de la sociedad.

4.2. Recomendaciones

- Se recomienda ampliar la investigación con el fin de identificar más cepas de *Psilocybe spp.*, en otros sectores del país y con esto enriquecer el banco de recursos genéticos nativos ecuatorianos.
- Ampliar los protocolos estableciendo estudios que permitan probar otros medios de cultivo y nuevas técnicas de recuperación de cultivo (como estimulación eléctrica de alto voltaje) para incrementar la velocidad de crecimiento y producción de *Psilocybe cubensis*, y de más cepas de hongos.
- Realizar estudios sobre el efecto psicofármaco de *Psilocybe spp.* como terapia alternativa a la dependencia de drogas en el país y el mundo.

Referencias Bibliográficas

- Acosta-Urdapilleta, M. de L., & Medrano-Vega, F. A. (2006). Evaluación de material biológico perteneciente al cepario de hongos del laboratorio de micología del Centro de Investigaciones de la UAEM. En *V Congreso Internacional y XI Congreso Nacional de Ciencias Ambientales* (p. 10). Morelos: Red de Ciencias Ambientales. Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMéx).
- Andersson, C., Kristinsson, J., & Gry, J. (2009). *Occurrence and Use of Hallucinogenic Mushrooms Containing Psilocybin Alkaloids*. Copenhagen, Dinmark: Nordic Council of Ministers. Recuperado a partir de [https://books.google.com.co/books?id=QlqFzMNssSAC&pg=PA53&lpg=PA53&dq=Psilocybe+production&source=bl&ots=Qtk_5wZhlj&sig=YSUJGudl078MtXg3HIApaDnH6Ec&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjSi9PktoLQAhUC5CYKHSigD7Q4ChDoAQhKMAo#v=onepage&q=Psilocybe production&f=false](https://books.google.com.co/books?id=QlqFzMNssSAC&pg=PA53&lpg=PA53&dq=Psilocybe+production&source=bl&ots=Qtk_5wZhlj&sig=YSUJGudl078MtXg3HIApaDnH6Ec&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjSi9PktoLQAhUC5CYKHSigD7Q4ChDoAQhKMAo#v=onepage&q=Psilocybe%20production&f=false)
- Asselborn, G., Wenning, R., & Yegles, M. (2000). Tragic flying attempt under the influence of “Magic Mushrooms”. *Probl Forensic Sci.*, 42(1), 41–46.
- Badham, E. R. (1982). Tropisms in the Mushroom *Psilocybe cubensis*. *Mycologia*, 74(2), 275–279. <http://doi.org/10.2307/3792895>
- Beug, M. W., & Bigwood, J. (1981). Quantitative analysis of psilocybin and psilocin and *Psilocybe baecystis* (singer and smith) by high-performance liquid chromatography and by thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A*, 207(3), 379–385. [http://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)88741-5](http://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)88741-5)
- Beug, M. W., Shaw, M., & Cochran, K. W. (2006). Thirty-Plus Years of Mushroom Poisoning: Summary of the Approximately 2 , 000 Reports in the NAMA Case Registry. *MCIlvainea*, 16(2), 47–68.
- Bogenschutz, M. P., Forcehimes, A. A., Pommy, J. A., Wilcox, C. E., Barbosa, P., & Strassman, R. J. (2015). Psilocybin-assisted treatment for alcohol dependence: A proof-of-concept study. *Journal of Psychopharmacology*, 29(3), 289–299. <http://doi.org/10.1177/0269881114565144>

- Borovička, J., Oborník, M., Stříbrný, J., Noordeloos, M. E., Sánchez, L. A. P., & Gryndler, M. (2015). Phylogenetic and chemical studies in the potential psychotropic species complex of *Psilocybe atrobrunnea* with taxonomic and nomenclatural notes. *Persoonia*, (34), 1–9. <http://doi.org/10.3767/003158515X685283>
- Bozal, I. S. (2013). Hongos visionarios en la península ibérica. En J. C. Bouso (Ed.), *Psilocibes* (1ª ed., pp. 149–170). Barcelona: The mushrooms.
- Casale, J. (1985). An Aqueous-Organic Extraction Method for the Isolation and Identification of Psilocin from Hallucinogenic Mushrooms. *J. Forens. Sci.*, 30(1), 247–250. Recuperado a partir de <https://erowid.org/archive/rhodium/chemistry/psilocin.extraction.html>
- Catafolmo, P., & Tyler, V. E. (1964). The production of psilocybin in submerged culture by *Psilocybe cubensis*. *Lloydia*, 27, 53–63.
- Chang, S.-T., & Miles, P. G. (2004). *Mushrooms: Cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact* (2ª ed.). Florida: CRC Press.
- Christiansen, A. L., & Rasmussen, K. E. (1982). Analysis of indole alkaloids in Norwegian *Psilocybe semilanceata* using high-performance liquid chromatography and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 244(2), 357–364. [http://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)85700-3](http://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)85700-3)
- Cole, M. D. (2003). The analysis of psilocybin and psilocin from fungi. En *The Analysis of Controlled Substances* (pp. 127–137). Great Britain: John Wiley and Sons. Recuperado a partir de <https://books.google.com.co/books?id=abw93p3C8NEC&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false>
- Consejo Nacional de Salud [CNS]. (2007). *Política de Medicamentos*. Quito. Recuperado a partir de <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s19794es/s19794es.pdf?ua=1>
- del Puerto, C. A., Iglesias, E., Morales, T., Baños, N., Nocedo, M. D., Carnota, G., & Martínez, R. (2009). Organización y manejo de la colección de cepas de referencia del Instituto Finlay. *Vaccinmonitor*, 18, 20-24.

- dos Santos, R. G., Osorio, F. L., Crippa, J. A. S., Riba, J., Zuardi, A. W., & Hallak, J. E. C. (2016). Antidepressive, anxiolytic, and antiaddictive effects of ayahuasca, psilocybin and lysergic acid diethylamide (LSD): a systematic review of clinical trials published in the last 25 years: antidepressive effects of ayahuasca, psilocybin and LSD. *Therapeutic Advances in Psychopharmacology*, (September), 2045125316638008–. <http://doi.org/10.1177/2045125316638008>
- European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. (2015). Hallucinogenic mushrooms drug profile. Recuperado a partir de <http://www.emcdda.europa.eu/publications/drug-profiles/mushrooms>
- FAO (2018). Recuperado de <http://www.fao.org/docrep/field/003/AB489S/AB489S03.htm>.
- Freire Fierro, A. (2004). *Botánica Sistemática Ecuatoriana*. St. Louis: Missouri Botanical Garden Press ix.
- Gabriel, J., Švec, K., Koliňová, D., Tlustoš, P., & Száková, J. (2016). Translocation of mercury from substrate to fruit bodies of *Panellus stipticus*, *Psilocybe cubensis*, *Schizophyllum commune* and *Stropharia rugosoannulata* on oat flakes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 125, 184–189. <http://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.12.009>
- Gambaro, V., Roda, G., Visconti, G. L., Arnoldi, S., Casagni, E., Dell'Acqua, L., ... Mora, D. (2016). DNA-based taxonomic identification of basidiospores in hallucinogenic mushrooms cultivated in “grow-kits” seized by the police: LC-UV quantitative determination of psilocybin and psilocin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 125, 427–432. <http://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.03.043>
- Gartz, J. (1989). Biotransformation of tryptamine derivatives in mycelial cultures of *Psilocybe*. *Journal of Basic Microbiology*, 29(6), 347–352. <http://doi.org/10.1002/jobm.3620290608>
- Gartz, J. (1992). New aspects of the occurrence, chemistry and cultivation of European hallucinogenic mushrooms. *Annali dei Musei Civici di Rovereto*, 8, 107–124.
- Gartz, J., Allen, J. W., & Merlin, M. D. (1994). Ethnomycology, biochemistry, and

- cultivation of *Psilocybe samuiensis* Guzmán, Bandala and Allen, a new psychoactive fungus from Koh Samui, Thailand. *Journal of Ethnopharmacology*, 43(2), 73–80. [http://doi.org/10.1016/0378-8741\(94\)90006-X](http://doi.org/10.1016/0378-8741(94)90006-X)
- Gartz, J., & Moller, G. K. (1989). Analysis and Cultivation of Fruit Bodies and Mycelia of *Psilocybe bohemica*. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*, 184(3-4), 337–341. [http://doi.org/10.1016/S0015-3796\(89\)80023-X](http://doi.org/10.1016/S0015-3796(89)80023-X)
- Gainza, I., Nogué, S., Velasco, C. M., Hoffman, R. S., Burillo-Putze, G., Dueñas, A., . . . Pinillos, M. A. (2003). Intoxicación por drogas. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 26.
- Gilmore, K. A. (1926). Culture Studies of *Psilocybe coprophila*. *Chicago Journals*, 81(4), 419–433.
- Gottlieb, A. (1976). *The psilocybin producers guide*.
- Grob, C. S., Danforth, A. L., Chopra, G. S., Hagerty, M., McKay, C. R., Halberstadt, A. L., & Greer, G. R. (2011). Pilot study of psilocybin treatment for anxiety in patients with advanced-stage cancer. *Archives of General Psychiatry*, 68(1), 71–78. <http://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2010.116>
- Guzmán, G., Guillén, F. R., Hyde, K. D., & Karunarathna, S. C. (2012). *Psilocybe s.s.* in Thailand: four new species and a review of previously recorded species. *Mycotaxon*, 119(1), 65–81. <http://doi.org/10.5248/119.65>
- Guzmán, G., & Kasuya, T. (2004). The known species of *Psilocybe* (Basidiomycotina, Agaricales, Strophariaceae) in Nepal. *Mycoscience*, 45(4), 295–297. <http://doi.org/10.1007/s10267-004-0186-8>
- Haard, R., & Haard, K. (1975). *Poisonous & hallucinogenic mushrooms*. Washington D. C.: Cloudburst Press.
- Halberstadt, A. L. (2015). Recent advances in the neuropsychopharmacology of serotonergic hallucinogens. *Behavioural Brain Research*, 277, 99–120. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.07.016>
- Hasler, F., Grimberg, U., Benz, M. A., Huber, T., & Vollenweider, F. X. (2004). Acute psychological and physiological affects of psilocybin in healthy humans: A

- double-blind, placebo-controlled dose-effect study. *Psychopharmacology*, 172(2), 145–156. <http://doi.org/10.1007/s00213-003-1640-6>
- Hawksworth, D. L. (1991). The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research*, 95(6), 641–655. [http://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80810-1](http://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80810-1)
- Hawksworth, D. L. (2001). The magnitude of fungal diversity: the 1· 5 million species estimate revisited. *Mycological research*, 105(12), 1422–1432. <http://doi.org/10.1017/S0953756201004725>
- Heim, R., & Wasson, R. G. (1958). *Les champignons hallucinogenes du mexique*. Paris: Muséum national d` histoire naturelle.
- Helbling, A., Horner, W. E., & Lehrer, S. B. (1993). Comparison of *Psilocybe cubensis* spore and mycelium allergens. *J Allergy Clin Immunol*, 9(5), 1059–1066. [http://doi.org/10.1016/0091-6749\(93\)90220-A](http://doi.org/10.1016/0091-6749(93)90220-A)
- Hernandez, E., Ortiz, R., Pez, F. L., Maso, F., & Zenteno, E. (1993). Purification and characterization of a galactose-specific lectin from *Psilocybe barrerae*. *Phytochemistry*, 32(5), 1209–1211.
- Hernández, H. (2007). *Macromicetos de una región de Mineral del Chico, Hidalgo: una aproximación a la etnomicología*. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- Hofmann, A., Heim, R., Brack, A., & Kobel, H. (1958). Psilocybin, ein psychotroper Wirkstoff aus dem mexikanischen Rauschpilz *Psilocybe mexicana* Heim. *Experientia*, 14(3), 107–109. <http://doi.org/10.1007/BF02159243>
- Hofmann, A., Heim, R., Brack, A., Kobel, H., Frey, A., Ott, H., ... Troxler, F. (1959). Psilocybin und Psilocin, zwei psychotrope Wirkstoffe aus mexikanischen Rauschpilzen. *Helvetica Chimica Acta*, 42(5), 1557–1572. <http://doi.org/10.1002/hlca.19590420518>
- Horita, a., & Weber, L. J. (1961). The enzymic dephosphorylation and oxidation of psilocybin and psilocin by mammalian tissue homogenates. *Biochemical pharmacology*, 7(1), 47–54. [http://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90124-1](http://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90124-1)
- ICIDCA. (2003). *Catálogo de Cepas Microbianas*. (M. Otero, Ed.). Habana, Cuba.

- IDgen. (2017). *INFORME DE RESULTADOS “Identificación molecular de microorganismos (Extracción de ADN, Amplificación de barcode, secuenciación estándar, ensamblaje de productos de PCR y búsqueda en base de datos).”* QUITO.
- Innervisions. (s. f.). Kit de cultivo de setas “Basic” - Manual. Recuperado 9 de noviembre de 2016, a partir de http://innervisions.nl/wp-content/themes/BLANK-Theme/manuals/grow-kit-basic/Mushroom_Grow_Kit_Basic_download_ES.pdf
- Johnson, M. W., Andrew Sewell, R., & Griffiths, R. R. (2012). Psilocybin dose-dependently causes delayed, transient headaches in healthy volunteers. *Drug and Alcohol Dependence*, *123*(1-3), 132–140. <http://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2011.10.029>
- Johnson, M. W., Garcia-Romeu, A., Cosimano, M. P., & Griffiths, R. R. (2014). Pilot study of the 5-HT_{2A}R agonist psilocybin in the treatment of tobacco addiction. *Journal of psychopharmacology (Oxford, England)*, (September), 0269881114548296–. <http://doi.org/10.1177/0269881114548296>
- Keay, S. M., & Brown, A. E. (1989). Interactions between *Psilocybe semilanceata* and fungi of its habitat. *Mycological Research*, *93*(4), 554–556. [http://doi.org/10.1016/S0953-7562\(89\)80054-1](http://doi.org/10.1016/S0953-7562(89)80054-1)
- Keay, S. M., & Brown, A. E. (1990). Colonization by *Psilocybe semilanceata* of roots of grassland flora. *Mycological Research*, *94*(1), 49–56. [http://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)81263-X](http://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)81263-X)
- Kessler, R. C., Aguilar-gaxiola, S., Alonso, J., Chatterji, S., Lee, S., Ormel, J., ... Wang, P. S. (2009). The global burden of mental disorders: An update from the WHO. World Mental Health (WMH) Surveys. *Epidemiol Psychiatr Soc*, *18*(1), 23–33. <http://doi.org/10.1017/S0033291713001943.Barriers>
- Kohn, R., Levav, I., Miguel, J., Almeida, C. De, Vicente, B., Andrade, L., ... Saxena, S. (2005). Los trastornos mentales en América Latina y el Caribe : asunto prioritario para la salud pública. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health*, *18*(4/5), 229–240.

- Kowalczyk, M., Sekuła, A., Mleczko, P., Olszowy, Z., Kujawa, A., Zubek, S., & Kupiec, T. (2015). Practical aspects of genetic identification of hallucinogenic and other poisonous mushrooms for clinical and forensic purposes. *Croatian medical journal*, *56*(1), 32–40. <http://doi.org/10.3325/cmj.2015.56.32>
- Lee, J. C. I., Cole, M., & Linacre, A. (2000). Identification of members of the genera *Panaeolus* and *Psilocybe* by a DNA test: A preliminary test for hallucinogenic fungi. *Forensic Science International*, *112*(2-3), 123–133. [http://doi.org/10.1016/S0379-0738\(00\)00181-X](http://doi.org/10.1016/S0379-0738(00)00181-X)
- Leung, A. Y., & Paul, A. G. (1966). Baeocystin, a Mono-Methyl Analog of Psilocybin from *Psilocybe baeocystis* saprophytic culture. *Journal of pharmaceutical sciences*, *56*(1), 146. <http://doi.org/10.1002/jps.2600560132>
- Leung, A. Y., Smith, A. H., & Paul, A. G. (1965). Production of psilocybin in *Psilocybe baeocystis* saprophytic culture. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *54*(11), 1576–1579. <http://doi.org/10.1002/jps.2600541104>
- Masiulionis, V. E., Weber, R. W., & Pagnocca, F. C. (2013). Foraging of *Psilocybe basidiocarps* by the leaf-cutting ant *Acromyrmex lobicornis* in Santa Fé, Argentina. *SpringerPlus*, *2*(1), 254. <http://doi.org/10.1186/2193-1801-2-254>
- McPherson, R. (1991). PF - *Psilocybe cubensis* growing techniques.
- Metzner, R. (2005). *Sacred Mushroom of Visions: Teonanácatl: A Sourcebook on the Psilocybin Mushroom* Paperback. Rochester: Inner Traditions/Bear.
- Ministerio de Salud Pública del Ecuador [MSP]. Modelo de Atención de Salud Mental , en el marco del Modelo de Atención Integral de Salud (MAIS) – con enfoque Familiar , Comunitario e Intercultural (2014). Ecuador.
- Ministerio de Salud Pública del Ecuador [MSP]. Política Nacional de Salud Mental 2014-2024 (2014). Ecuador.
- Moreno, F. a, Wiegand, C. B., Taitano, E. K., & Delgado, P. L. (2006). Safety, tolerability, and efficacy of psilocybin in 9 patients with obsessive-compulsive disorder. *The Journal of clinical psychiatry*, *67*(11), 1735–1740. <http://doi.org/10.4088/JCP.v67n1110>

- Moussavi, S., Chatterji, S., Verdes, E., Tandon, A., Patel, V., & Ustun, B. (2007). Depression , chronic diseases , and decrements in health: results from the World Health Surveys. *Lancet*, 9590, 851–858. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61415-9](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61415-9)
- National Center for Biotechnology Information [NCBI]. (2016a). GenBank. *Psilocybe spp.* Recuperado a partir de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gquery/?term=Psilocybe>
- National Center for Biotechnology Information [NCBI]. (2016b). Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, partial [*Psilocybe cubensis*]. Recuperado a partir de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AKF17616.1>
- Nowacka, N., Nowak, R., Drozd, M., Olech, M., Los, R., & Malm, A. (2015). Antibacterial, antiradical potential and phenolic compounds of thirty-one polish mushrooms. *PLoS ONE*, 10(10), 1–13. [tp://doi.org/10.1371/journal.pone.0140355](http://doi.org/10.1371/journal.pone.0140355)
- Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2008). *mhGAP. Programa de Acción para Superar las Brechas en Salud Mental. Mejora y ampliación de la atención de los trastornos mentales , neurológicos y por abuso de sustancias.* OMS.
- Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2012). *Guía de Intervención para los trastornos mentales, neurológicos y por uso de sustancias en el nivel de atención de la salud no especializada* (2ª ed.). Guatemala: OMS.
- Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2013). *Plan de acción sobre salud mental 2013-2020.* Ginebra: OMS. http://doi.org/978_92_4_350602_9
- Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2016a). 10 Datos Curiosos de la salud mental. Recuperado a partir de http://www.who.int/features/factfiles/mental_health/mental_health_facts/es/
- Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2016b). Acceso a la salud. Recuperado a partir de <http://www.who.int/trade/glossary/story002/en/>
- Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2016c). La salud mental y los adultos mayores. Recuperado a partir de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs381/es/>
- Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2016d). Los trastornos mentales afectan a una

- de cada cuatro personas. Recuperado a partir de http://www.who.int/whr/2001/media_centre/press_release/en/
- Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2016e). Median availability of selected generic medicines data by country. Recuperado a partir de <http://apps.who.int/gho/data/node.main.488?lang=en>
- Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2016f). *Transtornos mentales*. Recuperado a partir de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs396/es/>
- Organizacion Panamericana de Salud [OPS]. (2009). *Epidemiología de los trastornos mentales en América Latina y el Caribe*. (J. J. Rodríguez, R. Kohn, & S. Aguilar-Gaxiola, Eds.). Washington D. C.: Organización Panamericana de la Salud.
- Organizacion Panamericana de Salud [OPS]. (2013). *WHO-AIMS: Informe sobre los sistemas de salud mental en America Latina y el Caribe*. Washignton DC: OPS.
- Oss, O. T., & Oeric, O. N. (1991). *Psilocybin: magic mushrooms grower`s guide* (1ª ed.). Oakland, California: Quick American Publishing.
- Patra, S. (2016). Return of the psychedelics: Psilocybin for treatment resistant depression. *Asian Journal of Psychiatry*, 24, 51–52. <http://doi.org/10.1016/j.ajp.2016.08.010>
- Peden, N. R., Pringle, S. D., & Crooks, J. (1982). The problem of psilocybin mushroom abuse. *Human & Experimental Toxicology*, 1(4), 417–424. <http://doi.org/10.1177/096032718200100408>
- Peredy, T., & Bradford, H. (2014). Mushroom, Psilocybin. En P. Wexlerl (Ed.), *Encyclopedia of Toxicology* (Third, Vol. 3, pp. 418–419). Elsevier. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00759-4>
- Psychedelic Times. (2016). The Taxonomy of Magic Mushrooms: A Guide to 4 Psilocybin Mushrooms and Their Varied Effects. Recuperado a partir de <http://psychedelictimes.com/psilocybin-mushrooms/taxonomy-of-magic-mushrooms-a-guide-to-psilocybin-mushrooms-and-their-effects/>
- Pineda, J. (2014). *Desarrollo de una tecnología para la producción a pequeña escala de la biomasa del hongo ostra (Pleurotus ostreatus)*. UNIVERSIDAD DE CAMAGÜEY “IGNACIO AGRAMONTE LOYNAZ.”

- Pineda, J., Ramos, L., Soto, C., Freitas, A., & Pereira, L. (2015). Growth of *Pleurotus ostreatus* on non-supplemented agro-industrial wastes. *Revista Tecnica de La Facultad de Ingenieria Universidad Del Zulia*, 38(1), 41–49. Retrieved from https://www.researchgate.net/profile/Luis_Ramos-Sanchez/publication/283055662_Growth_of_Pleurotus_ostreatus_on_non-supplemented_agroindustrial_wastes/links/562805af08ae04c2aead8298.pdf
- Redhead, S. A., Moncalvo, J.-M., Vilgalys, R., & Matheny, P. B. (2007). (1757) Proposal to conserve the name *Psilocybe* (Basidiomycota) with a conserved type. *Taxon*, 56(February), 255–257.
- Repke, D. B., Leslie, D. T., & Guzman, G. (1976). Baeocystin in *Psilocybe*, *conocybe* and *panaeolus*. *Lloydia*, 40(6), 566–578. Recuperado a partir de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/600026>
- Stafford, P. (2003a). Baeocystis. En *Magic Mushrooms* (pp. 102–104). Oakland, EEUU: Ronin Publishing. Recuperado a partir de [https://books.google.com.co/books?id=3jqdD1cTh4sC&pg=PA102&lpg=PA102&dq=Psilocybe+identification+characteristics&source=bl&ots=Nm-u0pRE8t&sig=V2eBNytFpWygfBV2ZWuJzoHXUVs&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjIwKuJ04TQAhWDKCYKHWZdDoU4ChDoAQgoMAU#v=onepage&q=Psilocybe ide](https://books.google.com.co/books?id=3jqdD1cTh4sC&pg=PA102&lpg=PA102&dq=Psilocybe+identification+characteristics&source=bl&ots=Nm-u0pRE8t&sig=V2eBNytFpWygfBV2ZWuJzoHXUVs&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjIwKuJ04TQAhWDKCYKHWZdDoU4ChDoAQgoMAU#v=onepage&q=Psilocybe%20ide)
- Stafford, P. (2003b). Cubensis. En *Magic Mushrooms* (pp. 85–90). Oakland, EEUU: Ronin Publishing. Recuperado a partir de [https://books.google.com.co/books?id=3jqdD1cTh4sC&pg=PA102&lpg=PA102&dq=Psilocybe+identification+characteristics&source=bl&ots=Nm-u0pRE8t&sig=V2eBNytFpWygfBV2ZWuJzoHXUVs&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjIwKuJ04TQAhWDKCYKHWZdDoU4ChDoAQgoMAU#v=onepage&q=Psilocybe ide](https://books.google.com.co/books?id=3jqdD1cTh4sC&pg=PA102&lpg=PA102&dq=Psilocybe+identification+characteristics&source=bl&ots=Nm-u0pRE8t&sig=V2eBNytFpWygfBV2ZWuJzoHXUVs&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjIwKuJ04TQAhWDKCYKHWZdDoU4ChDoAQgoMAU#v=onepage&q=Psilocybe%20ide)
- Stafford, P. (2003c). *Magic Mushrooms*. Oakland, EEUU: Ronin Publishing. Recuperado a partir de <https://books.google.com.co/books?id=3jqdD1cTh4sC&pg=PA102&lpg=PA102>

&dq=*Psilocybe*+identification+characteristics&source=bl&ots=Nm-
u0pRE8t&sig=V2eBNytFpWygfBV2ZWuJzoHXUVs&hl=es&sa=X&ved=0ahU
KEwjwKuJ04TQAhWDKCYKHWZdDoU4ChDoAQgoMAU#v=onepage&q=
Psilocybe ide

- Stamets, P. (1996). *Psilocybin Mushrooms of the World: An Identification Guide*. Berkeley, California: Ten Speed Press.
- Tittarelli, R., Mannocchi, G., Pantano, F., & Romolo, F. S. (2015). Recreational Use, Analysis and Toxicity of Tryptamines. *Current neuropharmacology*, 13(1), 26–46. <http://doi.org/10.2174/1570159X13666141210222409>
- Tylš, F., Páleníček, T., & Horáček, J. (2014). Psilocybin - Summary of knowledge and new perspectives. *European Neuropsychopharmacology*, 24(3), 342–356. <http://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2013.12.006>
- Vega-Villasante, F., Ruiz-González, L. E., Guerrero-Galván, S. R., & Guzmán-Dávalos, L. (2013). Evaluación de la toxicidad de *Psilocybe cubensis* (Agaricales, Basidiomycota) sobre *Artemia franciscana* (Crustacea, Anostraca). *Revista Iberoamericana de Micología*, 30(1), 54–56. <http://doi.org/10.1016/j.riam.2012.06.001>
- Vollenweider, F. X., Vontobel, P., Hell, D., & Leenders, K. L. (1999). 5-HT modulation of dopamine release in basal ganglia in psilocybin-induced psychosis in Man - A PET study with [11C]raclopride. *Neuropsychopharmacology*, 20(5), 424–433. [http://doi.org/10.1016/S0893-133X\(98\)00108-0](http://doi.org/10.1016/S0893-133X(98)00108-0)
- Watling, R. (1983). Hallucinogenic mushrooms. *Journal of the Forensic Science Society*, 23(1), 53–66. [http://doi.org/10.1016/S0015-7368\(83\)71545-8](http://doi.org/10.1016/S0015-7368(83)71545-8)
- Wesselink, M., van Ark, E. M. and Kuiper, I. (1994). Species identification of 'magic mushrooms'. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/HM035074>
- World Health Organization [WHO]. (2008). *Report on the Mental Health System in Ecuador*. Quito.
- World Health Organization [WHO]. (2011). *The world medicines situation 2011: Medicines prices, availability and affordability*. (A. Cameron, M. Ewen, M.

- Auton, & D. Abegunde, Eds.) (3^a ed.). Geneva: WHO Press.
- World Health Organization [WHO]. (2014a). *Mental health Atlas 2015*. Francia: WHO Press.
- World Health Organization [WHO]. (2014b). *Preventing suicide: a global imperative*. Luxembourg: WHO Press.
- Zhuk, O., Jasicka-Misiak, I., Poliwoda, A., Kazakova, A., Godovan, V. V., Halama, M., & Wiczorek, P. P. (2015). Research on acute toxicity and the behavioral effects of methanolic extract from psilocybin mushrooms and psilocin in mice. *Toxins*, 7(4), 1018–1029. <http://doi.org/10.3390/toxins7041018>.
- Anan Thawthong, S. K., Naritsada Thongklang, Ekachai Chukeatirote, Pattana Kakumyan, Sunita Chamyuang, Leela Maya Rizal, Peter Mortimer, Jianchu Xu, Philippe Callac and Kevin Hyde. (2014). Discovering and Domesticating Wild Tropical Cultivable Mushrooms. Article, 34.

ANEXOS

Anexo 1. Informe N° A-018. Identificación de la muestra aislada.



Av. De los Granados E14-285 y Eloy Alfaro
Teléfono: 0998982450
e-mail: idgen.ecuador@gmail.com
R.U.C. 1713443479001

Informe de Resultados

Nombre del Proyecto: Patricia Rosero- Identificación de basidiomiceto

Informe No.: A-018

Técnico Responsable: Ing. María Alejandra Oviedo

Fecha: 26/04/2017

Resultados.

Muestra	Longitud	% de Calidad	Organismo	Fragmento	% de identidad	NºAccesión
Pb2/Nb2	616	65	<i>Psilocybe cubensis</i>	ITS	99	KU640170.1

Firma autorizada



Av. De los Granados E14-285 y Eloy Alfaro
Teléfono: 0998982450
e-mail: ldgen.ecuador@gmail.com
R.U.C. 1713443479001

Detalle de Resultados

Nombre del Proyecto: Patricia Ortiz-Identificación de basidiomiceto

Técnico Responsable: Ing. María Alejandra Oviedo

Fecha: 26/04/2017

1. **Estudio:** Identificación molecular de microorganismos (Extracción de ADN, Amplificación de barcode, secuenciación estándar, ensamblaje de productos de PCR y búsqueda en base de datos).

Detalles técnicos:

- **Muestras usadas:** Cultivos axénicos de hongos creciendo en agar.
- **Método de determinación:** Identificación molecular por barcoding.
- **Procedimiento:**
 - Los procesos de extracción y amplificación de ADN se describen en el detalle de protocolos.
 - Los productos de PCR fueron depurados previo a su secuenciación. El producto de amplificación limpio y los primers ITS5, ITS4 fueron utilizados para la secuenciación con el método SANGER.
 - Se limpiaron y ensamblaron las secuencias obtenidas con el programa bioinformático GENEIOUS.
 - Se compararon las secuencias ensambladas con la base de datos de nucleótidos de GenBank

Resultados:

Para la extracción de ADN procedente del cultivo se tomó 0.1 gr. de micelio procedente de la caja de la muestra *Psilocybe* (PB2, NB2), adicional se realiza una segunda siembra debido a la presencia otros hongos contaminantes posterior al periodo de incubación.

La extracción de ADN por métodos convencionales para la muestra se realiza de micelio previamente incubado, el ADN obtenido se diluyó hasta una concentración en un rango de 15 a 30ng/uL, previo a su utilización en la PCR. Los resultados de la amplificación pueden observarse en la figura 1.

Se obtuvieron 4 secuencias que fueron ensambladas en GENEIOUS y dieron como resultado una secuencia consenso, utilizada para la búsqueda de BLAST en GenBank. Los resultados de la búsqueda indicaron una identidad del 99% con *Psilocybe cubensis* con número de accesoión [KJ640170.1](#)



Figura 2. Amplicón del fragmento ITS visualizados en un gel de Agarosa 2%. C+: Control positivo, C-: Control negativo, Ladder: Ladder 1Kb.

Conclusiones:

1. Es necesario el uso de tratamientos enzimáticos, adicionales al método convencional de extracción de ADN, para un aumento en la concentración y calidad de ADN del extracto, lo que mejora la eficiencia de la PCR; evidenciándose en la mejora de calidad del amplicón durante el proceso de secuenciación.
2. La búsqueda en la base de datos Genbank, de la secuencia obtenida permitió identificar a la muestra analizada (PB2/NB2) como al basidiomicete *Psilocybe cubensis*.

Anexo 2. Protocolo para la secuenciación de ADN total genómico.



Dirección: Av. De los Granados E14-285 y Eloy Alfaro
Teléfono: 0998982450 e-mail: idgen.ecuador@gmail.com
R.U.C. 1713443479001 web: idgen-ecuador.com

Detalle de protocolos

Proyecto: Secuenciación de ADN total genómico proveniente de tejido fúngico.

Fecha: 25/10/2017

Técnico responsable: Ing. Alexis Vela Arias

Desarrollo:

Diagrama de flujo:

El siguiente diagrama de flujo esta verificado y estandarizado por los responsables técnicos y científicos del laboratorio de diagnóstico e identificación molecular IDgen.

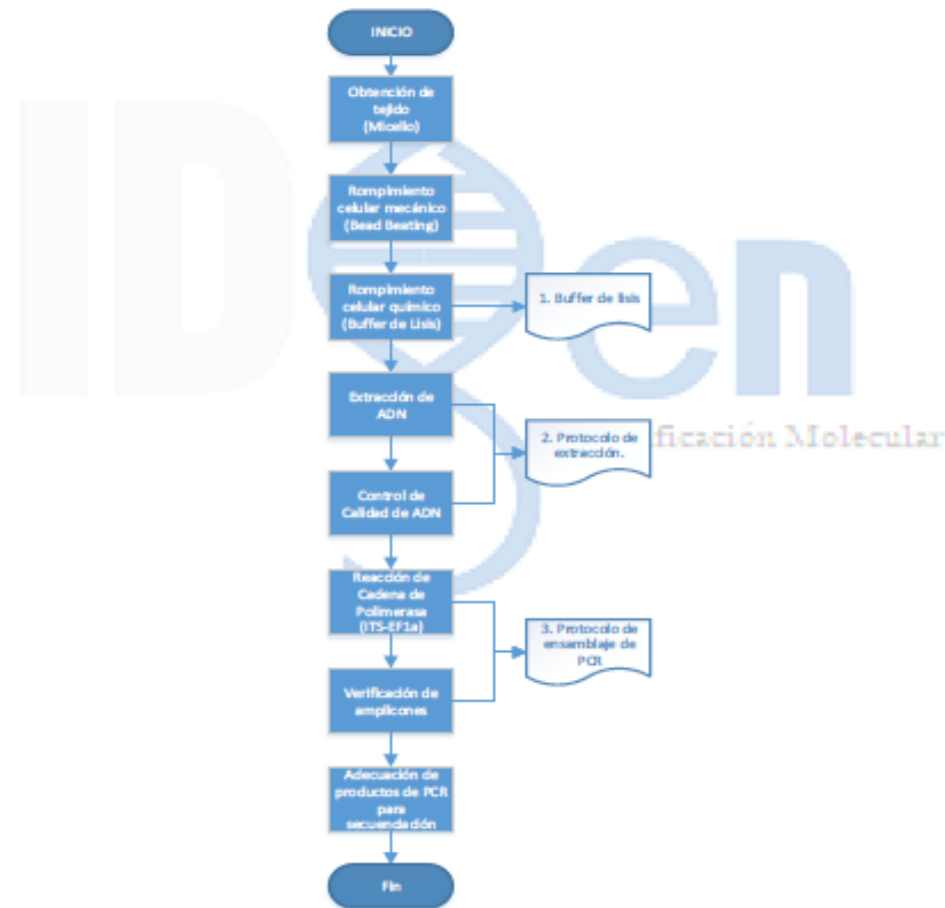


Fig.1: Diagrama de flujo para el proceso de extracción de ADN y secuenciación de los fragmentos ITS – EP1a.

Todos los protocolos detallados en el presente documento fueron desarrollados y probados por el laboratorio IDgen. Este documento es de uso exclusivo para información, se prohíbe su uso para la replicación de protocolos y su reproducción total o parcial.

1. Composición del Buffer de Lisis optimizado para micelio.

El siguiente buffer de lisis fue estandarizado y probado por el laboratorio IDgen.

- Manitol
- Tris HCl
- EDTA
- NaCl
- CTAB 0.8%
- Salrkosyl
- b-mercaptoethanol 0,2% (v/v)

2. Protocolo de extracción de ADN de micelio.

El siguiente protocolo de extracción fue estandarizado y probado por el laboratorio IDgen.

- Mediante raspado en placa, se toma 0,1 gramos de micelio y se lo coloca en tubos libres de DNasa y RNasa, previamente adecuados con esferas de rompimiento.
- Agitar muestra en el bead beater a su máxima potencia por 0,5 minutos.
- Adicionar 500 µl de tampón de extracción con Proteinasa K.
- Incubar en baño María por 120 minutos a 65 °C.
- Añadir 500 µl de Fenol:Cloroformo:Isoamilalcohol (25:24:1) y homogenizar la muestra.
- Centrifugar las muestras durante 5 minutos a 14500 gravedades.
- El sobrenadante obtenido es puesto en un nuevo tubo estéril de 1,5 mL (libre de DNasa y RNasa).
- Al extracto se añadió un volumen igual de etanol absoluto frío, 150 µl de acetato de sodio 3M y 300 µl de etanol al 70% para precipitar el ADN. (La muestra se dejó enfriar a -20 °C durante toda la noche).
- Centrifugar durante 10 minutos a 14500 gravedades y se eliminó el sobrenadante.
- Secar los tubos en la cámara de flujo laminar durante media hora.
- Resuspender el pellet obtenido con 100 µl de agua estéril y libre de nucleasas, se adiciono 1.5 unidades de ARNasa y se incubo durante 20 minutos a 37 °C.
- Para verificar la calidad del ADN se realizó una electroforesis en gel de Agarosa al 1% y se utilizó un low mass ladder para determinar la concentración de ADN de la muestra. Adicionalmente se confirmó estos resultados mediante el uso del nanodrop.
- Las muestras son almacenadas a -20 °C, hasta su uso.

3. Ensamblaje de PCR.

El siguiente protocolo de ensamblaje de PCR fue estandarizado y probado por el laboratorio IDgen.

La PCR fue ensamblada bajo cabina de bioseguridad con un flujo positivo, y en un termo bloque a -5 °C, se utilizaron tubos PCR de 200uL para realizar el ensamble.

El siguiente cuadro detalla los reactivos usados durante el ensamble de la PCR por reacción.

Todos los protocolos detallados en el presente documento fueron desarrollados y probados por el laboratorio IDgen. Este documento es de uso exclusivo para información, se prohíbe su uso para la replicación de protocolos y su reproducción total o parcial.

Reactivo	Volumen (uL)	Concentración final (25uL volumen final)
GreenGo Taq 2X	12,5	1X
Primer Forward (5uM)	2,5	500nM
Primer Reverse (5uM)	2,5	500nM
Agua PCR	4,5	-----
ADN (150 ng – 70 ng)	3	5 ng – 20 ng

Los primers universales ITS4 e ITS5 fueron utilizados para amplificar los fragmentos ITS.

Los protocolos de termociclado se describen a continuación:

ITS: 95 °C por 3 min; 31 ciclos de 94 °C por 30 s, 50 °C por 45 s, y 72 °C por 1 min 30 s; 72 °C por 7 min; y 4 °C en espera.

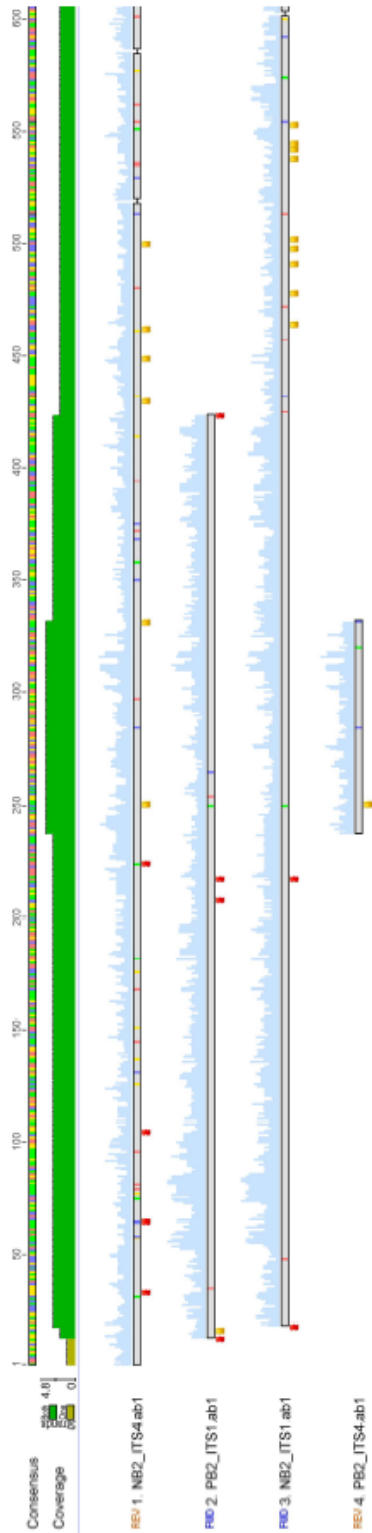
Finalmente, los amplicones fueron observados mediante una electroforesis en gel de agarosa 2% y comparados con un ladder 1Kb para verificar el tamaño del amplicón.

Los productos de PCR fueron adecuados y enviados a secuenciación, para su posterior ensamblaje y depuración mediante el programa bioinformático Geneious.



Firma autorizada
 Francisco Flores Ph.D.

Anexo 3. Ensamblaje de la cadena de ADN de *Psilocybe*.



**Anexo 4. Análisis proximal y de minerales totales de la muestra de *Psilocybe cubensis*.
Informe 18-002**

ML-LSAIA-20071-04



INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS
ESTACION EXPERIMENTAL SANTA CATALINA
DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y CALIDAD
LABORATORIO DE SERVICIO DE ANÁLISIS E INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS
Panamericana Sur Km. 1, Caguajay/Tla. 2890691-3007134. Fax 3007134
Casilla postal 17-01-340

NOMBRE PETICIONARIO: Srta. Patricia Rosero
DIRECCION: Santo Domingo
FECHA DE EMISION: 22 de enero de 2018
FECHA DE ANALISIS: Del 6 al 22 de enero de 2018

INFORME DE ENSAYO No: 18-002
INSTITUCION:
ATENCIÓN:
FECHA DE RECEPCION.:
HORA DE RECEPCION:
ANÁLISIS SOLICITADO

Particular
Srta. Patricia Rosero
06/01/2018
11H19
Proximal, Minerales

ANÁLISIS	HUMEDAD	CENIZAS ^Ω	E.E. ^Ω	PROTEÍNA ^Ω	FIBRA ^Ω	E.L.N. ^Ω	IDENTIFICACIÓN
MÉTODO	MO-LSAIA-01.01	MO-LSAIA-01.02	MO-LSAIA-01.03	MO-LSAIA-01.04	MO-LSAIA-01.05	MO-LSAIA-01.06	
MÉTODO REF.	U. FLORIDA 1970	U. FLORIDA 1970	U. FLORIDA 1970	U. FLORIDA 1970	U. FLORIDA 1970	U. FLORIDA 1970	
UNIDAD	%	%	%	%	%	%	
18-0002	41,73	1,99	1,65	17,43	3,88	75,05	Cepa de hongo <i>Psilocybe cubensis</i>
ANÁLISIS		Ca ^Ω	P ^Ω	Mg ^Ω	K ^Ω	Na ^Ω	
MÉTODO		MO-LSAIA-03.01.02	MO-LSAIA-03.01.04	MO-LSAIA-03.01.02	MO-LSAIA-03.01.03	MO-LSAIA-03.01.03	
MÉTODO REF.		U. FLORIDA 1980	U. FLORIDA 1980	U. FLORIDA 1980	U. FLORIDA 1980	U. FLORIDA 1980	
UNIDAD		%	%	%	%	%	
18-0002		0,14	0,52	0,16	0,25	0,02	Cepa de hongo <i>Psilocybe cubensis</i>
ANÁLISIS		Cu ^Ω	Fe ^Ω	Mn ^Ω	Zn ^Ω		
MÉTODO		MO-LSAIA-03.02	MO-LSAIA-03.02	MO-LSAIA-03.02	MO-LSAIA-03.02		
MÉTODO REF.		U. FLORIDA 1980	U. FLORIDA 1980	U. FLORIDA 1980	U. FLORIDA 1980		
UNIDAD		ppm	ppm	ppm	ppm		
18-0002		2	55	27	27		Cepa de hongo <i>Psilocybe cubensis</i>

Los ensayos marcados con Ω se reportan en base seca.

OBSERVACIONES: Muestra entregada por el cliente

RESPONSABLES DEL INFORME

Dr. Juan Samaniego, MSc.
RESPONSABLE TÉCNICO

Este documento no puede ser reproducido ni total ni parcialmente sin la aprobación escrita del laboratorio.

Los resultados arriba indicados solo están relacionados con el objeto de ensayo.

NOTA DE DESCARGO: La información contenida en este informe de ensayo es de carácter confidencial. Si usted no es el destinatario del mismo, se le notifica que cualquier copia o distribución de este informe es estrictamente prohibida. Si usted ha recibido este informe de ensayo por error, por favor notifique inmediatamente al remitente por este mismo medio y elimine la información.

ABSTRACT

Psilocybe spp. is a hallucinogenic mushroom used ancestrally for its neurotropic properties that give it a magic-religious character; these properties are granted by the tryptamines such as psilocybin, psilocin, baeocystin, ni-baeocystin, norbaeocystin, aeruginascin; useful in the treatment of psychiatric disorders and in the pharmaceutical industry. There is limited knowledge about the strains purification protocol, which hinders the success of the operation. The objective of this work is to describe the process of obtaining pure strains of *Psilocybe spp.* for industrial purposes, through an extensive literature review, to promote the valuation of Ecuador's native biodiversity. The purification of *Psilocybe spp.* strains, presents several phases: collection, isolation, identification, characterization and conservation. The most important phases are identification and conservation; the first which depends on the proper allocation of properties and potentialities; the second because the viability and genetic stability of the strains depend on it. As a consequence, the result was that the isolated strain was identified as *Psilocybe cubensis* with 99% genetic identity.

In this work, the strain of *P. cubensis* was lyophilized to conserve the species in the long term. This protocol consists of a sublimation process at pressures of 200 atm for freezing and 300 atm for drying, at a temperature that varies between -50 and 30 ° C.

The *Psilocybe cubensis* production process varies depending on the type of fermentation, it can be Solid State Fermentation or Liquid State Fermentation, with the first being the most used. The most efficient growth medium for mycelial growth is used within this scaling process. Therefore, the objective of this experiment is to select the growth medium that allows the highest activation speed of lyophilized strains of *Psilocybe cubensis*. As a result,

lyophilized strains were activated in two growth medium under study: PDA and MEA. It was found that the best to activate lyophilized strains of *P. cubensis* is the Malt Extract Agar (MEA), with an activation speed of 2.79 mm / day. It was stated with a confidence level of 95%, the effects of each growth medium on the strain activation speed with high statistical differences.

The strains catalog proposal was based on the Microbial Strains Catalog of the Cuban Sugar Cane Research Institute, ICIDCA, and consists of: application for the deposit of strains and information sheet of the strain to be deposited in the BRGM.

Key words: *Psilocybe cubensis*, identification, conservation, growth medium, fermentation, strains, activation rate, viability, industrial potential, ICIDCA, BRGM.

Víctor Rodríguez
Pc,

