

## AVALIAÇÃO DO IMPACTO DO MEIO DE CULTURA NA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS DO *PSILOCYBE CUBENSIS*

Cecília Fernandes Patta Muller Marques<sup>1</sup>, Gabriela dos Santos Medeiros<sup>2</sup>, Ana Carla Rangel Rosa<sup>3</sup>, Leonardo Bindelli Verly<sup>1</sup>, João Victor Andrade<sup>4</sup>, Mario Ferreira Conceição Santos<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Espírito Santo/ Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde - Departamento de Farmácia e Nutrição, Alto Universitário, S/N, Guararema - 29500-000 – Alegre-ES, Brasil, [ceciliafernandespmm@gmail.com](mailto:ceciliafernandespmm@gmail.com), [leobindelli@gmail.com](mailto:leobindelli@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal do Espírito Santo/Centro de Ciências Agrárias e Engenharias - Departamento de Biologia Alto Universitário, S/N, Guararema - 29500-000 – Alegre-ES, Brasil, [Gabsufes@gmail.com](mailto:Gabsufes@gmail.com)

<sup>3</sup>Universidade Federal do Espírito Santo/Centro de Ciências Agrárias e Engenharias - Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, Alto Universitário, S/N, Guararema - 29500-000 – Alegre-ES, Brasil, [anacarlarangelrosa@yahoo.com](mailto:anacarlarangelrosa@yahoo.com)

<sup>4</sup>Universidade Federal do Espírito Santo/ Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde - Departamento de Química e Física, Alto Universitário, S/N, Guararema - 29500-000 – Alegre-ES, Brasil, [joaovictorandrade927@gmail.com](mailto:joaovictorandrade927@gmail.com), [mario.f.santos@ufes.br](mailto:mario.f.santos@ufes.br)

### Resumo

Existem registros do uso de fungos psicodélicos que contêm como princípio ativo a psilocibina em diversas comunidades antigas, eram principalmente usados em ritos religiosos. Essa substância era utilizada e aplicada para fins benéficos dentro de grandes sociedades antigas, que conheciam a natureza e seu potencial medicinal; assim, tendo em vista o vasto potencial dos psicodélicos para uso medicinal, torna-se crucial a realização de investigações científicas sobre essas substâncias. Portanto, o objetivo deste estudo é determinar se há diferenças no perfil químico do fungo *Psilocybe cubensis* quando cultivado em diversos meios. Através da análise dos extratos obtidos dos diferentes meios de cultura utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), e cromatografia de camada delgada, foi possível observar que realmente ocorre alteração entre os resultados obtidos nos micélios do fungo crescido em diferentes substratos; onde os meios laboratoriais foram mais eficazes para o desenvolvimento do micélio.

**Palavras-chave:** Psilocibina, Substrato, Fungos, HPLC, Cromatografia

**Área do Conhecimento:** CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA – Química

### Introdução

Os fungos são organismos eucarióticos essenciais para os ecossistemas, atuando como decompositores primários e reciclando nutrientes (DINIZ, 1999). O cogumelo *Psilocybe* ganhou notoriedade na década de 60, sendo apelidado de "cogumelo mágico" após Gordon Wasson popularizá-lo na revista LIFE, introduzindo os fungos psicodélicos ao público norte-americano. A substância psilocibina, presente no *Psilocybe* e responsável por efeitos alucinógenos, foi proibida pelo governo, mesmo sem evidências de dependência (DINIZ, 1999 apud COSTA, 2005 apud FARIA, 2017). Nos anos 90, as pesquisas com psicodélicos em humanos foram retomadas (ESCOBAR; ROAZZI, 2010).

A psilocibina e a psilocina, alcaloides presentes no *Psilocybe*, são derivadas do triptofano e causam efeitos como alucinações visuais e alterações de consciência, pensamento e humor. Esses efeitos duram até 8 horas, com metabólitos detectáveis por até uma semana (Berger e Guss, 2005). O *Psilocybe* cresce em diversos substratos, incluindo esterco e solos férteis, sendo que grãos de cereais e arroz mostraram maior potencial de produção de psilocibina (PEREIRA, 2020) Nesse sentido, o

presente trabalho busca analisar se há diferenças significativas nas amostras de crescimento micelial do cogumelo *Psilocybe cubensis* cultivado em diferentes substratos, através da extração do substrato micelial e da investigação dos resultados obtidos dos diferentes substratos.

## Metodologia

Este presente estudo realizou análises do perfil químico do micélio do fungo *Psilocybe cubensis* (PDB – cultura 118) crescido em diferentes substratos. O fungo foi disponibilizado pela Universidade Federal de Alfenas (UFAM). Os substratos utilizados foram PDB (Potato Dextrose Broth - HMEDIA) e Czapek-Dok (Modified Broth - KASVI), 1 litro de cada meio laboratorial. Os meios naturais foram, milho de pipoca, classe amarela, tipo 1 (Célio PEREIRA), Arroz integral, tipo 1, classe longo fino, subgrupo parboilizado integral (Tio João). De cada substrato natural foram utilizados 300g.

O material utilizado foi submetido à esterilização em autoclave, por 20 minutos a 121°C, abrangendo as vidrarias e o substrato a ser preparado. Realizou-se o preparo dos substratos laboratoriais. Após a esterilização em autoclave e, já em temperatura ambiente, os meios estavam prontos para a inoculação do fungo. Os meios naturais empregados foram ambos cozidos por 30 minutos. O arroz foi cozido em panela comum e o milho em panela de pressão; após esse procedimento, os meios foram autoclavados por três dias consecutivos, conforme os protocolos de esterilização de material orgânico. Após a fase de esterilização, os grãos estavam prontos para a inoculação.

Para inocular o fungo nos substratos de interesse, foi utilizada uma seringa contendo cepas miceliais fornecidas pelo laboratório da UNIFAL-MG. Para manter a linhagem inicial do fungo, foram preparados meios de crescimento sólido (PDA), visando preservar e criar cepas viáveis para replicação. Após garantir a preservação da matriz micelial e a esterilização dos materiais, iniciou-se a colonização dos substratos. Os substratos líquidos, CZAPEK e PDB, foram mantidos em Erlenmeyers, enquanto os grãos foram armazenados em potes de vidro com tampa, semelhantes aos de conserva, com toda a vidraria esterilizada em autoclave.

Com o crescimento micelial completo e a colonização total do meio, iniciou-se o processo de extração, onde o micélio foi submerso em solução de acetato de etila por no mínimo 30 minutos. As amostras ficaram na solução por aproximadamente 12 horas. Após essa etapa, as soluções foram filtradas a vácuo utilizando papel filtro quantitativo (UNIFIL – 12,5 cm – C41) e um funil de Buchner conectado a uma bomba de vácuo (Figura 1).

Figura 1 – Substrato milho sendo filtrado em um funil de Buchner.



Fonte: Os Autores (2023)

Após a extração das soluções de cada substrato foi realizada sua hidrólise, onde foi preciso medir o pH da amostra, para corrigi-lo para 4, adicionando 100 ml de Acético Glacial. Em seguida a amostra foi aquecida até 70 °C, passou por outra correção de pH para 8 com hidróxido de sódio, e logo depois de esfriar foi filtrada. Após a hidrólise foi realizada a partição líquido-líquido com metanol em acetato

de etila, para assim deixar as amostras evaporando na capela de fluxo para ter acesso somente a solução obtida após a extração do micélio, ou seja, a amostra final a extração micelial.

Cada amostra foi submetida à cromatografia em camada delgada (CCD), que permite visualizar partículas com diferentes pesos moleculares, separadas pela polaridade ao longo da placa cromatográfica. Em seguida, as amostras foram analisadas por HPLC, onde os componentes se separam em fases estacionária e móvel dentro de uma coluna de fase reversa, permitindo a separação de moléculas que se movem a diferentes velocidades. Para a diluição das amostras tratadas, foi utilizado Metanol Puríssimo.

## Resultados

O tempo de crescimento micelial variou entre os substratos devido à distribuição e disponibilidade de nutrientes. O fungo colonizou mais rapidamente os meios laboratoriais, como PDB e CZAPEK, em cerca de sete dias, enquanto levou de 27 a 30 dias para colonizar parcialmente os substratos naturais, como milho e arroz (Figura 2). Os extratos laboratoriais PDB e CZAPEK além de demonstrarem um melhor e mais rápido crescimento micelial, também expressaram um resultado mais límpido ou próximo do ideal, dessa forma, nos gráficos do HPLC referentes às amostras de substratos naturais, o milho (Figura 6) e arroz (Figura 5); é possível notar uma pequena quantidade de picos, que indicam baixa presença de metabólitos observáveis, provavelmente devido à forma de cultivo dos fungos. A amostra de PDB (Figura 4) demonstrou marcas mais intensas nas placas cromatográficas (Figura 7) em comparação às amostras de CZAPEK (Figura 3); os gráficos também ficaram com picos e vales mais nítidos, demonstrando maior intensidade de metabólitos presentes

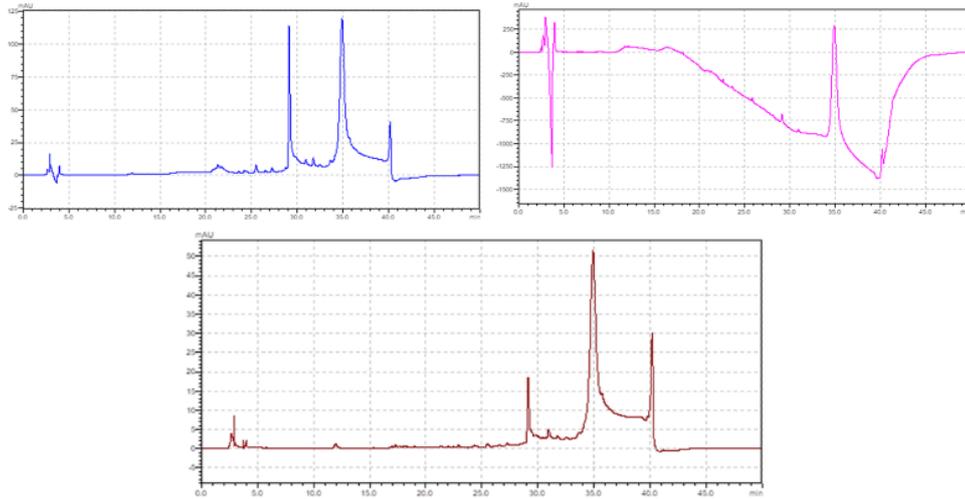
Os gráficos de HPLC referentes a amostra de arroz apresentam pouca quantidade de picos e vales. Ele expressa pouca ou quase nenhuma interação entre os picos que representam a atividade de componentes presentes na amostra, diferente do esperado pois existe grande presença de amido nesse substrato. As amostras de milho, analisadas por cromatografia em camada delgada (Figura 7), exibiram manchas bem definidas indicando a presença de compostos. No entanto, os gráficos de HPLC mostraram interação entre picos e vales, mas com menor qualidade em comparação ao meio PDB, apresentando menos picos captados pelo HPLC.

Figura 2 - Diferentes níveis de colonização entre os meios laboratoriais oferecidos como substrato para a colonização do *P. cubensis*.



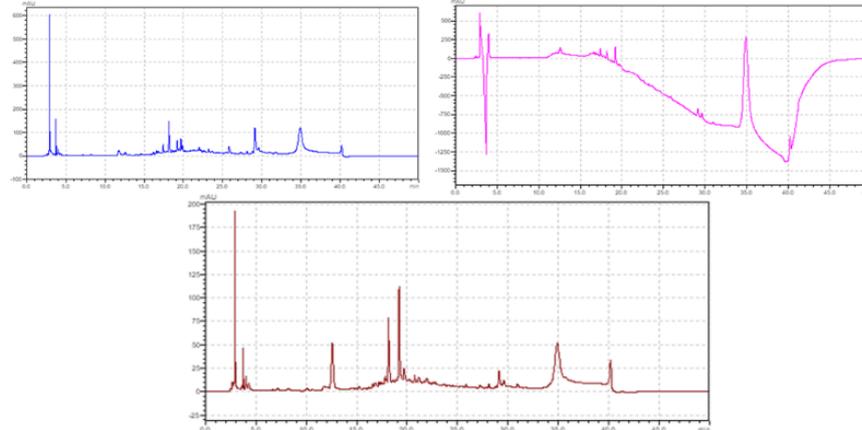
Fonte: Os Autores (2023)

Figura 3 – Gráficos obtidos por HPLC da amostra cultivada no meio CZAPEK.



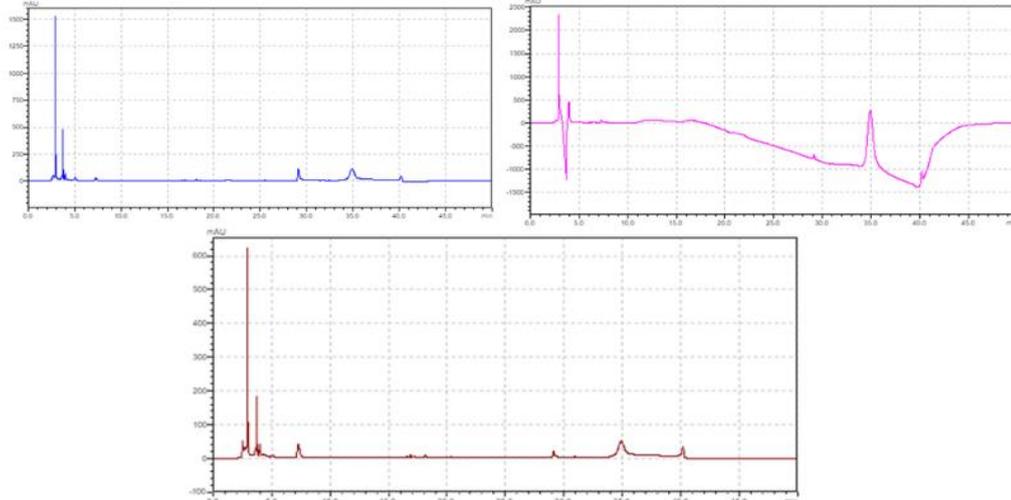
Fonte: Os Autores (2023)

Figura 4 – Gráficos obtidos por HPLC da amostra cultivada no meio PDB.



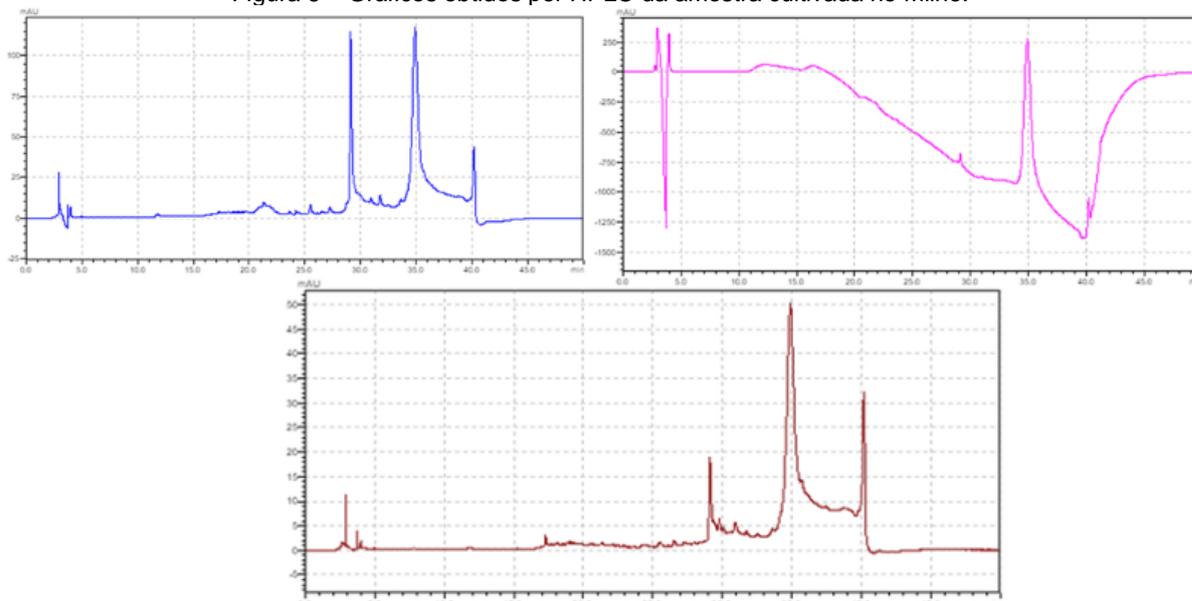
Fonte: Os Autores (2023)

Figura 5 – Gráficos obtidos por HPLC da amostra cultivada no arroz.



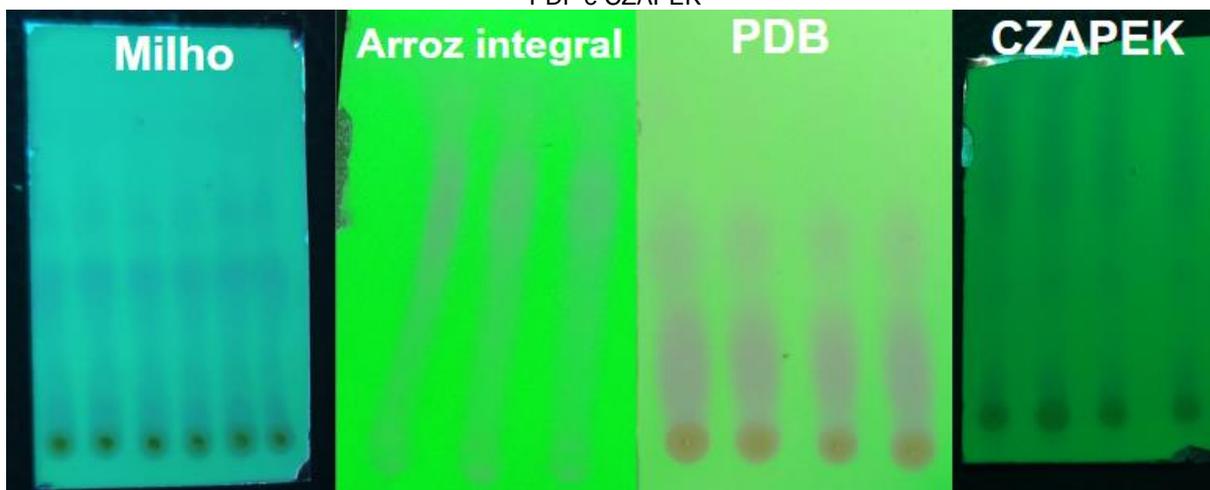
Fonte: Os Autores (2023)

Figura 6 – Gráficos obtidos por HPLC da amostra cultivada no milho.



Fonte: Os Autores (2023)

Figura 7 – Cromatografia de Camada Delgada das amostras cultivadas em milho, arroz integral, e nos meios PDF e CZAPEK



Fonte: Os Autores (2023)

### Discussão

Os resultados obtidos, tanto pelo HPLC, quanto na cromatografia em camada delgada, permitiram compreender a dinâmica das partículas presentes nas amostras em função dos diferentes substratos oferecidos para o crescimento do fungo. Os extratos laboratoriais PDB e CZAPEK demonstraram um crescimento micelial mais rápido e eficiente, o que pode ser atribuído à fácil disponibilidade de nutrientes nesses meios. Além disso, os gráficos de HPLC a partir desses extratos apresentaram picos mais distintos e vales visíveis, indicando uma resolução superior, essencial para a interpretação precisa dos dados.

Em contrapartida, os gráficos de HPLC referentes às amostras de substratos naturais, como milho e arroz, exibiram uma quantidade menor de picos, sugerindo uma baixa concentração de metabólitos observáveis. Esse fenômeno pode estar relacionado às diferenças na composição e

disponibilidade de nutrientes nesses substratos, influenciando diretamente o comportamento do crescimento micelial.

Conforme observado no estudo de Jeremy B. e Michael W., intitulado “Variação dos Níveis de Psilocibina e Psilocina com Repetidas Lavagens (Colheitas) de Esporocarpos Maduros de *Psilocybe cubensis* (Earle) Singer”, o tempo de crescimento micelial em grão-de-centeio foi de 28 dias, similar ao observado neste estudo. Contudo, não foram encontrados estudos comparáveis que utilizassem métodos semelhantes para analisar o crescimento micelial em outros substratos naturais ou laboratoriais, dificultando a comparação direta com os resultados aqui apresentados. Levando em consideração que não foi possível isolar a molécula de interesse, a psilocibina, o ideal seria realizar a continuação deste trabalho, buscando isolar a molécula e então analisar os efeitos que os diferentes tipos de substratos podem influenciar sob a produção deste composto de interesse. Além disso, também seria pertinente verificar se a produção de fungos com arroz parboilizado realmente é um problema para o desenvolvimento do microrganismo.

### Conclusão

Os substratos laboratoriais, devido à maior disponibilidade de nutrientes, resultaram em um crescimento micelial mais rápido do que os substratos naturais, embora o desenvolvimento nos grãos tenha sido mais lento, ainda estava em conformidade com a literatura. Há necessidade de investigar se o processo de parboilização dos grãos impacta negativamente o crescimento micelial. Foi possível detectar metabólitos nos gráficos de HPLC. O Potato Dextrose Broth – HMEDIA se mostrou o substrato mais eficiente, com melhor interação metabólica e desenvolvimento do micélio.

### Referências

Berger, K. J., & Guss, D. A. Mycotoxins revisited: Part I. **The Journal of Emergency Medicine**, 28(1), 53–62. (2005). doi:10.1016/j.jemermed.2004.08.013

DINIZ apud COSTA, F.A. **Uso e Atividade Farmacológica da Psilocibina: Um Estudo Bibliográfico**. Universidade Estácio de Sá. Rio de Janeiro, 2005.

DINIZ, O. G. L. **USOS, BIOQUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DO PSILOCYBE SPP**. Monografia para obtenção do Título de Especialista em Fitoterapia. Instituto Brasileiro de Estudos Homeopáticos, Rio de Janeiro, 1999.

PEREIRA N. T. **CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DE SUBSTRATO EMPREGADOS NA PRODUÇÃO DE COGUMELOS PSILOCYBE CUBENSIS**. Trabalho de Conclusão de Curso, Bacharelado em Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, PATO BRANCO, 2020.