



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

**MAESTRÍA EN QUÍMICA**

**TESIS**

**ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE  
*PSILOCYBE CUBENSIS* DEL ESTADO DE  
HIDALGO**

**Para obtener el grado de  
Maestra en Química**

**PRESENTA**

L. Q. Aylín Rocío Tabal Robles

**Director**

Dr. J. Jesús Martín Torres Valencia

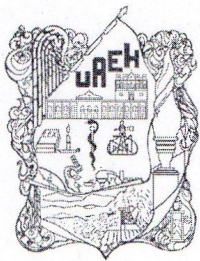
**Codirectora**

Dra. Leticia Romero Bautista

**Comité tutorial**

**Dra. Susana Rojas Lima**

**Dr. José Roberto Villagómez Ibarra**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería

School of Engineering and Basic Sciences

Área Académica de Química

Department of Chemistry

Número de control: ICBI-AAQ/3255/2023

Asunto: Autorización de impresión

**Mtra. Ojuky del Rocío Islas Maldonado**  
**Directora de Administración Escolar**  
**Presente.**

El Comité Tutorial de la **Tesis de Maestría** titulada **“ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE PSILOCYBE CUBENSIS DEL ESTADO DE HIDALGO”**, realizado por la sustentante **Aylin Rocío Tabal Robles** con **número de cuenta 260266** perteneciente al programa de **Maestría en Química**, una vez que ha revisado, analizado y evaluado el documento recepcional de acuerdo a lo estipulado en el Artículo 110 del Reglamento de Estudios de Posgrado, tiene a bien extender la presente:

### AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

Por lo que la sustentante deberá cumplir los requisitos del Reglamento de Estudios de Posgrado y con lo establecido en el proceso de grado vigente.

**Atentamente**

**“Amor, Orden y Progreso”**

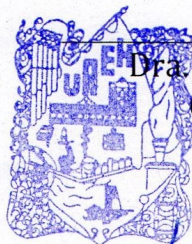
**Mineral de la Reforma, Hidalgo a 05 de diciembre de 2023**

El Comité Tutorial

Dr. J. Martín Torres Valencia  
Director de Tesis

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

Dra. Leticia Romero Bautista  
Codirectora de Tesis



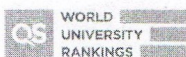
Dra. Susana Rojas Lima

Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería

Dr. José Roberto Villagómez Ibarra

Área Académica de Química

Ciudad del Conocimiento  
Carretera Pachuca-Tulancingo km 4.5 Colonia  
Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo,  
México. C.P. 42184  
Teléfono: +52 (771) 71 720 00 ext. 2200, 2201  
Fax 6502  
aaq\_icbi@uaeh.edu.mx



[www.uaeh.edu.mx](http://www.uaeh.edu.mx)

# DEDICATORIA

---

*A Violeta*

*Aunque tu misi3n fue muy dolorosa para m3, me ense1aste que vivir es un regalo invaluable.*

*Nos volveremos a encontrar.*



## AGRADECIMIENTOS

---

A mis amados padres Rocío Robles y Germán Tabal les dedico mi más sincero agradecimiento por darme el regalo de la vida. Su amor, apoyo constante y sacrificio son inefables. En el transcurso de mi vida me han guiado y enseñado, pero sobre todo siempre han creído en mí. Su amor, apertura a lo nuevo y tenerlos son el mejor regalo de la vida.

A mis amados hermanos Gahel y Ashley por su amor incondicional, sin importar los desafíos de la vida sé que siempre puedo contar con ustedes. Sus consejos y regaños me han dirigido a ser siempre mejor, amo y me siento orgullosa que sean de las mejores personas que conozco. Admiro las personas en las que se han convertido y estoy eternamente agradecida de ser parte de ustedes.

A mi compañero de vida Mauricio Anaya (Dars MentalSupplies), que me ha contagiado y compartido la pasión por el mundo psicodélico. Ha leído y criticado detalladamente este escrito y ha puesto a mi disposición su conocimiento, ideas e ilustraciones, lo cual le ha enriquecido en gran medida. En nuestras salidas de campo y en el día a día siempre has sido el mejor colega, compañero e inspiración...

A mi querida familia Cris, Mauricio Salvador, y Diana, por su apoyo en más de un sentido, el amor brindado y por cuidarme. Gracias por su comprensión a mis cambios de humor y a los periodos de hibernación propios de un investigador.

A mis mejores amigos, Javier Ruiz y Emmanuel Campos, les expreso mi profundo agradecimiento por su apoyo incondicional a lo largo de tantos años y en tantos aspectos de mi vida. Su presencia y colaboración han sido fundamentales, valoro enormemente la conexión que compartimos a lo largo del tiempo.



A mis colegas y queridos amigos del laboratorio 5 y 6: Paty, Diana, Amador, Gerardo y Zyanya por las risas, los buenos momentos, las comidas que hemos compartido y por lo que siempre aprendo de ustedes, son personas extraordinarias.

Agradecimientos especiales para la Dra. Reyna Zeferino y el Dr. Raúl Velasco que han influido en gran medida en mi formación profesional y me han enseñado a perseverar en el mundo de la investigación, su bella amistad y apoyo han sido y serán parte de mí.

A la Dra. Leticia Romero quiero expresar mi profundo agradecimiento por su amistad inquebrantable, por ser mi guía no solo en el ámbito científico, sino también en la travesía de la vida. Su confianza en mí ha sido un pilar fundamental, y su bella personalidad ilumina mi camino.

A Gerson Escamilla le dedico mi gratitud sincera por su amistad constante y el apoyo proporcionado con el material fúngico. Las fotografías que ha compartido aquí son un testimonio de su generosidad, su compromiso con la difusión del conocimiento es admirable.

A la Dra. María Eva González mi reconocimiento por su apoyo invaluable en las pruebas pre clínicas, los análisis de U-HPLC y GC-MS. Su amistad es un regalo invaluable, su mentalidad abierta y entusiasmo han sido fuentes de inspiración que me motivan a explorar y avanzar en el fascinante mundo de la investigación.

Al Dr. Raúl Escamilla y al Dr. Osiris González, agradezco sinceramente por conocerlos y formar parte de este maravilloso equipo de investigación. La sabiduría que han compartido a través de sus vastas experiencias en sus áreas de especialización ha sido una guía fundamental en mi crecimiento profesional.

Mis agradecimientos especiales al Dr. Martín Torres, por aceptar unirse a este camino y creer en mí. Su experiencia y conocimiento han sido los pilares que han sostenido este proyecto, y le estoy profundamente agradecida por su contribución. Gracias por la amistad y confianza que nos brinda a todos.

La presente investigación se realizó en el Área Académica de Química (AAQ) del Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería (ICBI) de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo bajo la dirección del Dr. J. Jesús Martín Torres Valencia con el apoyo financiero de la beca Otorgada por CONACYT, CVU No. 1145607.

Parte de los resultados de esta investigación se presentaron en la 18a Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales, que se llevó a cabo del 24 al 27 de mayo de 2023 en las instalaciones del Colegio Primitivo y Nacional de San Nicolás de Hidalgo de la ciudad de Morelia Michoacán, con el título “Composición química de *Psilocybe cubensis* del Estado de Hidalgo”.

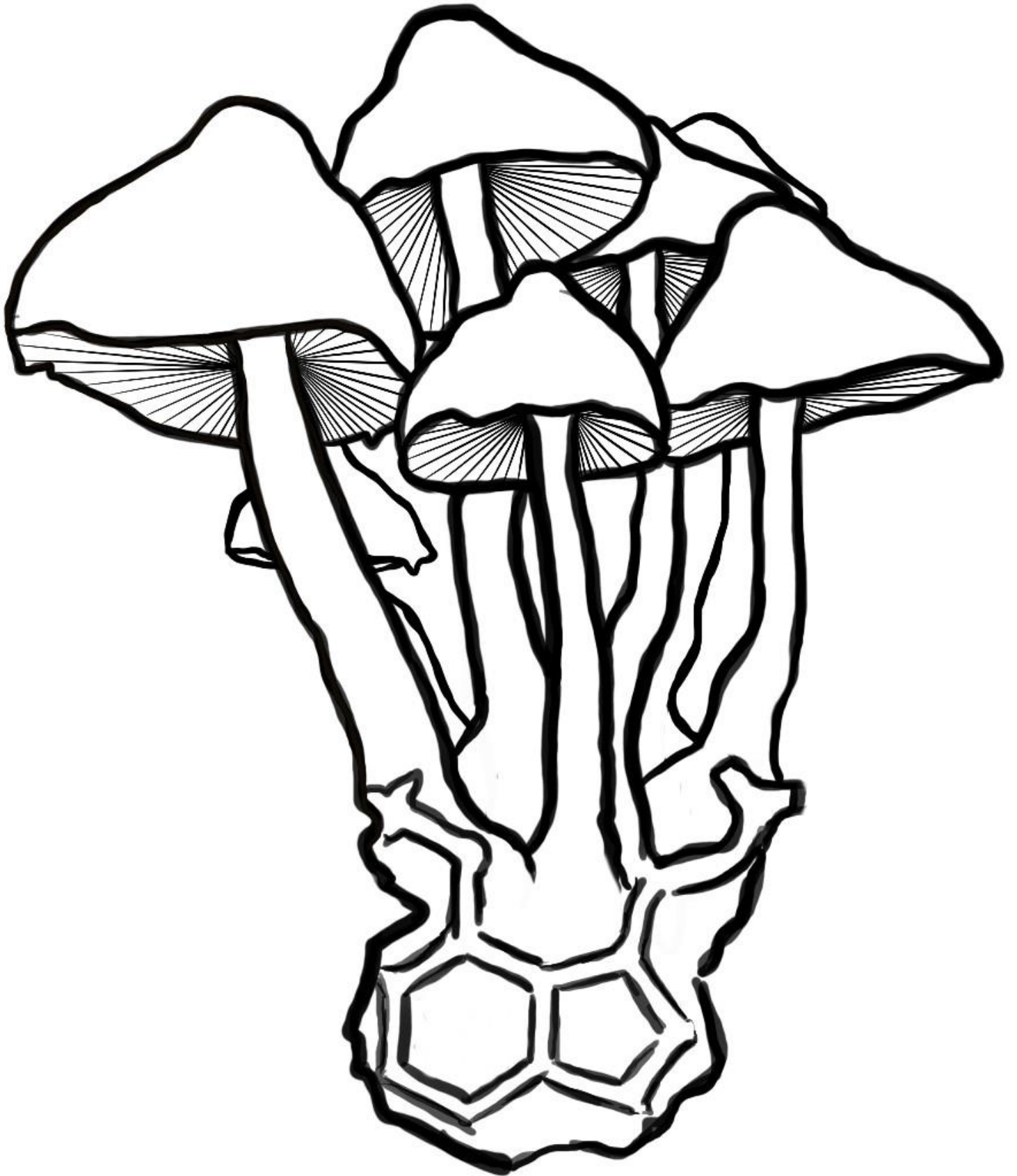
Este trabajo generó la siguiente publicación:

**“Antidepressant- and anxiolytic-like activities and acute toxicity evaluation of the *Psilocybe cubensis* mushroom in experimental models in mice”**

Alberto Hernández-Leona, Raúl Iván Escamilla-Orozco, Aylín R. Tabal-Robles, David Martínez-Vargas, Leticia Romero-Bautista, Gerson Escamilla-Soto, Osiris S. González-Romero, Martín Torres-Valencia, María Eva González-Trujano.

Journal of Ethnopharmacology 2024, 320, 117415.

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2023.117415>





*“Nada es más instructivo que la indignada incredulidad de ciertos científicos materialistas ante todos los fenómenos que tienden a probar la existencia de un mundo invisible y espiritual. Hoy en día, quien se atreve a probar la existencia del alma, escandaliza a la ortodoxia del ateísmo tanto como se escandalizaba la ortodoxia de la Iglesia en el pasado al negar a Dios.*

*Ya no se arriesga ya la vida, es cierto, pero se arriesga la reputación”*

ÉDOUARD SCHURÉ

# TABLA DE CONTENIDO

---

	<b>Página</b>
<b>SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS</b>	I
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	V
<b>LISTA DE TABLAS</b>	X
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
1.1. Metabolitos primarios y secundarios	2
<b>2. ANTECEDENTES</b>	4
2.1. El género <i>Psilocybe</i>	4
2.2. Historia breve de los hongos <i>Psilocybe</i>	5
2.3. Efectos del consumo de hongos <i>Psilocybe</i>	6
2.4. Alcaloides conocidos en hongos <i>Psilocybe</i>	8
2.5. <i>Psilocybe cubensis</i> (Earle) Singer, 1948	10
<b>3. HIPÓTESIS</b>	11
<b>4. OBJETIVOS</b>	11

4.1. General	11
4.2. Específicos	11
<b>5. JUSTIFICACIÓN</b>	12
<b>6. PARTE EXPERIMENTAL</b>	13
6.1. Procedimientos generales	13
6.2. Material fúngico	14
6.3. Extracción, identificación y aislamiento	15
6.4. Actividad antidepresiva y ansiolítica	17
<b>7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	19
7.1. Obtención, identificación y conservación del material fúngico	20
7.1.1. Sitio de recolecta y conservación de la biomasa	20
7.1.2. Identificación morfológica del hongo	22
7.1.2.1. Hongo silvestre	23
7.1.2.2. Hongo de cultivo	26
7.2. Obtención de extractos	29
7.2.1. Hongos silvestres	29
7.2.1.1. Extracción secuencial por reflujo	29



7.2.1.2. Extracción con MeOH por ultrasonido	30
7.2.2. Hongos de cultivo	31
7.2.2.1. Extracción con MeOH por ultrasonido	31
7.2.2.2. Extracción secuencial por reflujo	32
7.2.2.3. Extracción con MeOH por reflujo	32
7.2.2.4. Extracción con CH <sub>3</sub> COOH al 5%	33
7.3. Análisis químico preliminar	35
7.3.1. Extractos secuenciales por reflujo	35
7.3.2. Extractos con MeOH por ultrasonido	38
7.3.3. Extracto con MeOH por reflujo	41
7.3.3.1. Identificación de alcaloides por UHPLC	41
7.3.4. Extracción con CH <sub>3</sub> COOH al 5%	42
7.4. Separación cromatográfica e identificación de compuestos	44
7.4.1. Ergosterol	44
7.4.1.1. Hongo de cultivo	44
7.4.2. Peróxido de ergosterol	50
7.4.2.1. Hongo de cultivo	50

7.4.2.2. Hongo silvestre	53
7.4.3. $\alpha$ , $\alpha$ -trehalosa	59
7.4.3.1. Hongo de cultivo	59
7.4.3.2. Hongo silvestre	64
7.4.4. Psilocibina	68
7.4.4.1. Hongo de cultivo	68
7.4.4.2. Hongo silvestre	71
7.4.5. $\alpha$ - y $\beta$ -D-glucopiranososa	79
7.4.5.1. Hongo de cultivo	79
7.5. Cuantificación absoluta por RMN de $^1\text{H}$ en 1D (qHNMR)	83
7.5.1. Extracto con MeOH por ultrasonido del hongo silvestre	84
7.5.2. Extracto con MeOH por ultrasonido del hongo de cultivo	86
7.6. Evaluación de la actividad antidepresiva y ansiolítica del extracto con MeOH por ultrasonido y la fase acuosa del hongo de cultivo	89

7.6.1. Prueba de campo abierto (prueba de ansiedad)	89
7.6.2. Prueba de Rota-rod (prueba de coordinación motora)	89
7.6.3. Prueba de nado forzado (PNF) para inducir conducta tipo depresiva	90
7.6.4. Análisis estadístico	90
<b>8. CONCLUSIONES</b>	<b>95</b>
<b>9. REFERENCIAS</b>	<b>97</b>
<b>10. ÁREAS DE OPORTUNIDAD</b>	<b>103</b>
<b>11. INFORMACIÓN DE SOPORTE</b>	<b>105</b>
11.1. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	105
11.2. Espectroscopía de infrarrojo (IR)	116
11.3. Difracción de Rayos-X	117
11.4. Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GS-MS)	123



## SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

---

$\alpha$	Alfa
$[\alpha]_D^t$	Rotación específica de la luz polarizada
$\beta$	Beta
$\delta$	Desplazamiento químico
$\lambda$	Longitud de onda
$\mu\text{L}$	Microlitro
”	Pulgadas
$^{\circ}\text{C}$	Grados Celsius
$^{13}\text{C}$	Carbono 13
$^1\text{H}$	Protón
Å	Ángstrom
<b>AcOEt</b>	Acetato de etilo
<b>ACN</b>	Acetonitrilo
<b>CC</b>	Cromatografía en Columna
<b>CCF</b>	Cromatografía en Capa Fina
<b>cm</b>	Centímetros
<b>COSY</b>	Espectroscopía de correlación homonuclear (CORrelation SpectroscopY)
<b>d</b>	Doble
<b>d<sub>4</sub></b>	Tetradeterado
<b>d<sub>6</sub></b>	Hexadeterado
<b>dd</b>	Doble de dobles
<b>ddd</b>	Doble de doble de dobles
<b>dddd</b>	Doble de doble de doble de dobles
<b>DMAB</b>	<i>p</i> -dimetilaminobenzaldehído
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>EEG</b>	Electroencefalograma

<b>Et<sub>2</sub>O</b>	Éter etílico
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>g</b>	Gramos
<b>GC-MS</b>	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (Gas Chromatography–Mass Spectrometry)
<b>h</b>	Horas
<b>HMBC</b>	Correlación heteronuclear a enlaces múltiples (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta resolución (High-Performance Liquid Chromatography)
<b>HRMS</b>	Espectrometría de masas de alta resolución (High Resolution Mass Spectrometry)
<b>HSQC</b>	Correlación cuántica única heteronuclear (Heteronuclear Single Quantum Correlation)
<b>i.p.</b>	Intraperitoneal
<b>IR</b>	Infrarrojo
<b><i>J</i></b>	Constante de acoplamiento
<b>Kg</b>	Kilogramo
<b>KHz</b>	Kilohercio
<b>L</b>	Litros
<b>m</b>	Múltiple
<b>MAO</b>	Monoamino oxidasa
<b>mbar</b>	Milibar
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>mg</b>	Miligramos
<b>MHz</b>	Megahercio
<b>mL</b>	Mililitros
<b>mult.</b>	Multiplicidad
<b><i>n</i>-BuOH</b>	<i>n</i> -butanol

<b>nm</b>	Nanómetros
<b><i>P.</i></b>	<i>Psilocybe</i>
<b>p. f.</b>	Punto de fusión
<b>PM</b>	Peso molecular
<b>p.o.</b>	Gastroesofágica
<b>ppm</b>	Partes por millón
<b>q</b>	Quíntuple
<b>RMN</b>	Resonancia Magnética Nuclear
<b>s</b>	Simple
<b>SEM</b>	Media del error estándar (Standar Error Mean)
<b>t</b>	Triple
<b>tr</b>	Tiempo de retención
<b>UHPLC</b>	Cromatografía líquida de ultra alta presión (Ultra-High-Pressure Liquid Chromatography)
<b>UV</b>	Ultravioleta



## LISTA DE FIGURAS

---

- Figura 1** - Estructuras químicas de psilocibina y psilocina.
- Figura 2** - Escultura de Xochipilli exhibida en el INAH.
- Figura 3** - Diferencias entre las estructuras químicas de psilocina y serotonina.
- Figura 4** - Fotografías de diferentes especies del género *Psilocybe* con sus respectivos alcaloides.
- Figura 5** - Estructuras químicas de los alcaloides tipo  $\beta$ -carbolina encontrados en *Psilocybe*.
- Figura 6** - Estructura química de 4-hidroxiindol-3-il-acetaldehído.
- Figura 7** - Características macroscópicas de *P. cubensis* (Earle) Singer silvestre.
- Figura 8** - Metodología para el desarrollo del proyecto.
- Figura 9** - Ubicación geográfica de Xochicoatlán, Hidalgo.
- Figura 10** - Ejemplares de *P. cubensis* (Earle) Singer silvestre en diferentes etapas de madurez encontrados en estiércol de vaca en la zona de Xochicoatlán.
- Figura 11** - Ejemplares de *P. cubensis* (Earle) Singer de cultivo en diferentes etapas de madurez.
- Figura 12** - Basidiomas de *P. cubensis* silvestre. a) Espécimen maduro. b) Primordio. c) Láminas. d) Píleo en vista apical. e) Corte longitudinal del estípite. f) Forma de la lámina. g) Corte transversal del estípite.
- Figura 13** - Microscopia de *P. cubensis* silvestre. a) Esporas. b) Basidios. c) Pleurocistidios. d) Queilocistidios.
- Figura 14** - Basidiomas de *P. cubensis* de cultivo. a) Espécimen maduro. b) Primordio. c) Láminas. d) Píleo en vista apical. e) Corte longitudinal del espécimen. f) Forma de la lámina. g) Corte transversal del estípite.
- Figura 15** - Microscopia de *P. cubensis* de cultivo. a) Esporas. b) Basidios. c) Pleurocistidios. d) Fíbulas.
- Figura 16** - Variaciones anuales en las características macroscópicas del píleo de *P. cubensis* silvestre.

- Figura 17** - Extractos obtenidos mediante reflujo secuencial del hongo silvestre. De izquierda a derecha: hexano, AcOEt y MeOH.
- Figura 18** - Segundo lote de carpóforo de *P. cubensis* en ultrasonido.
- Figura 19** - Extracto de *Psilocybe cubensis* (izquierda) y precipitado blanco (derecha).
- Figura 20** - Extractos obtenidos mediante reflujo secuencial del hongo de cultivo. De izquierda a derecha: hexano, AcOEt y MeOH.
- Figura 21** - Extracto del segundo lote de *P. cubensis* de cultivo (izquierda) y cristales en el fondo del matraz (derecha).
- Figura 22** - Extracto del tercer lote de *P. cubensis* de cultivo.
- Figura 23** - Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) de la extracción secuencial del hongo de cultivo.
- Figura 24** - Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) de la extracción secuencial del hongo silvestre.
- Figura 25** - Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) del extracto total (MeOH) y las particiones del hongo de cultivo.
- Figura 26** - Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) del extracto total (MeOH) y las particiones del hongo silvestre.
- Figura 27** - Cromatograma UHPLC de la fase acuosa (negro), espectros UV (azul) y HRMS (rojo).
- Figura 28** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) del extracto con  $\text{CH}_3\text{COOH}$  al 5% del hongo de cultivo.
- Figura 29** - Estructura molecular del ergosterol (izquierda) y extracto aislado (derecha).
- Figura 30** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) del ergosterol aislado del hongo de cultivo.
- Figura 31** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) del ergosterol aislado del hongo de cultivo.
- Figura 32** - Espectro de COSY del ergosterol aislado del hongo de cultivo.
- Figura 33** - Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) del ergosterol aislado del hongo de cultivo (negro) y el reactivo de Sigma-Aldrich (verde).

- Figura 34** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) del peróxido de ergosterol identificado del hongo de cultivo.
- Figura 35** - Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) del peróxido de ergosterol identificado del hongo de cultivo (negro) y el de *G. applanatum* (verde).
- Figura 36** - Estructura molecular del peróxido de ergosterol.
- Figura 37** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) del peróxido de ergosterol identificado del hongo silvestre.
- Figura 38** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) del peróxido de ergosterol identificado del hongo silvestre.
- Figura 39** - Espectro de COSY del peróxido de ergosterol identificado del hongo silvestre.
- Figura 40** - Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) del peróxido de ergosterol identificado del hongo silvestre (negro) y el aislado de *Ganoderma applanatum* (verde).
- Figura 41** - Estructura molecular de la  $\alpha,\alpha$ -trehalosa (izquierda) y extracto aislado (derecha).
- Figura 42** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) del  $\alpha,\alpha$ -trehalosa aislada del hongo de cultivo.
- Figura 43** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) del  $\alpha,\alpha$ -trehalosa aislada del hongo de cultivo.
- Figura 44** - Espectro de COSY del  $\alpha,\alpha$ -trehalosa aislada del hongo de cultivo.
- Figura 45** - Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) del  $\alpha,\alpha$ -trehalosa aislada del hongo de cultivo (negro) y el reactivo de Sigma-Aldrich (verde).
- Figura 46** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) del  $\alpha,\alpha$ -trehalosa identificada del hongo silvestre.
- Figura 47** - Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) del  $\alpha,\alpha$ -trehalosa aislada del hongo de cultivo (negro), identificada del hongo silvestre (rojo) y el reactivo de Sigma-Aldrich (verde).
- Figura 48** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) de la psilocibina identificada en el hongo de cultivo.

- Figura 49** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) procesado de la psilocibina identificada en el hongo de cultivo.
- Figura 50** - Estructura molecular de la psilocibina (izquierda) y extracto aislado (derecha).
- Figura 51** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) de la psilocibina aislada en el hongo silvestre.
- Figura 52** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) de la psilocibina aislada del hongo silvestre.
- Figura 53** - Espectro de COSY de la psilocibina aislada del hongo silvestre.
- Figura 54** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) procesado de la psilocibina aislada en el hongo silvestre.
- Figura 55** - Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) de la psilocibina identificada en el hongo de cultivo (negro) y aislada en el hongo silvestre (verde).
- Figura 56** - Estructuras moleculares de la  $\alpha$ -D-glucopiranososa (izquierda) y la  $\beta$ -D-glucopiranososa (derecha).
- Figura 57** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) de la  $\alpha$ - y  $\beta$ -D-glucopiranososa identificada en el hongo de cultivo.
- Figura 58** - Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) de la  $\alpha$ - y  $\beta$ -D-glucopiranososa identificada en el hongo de cultivo (negro) y la muestra de Sigma-Aldrich.
- Figura 59** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) de la cuantificación del extracto con MeOH por ultrasonido del hongo silvestre.
- Figura 60** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) de la cuantificación del extracto con MeOH por ultrasonido del hongo de cultivo.
- Figura 61** - Efectos de tipo ansiolítico en la actividad ambulatoria (A) y el comportamiento de levantamientos (B).
- Figura 62** - Efecto tipo antidepresivo en: A) prueba de la rota-rod, B) escalamiento, C) inmovilidad y D) conductas de nado.
- Figura 63** - Análisis EEG después de la administración del hongo completo y la extracción acuosa en ratones.
- Figura 64** - Espectro HSQC del ergosterol aislado del hongo de cultivo.
- Figura 65** - Espectro HMBC del ergosterol aislado del hongo de cultivo.



- Figura 66** - Espectro HSQC del peróxido de ergosterol identificado del hongo silvestre.
- Figura 67** - Espectro HMBC del peróxido de ergosterol identificado del hongo silvestre.
- Figura 68** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) con experimento Water suppression de la  $\alpha,\alpha$ -trehalosa aislada del hongo de cultivo.
- Figura 69** - Espectro HSQC del  $\alpha,\alpha$ -trehalosa aislada del hongo de cultivo.
- Figura 70** - Espectro HMBC del  $\alpha,\alpha$ -trehalosa aislada del hongo de cultivo.
- Figura 71** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) con experimento Water suppression de la  $\alpha,\alpha$ -trehalosa identificada del hongo silvestre.
- Figura 72** - Espectro HSQC de la psilocibina aislada del hongo silvestre.
- Figura 73** - Espectro HMBC de la psilocibina aislada del hongo silvestre.
- Figura 74** - Espectro IR del ergosterol aislado del hongo de cultivo.
- Figura 75** - Espectro IR del  $\alpha,\alpha$ -trehalosa aislada del hongo de cultivo.
- Figura 76** - Estructura de rayos-X del  $\alpha,\alpha$ -trehalosa aislada del hongo de cultivo.
- Figura 77** - Éster metílico del ácido palmítico o éster metílico del ácido hexadecanoico ( $\text{C}_{17}\text{H}_{34}\text{O}_2$ ), PM = 270 g/mol.
- Figura 78** - Psilocina o 4-hidroxi-*N,N*-dimetil-triptamina ( $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}$ ), PM = 204 g/mol.
- Figura 79** - Éster metílico del ácido linoleico o éster metílico del ácido (9*Z*,12*Z*)-9,12-octadecadienoico ( $\text{C}_{19}\text{H}_{34}\text{O}_2$ ), PM = 294 g/mol.
- Figura 80** - Ergosterol ( $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}$ ), PM = 396 g/mol.

## LISTA DE TABLAS

---

- Tabla 1** - Rendimiento de los extractos obtenidos.
- Tabla 2** - Gradiente de flujo en el análisis de UHPLC.
- Tabla 3** - Comparación de los datos del desplazamiento químico (en ppm) entre el ergosterol aislado del hongo de cultivo y el reportado (Seo et al., 2009).
- Tabla 4** - Comparación de los datos del desplazamiento químico (en ppm) entre el peróxido de ergosterol identificado del hongo silvestre, el identificado del hongo de cultivo y el reportado (Seo et al., 2009).
- Tabla 5** - Comparación de los datos del desplazamiento químico (en ppm) entre la  $\alpha,\alpha$ -trehalosa aislada del hongo de cultivo y el reportado (Roslund et al., 2008).
- Tabla 6** - Comparación de los datos del desplazamiento químico (en ppm) entre la psilocibina aislada del hongo silvestre, identificada del hongo de cultivo y el reportado (Shirota et al., 2003).
- Tabla 7** - Comparación de los datos del desplazamiento químico (en ppm) entre la  $\alpha$ - y  $\beta$ -D-glucopiranosas identificadas del hongo de cultivo y el reportado (Roslund et al., 2008).
- Tabla 8** - Datos cristalográficos de la estructura de rayos-X del  $\alpha,\alpha$ -trehalosa aislada del hongo de cultivo.

# 1. INTRODUCCIÓN

---

Desde tiempos prehistóricos, el humano ha dependido de los productos naturales proporcionados por la tierra y la biodiversidad circundante para satisfacer sus necesidades básicas, desde el cuidado de la salud basado en plantas y hongos, la producción de alimentos y la obtención de materiales para la construcción.

La forma en que los humanos utilizan las plantas, los alimentos y las drogas puede cambiar los valores de los individuos y, en última instancia, los de sociedades enteras. Los primeros omnívoros operaban bajo el principio de ingerir cualquier cosa que pareciera comida y vomitar todo lo que fuera incomedible. Una dieta variada o una dieta omnívora significa verse expuesto a cualquier cambio del equilibrio químico. Los cambios acelerados en la organización neuronal, los estados de conciencia y el comportamiento del cerebro son producto de esta selección natural (McKenna, 1992).

Las alusiones históricas prevalecen en textos antiguos, como el "Papiro Ebers" egipcio que describe remedios a base de plantas, o las contribuciones de Hipócrates a la medicina griega antigua.

Como resultado, a lo largo del tiempo y en diversos lugares, este tipo de conocimiento se ha utilizado de diversas maneras, gracias a esto podemos rastrear sus orígenes hasta nuestro país.

En México la relación que tenemos con los hongos es antigua, se tiene el registro que en la época precolombina se utilizaban como alimento, en la fermentación de bebidas, como remedios medicinales y en rituales ceremoniales. Lamentablemente mucho del conocimiento tradicional se perdió tras la conquista, al considerarlo o relacionarlo con brujería o herejía, pese a ello, parte del conocimiento que podría ser de utilidad al relacionarse con cura de enfermedades fue preservado, por citar un ejemplo popular, las esporas que producen algunas especies eran utilizadas en tratamientos de afecciones en la piel (Ramos et al., 2022).

Quizás no sorprende que la humanidad buscara sustancias químicas en la naturaleza. Nos dimos cuenta de que las plantas y hongos eran a la vez alimentos y medicinas, de hecho, la mayor parte del mundo todavía depende en gran medida de productos naturales como remedios herbales para su atención primaria de salud. Durante las últimas décadas, la literatura tanto científica como

popular, refleja un mayor interés en los productos naturales por parte del público en general y ha ayudado a impulsar una mayor conciencia científica tanto de las drogas como de las medicinas botánicas de la naturaleza (Cooper & Nicola, 2015).

Uno de los descubrimientos fortuitos más importantes en el mundo fue el primer antibiótico, ocurrido en un laboratorio de Londres en 1928 por Alexander Fleming, quien notó una zona alrededor de un hongo invasor en una placa de agar en la que la bacteria no crecía. Después de aislar el moho e identificarlo como perteneciente al género *Penicillium*, Fleming obtuvo un extracto del moho y nombró a su agente activo penicilina, además, determinó que tenía un efecto antibacteriano sobre los estafilococos y otros patógenos gram-positivos (Gaynes, 2017).

Actualmente, el estudio sistemático de las drogas naturales es abordado por la farmacognosia (*pharmakon*: droga; *gnosis*: conocimiento), la cual abarca el estudio de la historia, identificación, recolección, preparación, cultivo, preservación, comercialización, distribución, evaluación de los componentes químicos de origen natural, la farmacología y el uso tradicional de esos compuestos o sus derivados para mejorar la salud y el bienestar del ser humano (Cortez-Gallardo et al., 2004).

## 1.1 Metabolitos primarios y secundarios

Los metabolitos son intermediarios en los procesos metabólicos de la naturaleza y pueden ser desde moléculas pequeñas hasta grandes compuestos poliméricos.

Un **metabolito primario** participa directamente en el crecimiento, desarrollo y reproducción normales, por ejemplo, productos de fermentación (EtOH, ácido acético, ácido cítrico y láctico) y constituyentes celulares (lípidos, vitaminas y polisacáridos). Un **metabolito secundario** no participa directamente en esos procesos y generalmente tiene una función, pero no es tan importante para el organismo (antibióticos, pigmentos y carotenoides) (Cooper & Nicola, 2015).

Los procesos metabólicos y las reacciones enzimáticas comienzan a partir de bloques de construcción simples. Estos metabolitos se dividen en varias clases dependiendo de la funcionalidad de la molécula (fenólico, alcaloide, esteroide) (Cooper & Nicola, 2015).

Los químicos denominan a los metabolitos secundarios “productos naturales” para distinguirlos de los compuestos que tradicionalmente han sido competencia de los bioquímicos. Son únicos

en el sentido de su ocurrencia restringida y son más característicos de fuentes botánicas específicas (es decir, una familia o un género y, a veces, una sola especie de planta). La mayoría de los productos naturales, normalmente de estructuras relativamente complejas, poseen actividades biológicas. Muchos de ellos llegan a ser productos farmacéuticos y también se utilizan como insecticidas, pesticidas, hormonas de crecimiento vegetal, etc. Sus interesantes variaciones estructurales, configuraciones, conformaciones, formas moleculares, etc. reclaman la atención académica de químicos de todo el mundo (Talapatra & Talapatra, 2015).

En vista de lo expuesto, en esta investigación se desarrolló el estudio químico de *Psilocybe cubensis* procedente del estado de Hidalgo, con la finalidad principal de ampliar nuestro entendimiento sobre su composición química y, en un sentido más amplio, del género *Psilocybe*.

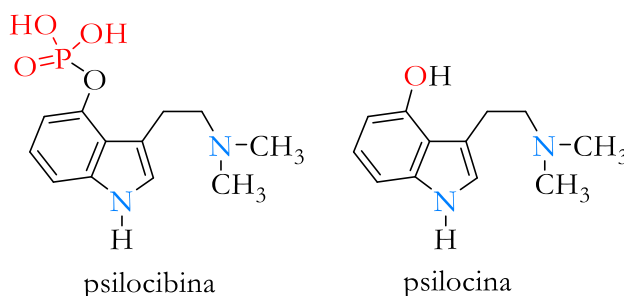
*Psilocybe cubensis* es un hongo con propiedades alucinógenas y esta investigación no solo tuvo como propósito identificar los principales compuestos psicotrópicos presentes en la especie, sino también otros metabolitos secundarios que puedan encontrarse en sus extractos. Al término del análisis químico se desarrolló una cuantificación de los compuestos mayoritarios, con el fin de contribuir a la oferta de tratamientos con productos naturales para personas que padecen trastornos psíquicos.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 El género *Psilocybe*

Los hongos del género *Psilocybe* se encuentran extensamente distribuidos en todo el mundo y su número fluctúa entre 277 y 300 especies. Es conocido que estos hongos tienen propiedades alucinógenas y desde los años 70's varios países han prohibido su cultivo, venta y uso por el estigma que adquirieron desde la conquista, lo cual ha entorpecido de manera significativa todo tipo de investigaciones ya sean científicas, medicinales o etnomicológicas (Guzmán, 2003). Existe información acerca de los efectos fisiológicos, neuroendocrinos y psíquicos de las especies de *Psilocybe* (Pérez-Rincón, 2008) en donde se plantean alteraciones cognitivas, sensoriales y de percepción del tiempo, que pueden ayudar a prevenir o tratar desórdenes neurológicos y psicológicos (Teixidó, 2018).

Los estudios químicos sobre los hongos del género *Psilocybe* se han centrado en la búsqueda de los principios activos alucinógenos, lo cual ha conducido al conocimiento de la **psilocibina** y **psilocina** (Figura 1), alcaloides de tipo indólico responsables de la actividad alucinógena de los hongos. Sin embargo, poco se ha reportado sobre otro tipo de metabolitos, ya sea primarios o secundarios. Aunque México tiene el primer lugar con más de 50 especies (Guzmán, 2005) la información sobre su composición química es escasa. Por su parte, la especie *Psilocybe cubensis* que crece en el estado de Hidalgo carece de estudios biológicos y químicos que tomen en cuenta las variaciones que diferentes zonas y condiciones climáticas generan en los metabolitos secundarios, tomando en cuenta los conceptos de genotipo y enfatizando en el fenotipo.



**Figura 1.** Estructuras químicas de psilocibina y psilocina.

## 2.2 Historia breve de los hongos *Psilocybe*

Los hongos *Psilocybe* son la fuente más antigua de psicotrópicos que se ha documentado en la historia mediante pinturas rupestres de más de 7,000 años de antigüedad, descubiertas en el desierto del Sahara en Argelia (Samorini, 2001). En lo que respecta a México, se han encontrado diversos tallados de “hongos piedra” en los estados de Veracruz y Guerrero que datan de fechas anteriores al primer milenio antes de nuestra era (Serrano, 2009); en la cultura azteca mencionan que el Tlalocan estuvo cerca de Tlalmanalco, donde encontró la escultura de Xochipilli (príncipe y señor de las flores psicodélicas), tiene grabados de flores y hongos que podrían ser *Psilocybe aztecorum* (Figura 2) (Palma Ramírez et al., 2020).



**Figura 2.** Escultura de Xochipilli exhibida en el INAH.

Las primeras menciones escritas sobre los hongos psicotrópicos en México y América de los que se tienen conocimiento fueron hechos por Fray Bernardino de Sahagún en 1530 al describir las costumbres de los Aztecas refiriéndose a los hongos como “*teonanácatl*” (*teo*: sagrado; *nanácatl*: hongo) (Sahagún, 1530). Fue hasta 1953 que Gordon Wasson y su esposa Valentina Pavlovna (buscadores de pueblos micófilos) arribaron a Huautla de Jiménez, Oaxaca y conocieron los rituales en los cuales participaba la curandera María Sabina de 61 años (experta en rituales y curaciones con hongos) (Estrada, 1979).

Una repercusión de este encuentro fue que los principios activos de los hongos sagrados se aislaron y se sintetizaron en Suiza por Albert Hofmann (descubridor del LSD), fue así como se conoció que la psilocibina y la psilocina eran los principios activos principales del efecto alucinógeno de *Psilocybe mexicana* (Figura 4) (Echeverría et al., 1979).

Hofmann fue a conocer personalmente a María Sabina y le llevó unas cápsulas de psilocibina pura, después de tomarlas durante una ceremonia en lugar de los hongos, María Sabina confirmó que “contenían el espíritu del hongo” (Hofmann, 2018). Desde entonces, varias especies de *Psilocybe* se han estudiado desde el punto de vista biológico para investigar sus propiedades alucinógenas, así como los efectos de los principios activos, los alcaloides.

Terence McKenna destaca la importancia del consumo de alcaloides como factor químico en la evolución cerebral, clasifica en tres niveles la dosificación del hongo:

- ↑ 1<sup>er</sup> nivel (dosis bajas): producen un importante aumento de la agudeza visual, en particular en la detección de límites.
- ↑ 2<sup>do</sup> nivel (dosis medias): existe tendencia a producir agitación y estimulación sexual, lo cual favorece directamente la reproducción humana.
- ↑ 3<sup>er</sup> nivel (dosis altas), los aspectos religiosos están en la vanguardia de la conciencia debido al poder y la extrañeza de la experiencia en sí misma, es el nivel de la total apertura del éxtasis chamánico.

Postula que, sea cual sea la dosis de ingesta hay un impacto en la adaptación humana, que estimula estados de creatividad que aterrizan en rituales metodológicos propios de una cultura, un lenguaje o una religión (McKenna, 1992).

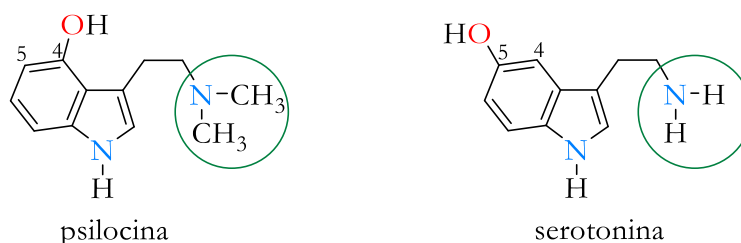
## 2.3 Efectos del consumo de hongos *Psilocybe*

Químicamente, siendo la psilocina la forma bioactiva de la psilocibina, actúa como agonista del receptor de serotonina 2A (5-HT<sub>2A</sub>R), que también es el receptor de la hormona neurológica serotonina, para proporcionar un efecto psicodélico. Estructuralmente tienen dos diferencias (Figura 3):

- ↑ La psilocina posee una amina terciaria y la serotonina una amina primaria.
- ↑ El grupo -OH se encuentra en la posición 4 del anillo aromático de la psilocina, mientras que en la serotonina se encuentra en la posición 5 del anillo.



La psilocina puede unirse al receptor 5-HT<sub>2A</sub>R con una afinidad mayor que la serotonina gracias a su amina terciaria, y no a la sustitución alterada del grupo hidroxilo en el anillo (Hakami et al., 2023).



**Figura 3.** Diferencias entre las estructuras químicas de psilocina y serotonina.

Es necesario considerar la clasificación de los procesos psicológicos básicos: sensopercepción, atención, aprendizaje, memoria, motivación, emoción, pensamiento, lenguaje e inteligencia, ya que, estos procesos son alterados cuando se consumen hongos psicotrópicos. Vygotski resalta la interacción social como método de aprendizaje, lo cual justifica la propagación de la ingesta de hongos del género *Psilocybe* desde el tiempo de los homínidos, como lo postula McKenna (Mestre & Palmero, 2004) (McKenna, 1992).

Algunos estudios describen alteraciones en la percepción del pensamiento, la emoción y la conciencia. Los efectos mentales incluyen euforia, paz, claridad mental, alteración en la percepción del tiempo y del espacio, desconexión del entorno y experiencias irreales. En cuanto a los efectos visuales se pueden ver luces, objetos y pinturas cobrando vida, formas caleidoscópicas y cambios en la percepción de los colores (más brillantes e intensos) (Andersson et al., 2009).

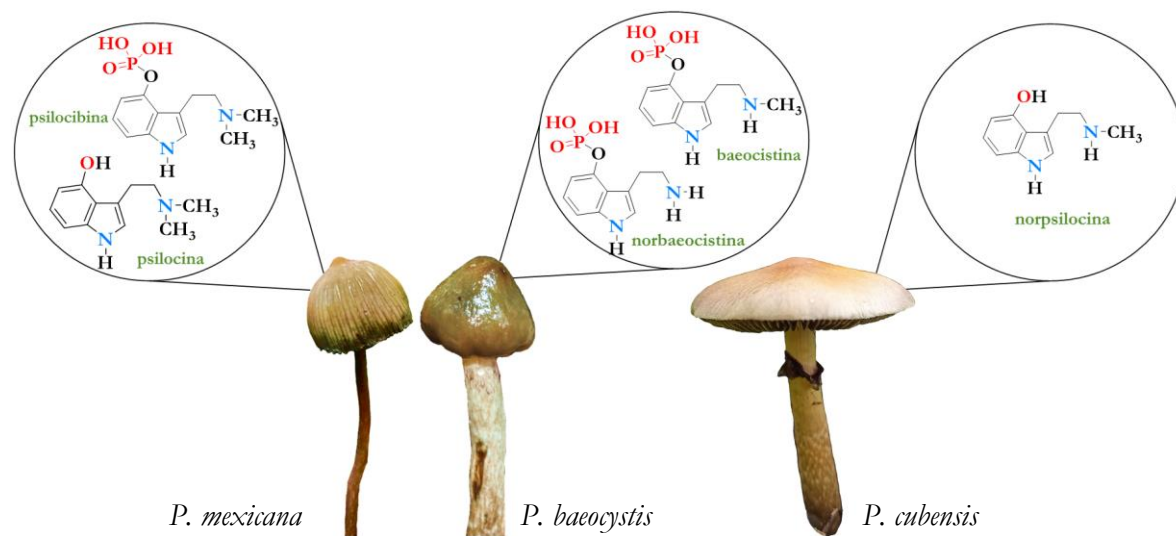
A diferencia de otras sustancias psicoactivas, estos alcaloides inducen a experiencias diferentes a las de la conciencia ordinaria y son comparadas con estados de conciencia no ordinaria como lo son los sueños, el trance o la meditación. Por consiguiente, los efectos varían de manera considerable en todas las personas, incluso en la misma persona, pero en diferentes ocasiones (García, 2016).

Se podría dar una justificación científica del por qué las experiencias con hongos *Psilocybe* son tan profundas para las personas si se combina la teoría de la información y los principios físicos de la termodinámica. Un protocolo experimental publicado recientemente por el Dr. Melvin Vopson postula la teoría de la equivalencia entre masa-energía-información (lo que sugiere que la masa puede expresarse como energía o información, o viceversa). Esta propuesta sitúa a la información como el quinto estado de la materia del universo (Vopson, 2022).

## 2.4 Alcaloides conocidos en hongos *Psilocybe*

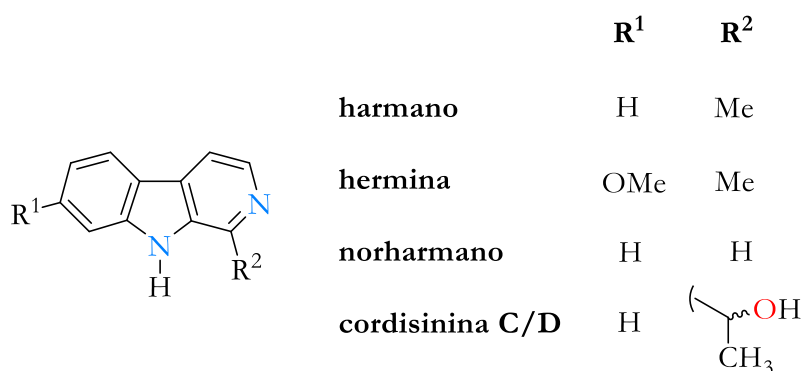
Los principales alcaloides en estos hongos, psilocibina y psilocina, fueron identificados por primera vez en *Psilocybe mexicana* por Albert Hofmann y colaboradores en 1958 (Hofmann et al., 1959). 10 años después, dos análogos de psilocibina, **baeocistina** y **norbaeocistina** se aislaron de *P. baeocystis* (Figura 4) (Leung & Paul, 1968).

No fue sino hasta el 2017 que se identificó otro alcaloide como producto natural en *Psilocybe*, **norpsilocina** (Figura 4), identificado en *P. cubensis*. Norpsilocina es una variante de psilocina con un sólo grupo metilo en el nitrógeno alifático, ha sido descrita como producto de síntesis y como compuesto artificial de la desfosforilación de extractos de *Psilocybe* (Lenz et al., 2017).



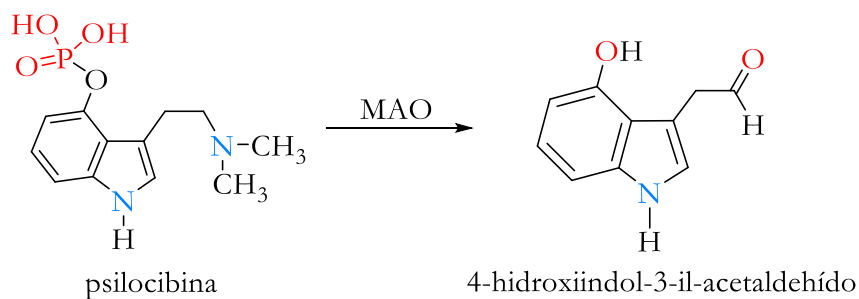
**Figura 4.** Fotografías de diferentes especies del género *Psilocybe* con sus respectivos alcaloides.

Después de 63 años de estudios químicos sobre especies de *Psilocybe*, parecía que los alcaloides presentes en ellas poseían sólo estructura de triptamina. Sin embargo, en el 2020 Dirk Hoffmeister y colaboradores demostraron la presencia alcaloides con estructura de  $\beta$ -carbolina en cantidades traza en *P. mexicana*, *P. cubensis*, *P. cyanescens*, y *P. semilanceata* (Blei et al., 2020). Así, harmano, harmina, norharmano y perlolirina se identificaron en las cuatro especies, mientras que un posible isómero de cordisinina C/D también se consideró como metabolitos de *P. mexicana* (Figura 5).



**Figura 5.** Estructuras químicas de los alcaloides tipo  $\beta$ -carbolina encontrados en *Psilocybe*.

Aunque las  $\beta$ -carbolidinas se identificaron en cantidades traza, es interesante su producción simultánea con psilocibina y psilocina debido a que es conocido que tienen propiedades inhibitorias de la enzima monoamino oxidasa (MAO). La MAO inactiva a la psicotrópica psilocina mediante su transformación en **4-hidroxiindol-3-il-acetaldehído** (Figura 6) (Blei et al., 2020).



**Figura 6.** Estructura química de 4-hidroxiindol-3-il-acetaldehído.

## 2.5 *Psilocybe cubensis* (Earle) Singer, 1948

*Psilocybe cubensis* (Earle) Singer tiene particularidades como crecer en un ambiente húmedo con clima tropical que, siendo coprófilo, se puede encontrar en excremento de ganado de pastoreo (bovinos, caprinos) (Stamets, 1996).

Es una de las especies más utilizadas para su consumo debido a que presentan un mayor rango de distribución y están asociadas a ambientes disturbados, con ganado, por lo que generalmente se encuentran en cercanías de centros urbanos (Alban-J. et al., 2021).

El hongo (Figura 7) posee un píleo de 0.3 a 2.2 cm de ancho, su forma es de cónica a convexa, con una pequeña papila cuando es joven. Su color es amarillo o café en el centro y blanquecino en el margen y con una superficie lisa. El estípite de esta especie posee un color blanquecino amarillento, mientras que sus láminas son de color gris, volviéndose oscuras, casi negras con la edad. A medida que se desarrolla el velo, deja un anillo membranoso blanco que se oscurece con el tiempo (Instituto de Salud Pública de Chile. Ministerio de Salud., 2023).

La clasificación taxonómica de este género, según Index Fungorum, es la siguiente: dominio Eucariota, reino Fungi, filo Basidiomycota, clase de los Agaricomycetes, del orden de los Agaricales, de la familia Hymenogastraceae, el género *Psilocybe* y la especie *cubensis* (Index Fungorum, 2023).



**Figura 7.** Características macroscópicas de *P. cubensis* (Earle) Singer silvestre.

### 3. HIPÓTESIS

---

El estudio químico de *Psilocybe cubensis* (Earle) Singer que crece en el estado de Hidalgo conducirá al conocimiento de sus principales alcaloides, así como de otro tipo de metabolitos primarios y secundarios que no han sido descritos en esta clase de organismos, tales como ácidos grasos, esteroides y triterpenos.

### 4. OBJETIVOS

---

#### 4.1 General

Analizar químicamente la especie *Psilocybe cubensis* que crece en el estado de Hidalgo mediante técnicas cromatográficas y espectroscópicas para aportar información sobre su composición química y contribuir al conocimiento de productos naturales con potencial aplicación para el tratamiento de trastornos psíquicos.

#### 4.2 Específicos

- † Colectar la especie *Psilocybe cubensis* del estado de Hidalgo.
- † Analizar la morfología del hongo silvestre.
- † Obtener extractos por diversos métodos físicos de la especie y determinar el mejor método de extracción para la especie.
- † Separar los extractos mediante técnicas físicas y cromatográficas hasta aislar sustancias puras.
- † Caracterizar por métodos físicos y espectroscópicos los principales metabolitos primarios y secundarios presentes en el extracto.
- † Comparar los principales metabolitos secundarios del hongo silvestre y de cultivo.
- † Cuantificar los compuestos mayoritarios identificados de *Psilocybe cubensis*.
- † Evaluar la actividad ansiolítica y antidepresiva del extracto metanólico.

## 5. JUSTIFICACIÓN

---

Los hongos del género *Psilocybe* tienen importancia biocultural y ancestral, dado que se han utilizado en ceremonias mágico-religiosas para sanar al “espíritu”. Es conocido que varias de estas especies poseen propiedades alucinógenas que se atribuyen a dos alcaloides de tipo indólico conocidos, la psilocibina y la psilocina.

A pesar del importante uso tradicional, pocos estudios químicos se han llevado a cabo sobre estos hongos, los cuales, se han enfocado a la detección y caracterización de los alcaloides alucinógenos. En este sentido, la especie *Psilocybe cubensis* (Earle) Singer que crece en el estado de Hidalgo no cuenta con estudios químicos ni biológicos, esta investigación emprende su estudio químico con la finalidad de conocer la composición química de sus extractos, y no sólo detectar y caracterizar los alcaloides psicotrópicos.

A nivel mundial, con la llegada de la pandemia por COVID-19 se ha generado un incremento en los casos de ansiedad, depresión y adicciones tanto en hombres y mujeres (IAPA, 2023), y el suicidio se ha convertido en la cuarta causa de muerte en personas de 15 a 29 años (OMS, 2023). Los trastornos depresivos, de ansiedad y las adicciones son los que más afectan en México (Puebla, 2020). De acuerdo con las estadísticas, las muertes por suicidio a causa de trastornos depresivos han ido en aumento, siendo el año 2021 (el segundo año de la pandemia por COVID-19) donde se presentó la tasa más alta (INEGI, 2023).

Un dato importante es que, aunque existen tratamientos para los trastornos psíquicos, más del 75% de las personas afectadas de los países de bajo y mediano ingreso no reciben tratamiento alguno (OMS, 2023).

Al término de este estudio se pretende obtener un extracto cuantificado de *Psilocybe cubensis*, el cual, sirva de comparación para el análisis cualitativo de otros lotes del hongo y permita optimizar una posible ruta de acción para el uso terapéutico (facilitará la identificación de los cambios en los procesos psicológicos básicos que causa el consumo del hongo) de este producto natural en personas con trastornos psíquicos.

## 6. PARTE EXPERIMENTAL

---

### 6.1 Procedimientos generales

Para el análisis microscópico del hongo silvestre y de cultivo se utilizaron dos tipos de microscopios: un Leica Zoom 2000 estereoscópico (para cortes) y un Velab Prime VE-T300 compuesto, equipado con una cámara de 10 megapíxeles del modelo VE-LX1000 de la misma marca. Las imágenes resultantes se procesaron y analizaron con el software ImageView. La preparación del colorante necesario para la tinción con rojo Congo se realizó en el laboratorio.

La identificación cualitativa de alcaloides se efectuó mediante el empleo de reveladores colorimétricos, tales como el reactivo de Dragendorff, el reactivo de Ehrlich y el reactivo de Van Urk. Para la identificación de otros tipos de compuestos, se utilizaron reveladores como sulfato cérico amoniacal  $[(\text{NH}_4)_4\text{Ce}(\text{SO}_4)_4]$ , y cloruro de cobalto ( $\text{CoCl}_2$ ). En todos los casos, se emplearon cromatofolios de gel de sílice dispuestos sobre aluminio de dimensiones 3 x 5 cm.

Las separaciones cromatográficas de los compuestos con baja polaridad se efectuaron empleando gel de sílice marca Sigma-Aldrich 60 Å (230–400 mesh), en columnas de vidrio de 2 cm de diámetro interno por 60 cm de altura. La separación por cromatografía en capa fina se realizó en cromatoplasmas de gel de sílice sobre aluminio de 2 x 5 cm y 3 x 5 cm.

Las separaciones cromatográficas de los compuestos con alta polaridad se llevaron a cabo empleando celulosa microcristalina marca (Merk) Avicel <20 µm, en columnas de vidrio de 1 y 5 cm de diámetro interno por 60 cm de altura.

Los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  a 400 MHz y  $^{13}\text{C}$  a 100 MHz, así como los experimentos en dos dimensiones (COSY, HSQC y HMBC) se realizaron en un equipo Bruker de 400 MHz, usando como disolventes  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{D}_2\text{O}$ , Metanol- $d_4$  y DMSO- $d_6$ .

Los espectros de IR se determinaron en un espectrómetro IR de la marca Perkin Elmer: Spectrum GX FT-IR System en pastillas de KBr para todos los compuestos.

Los puntos de fusión se midieron en el equipo marca BÜCHI, Melting Point B-540 usando tubos capilares abiertos.

Las rotaciones ópticas se determinaron en H<sub>2</sub>O y CHCl<sub>3</sub> en un polarímetro marca Perkin Elmer 341 utilizando la línea del espectro de emisión de Na y Hg.

La determinación estructural de rayos-X de monocristal se realizó con un difractómetro Gemini (Agilent), con detector Atlas, fuente de radiación de rayos-X de CuK $\alpha$  ( $\lambda = 1,54184 \text{ \AA}$ ) a 293(2) K en modo de exploración  $\omega$ ; el refinamiento de unidades se ejecutó utilizando 5022 reflexiones detectadas, utilizando el software CrysAlisPro, Agilent Technologies, v.1.171.34.49.

El análisis por UHPLC-MS se realizó utilizando un sistema ACQUITY UPLC-H Class PLUS de la marca Waters con una columna X-terra RP-18 con tamaño de poro de 125  $\text{\AA}$  y tamaño de partícula de 3.5  $\mu\text{m}$ , 4.6 x 100 mm, a temperatura de 40°C, la evaluación de masas estuvo en un rango de 100 a 500 Da, con la detección del ion en modo positivo.

## 6.2 Material fúngico

En agosto de los años 2021 y 2022 se recolectaron dos lotes de *Psilocybe cubensis* (Earle) Singer en el municipio de Xochicoatlán, Hidalgo (Figura 10). También se obtuvieron tres lotes de *P. cubensis* (Earle) Singer provenientes de cultivo controlado (Figura 11).

Se analizó la morfología de cada lote (hongo silvestre y hongo de cultivo) para confirmar la identidad de la especie, para la identificación macroscópica (Figuras 12 y 14) se observó el píleo de forma aplanada, con colores que variaron desde blanco con centro en tonos amarillos, hasta color castaño oscuro con centro anaranjado, textura lisa, láminas y esporas de color café oscuro o negro, anillo o velo de color blanco. Estípites de forma cilíndrica con escamas, al rasgarse se tornó azul o verde-azulado.

Para el análisis microscópico se realizaron cortes del himenio (correspondiente a las láminas) los cuales se tiñeron con rojo Congo al 1%; se caracterizó la forma y tamaño de las esporas, la presencia de basidios, pleurocistidios y queilocistidios, que son característicos de esta especie (Alban-J. et al., 2021) (Figuras 13 y 15), además, se realizó una comparación de la morfología del hongo silvestre y de cultivo.



## 6.3 Extracción, identificación y aislamiento

Los hongos silvestres y de cultivo secos y triturados (carpóforos) se extrajeron por diferentes metodologías:

### ↑ Extracción por reflujo secuencial con gradiente de polaridad

El carpóforo fue sometido a extracción mediante reflujo durante 6 horas y, de manera secuencial, con hexano, AcOEt y MeOH grado HPLC, utilizando la misma cantidad de cada uno. Posteriormente, el producto se filtró y concentró en el rotavapor con vacío para obtener los tres extractos correspondientes.

Con el extracto hexánico, se llevó a cabo una CC utilizando sílice como fase estacionaria y Hexano-AcOEt (9:1) como fase móvil; se colectaron fracciones de 20 mL. En el eluato 5 se aisló y caracterizó el **ergosterol** (cristales incoloros con forma de aguja). Se realizaron análisis de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  (Figuras 30 y 31), así como los experimentos COSY (Figura 32), HSQC (Figura 64), HMBC (Figura 65) y el espectro de IR (Figura 74).

Con el extracto de AcOEt, se realizó una CC con sílice como fase estacionaria y  $\text{CHCl}_3$ -AcOEt (4:1) como fase móvil. Se colectaron fracciones de 10 mL y en los eluatos 4 y 5 se identificó y caracterizó el **peróxido de ergosterol** (polvo blanco). Se llevaron a cabo análisis de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y experimento COSY (Figuras 37, 38 y 39), así como de 2D (Figuras 66 y 67).

### ↑ Extracción con MeOH HPLC por ultrasonido

El carpóforo fue extraído con MeOH grado HPLC mediante agitación asistida por ultrasonido durante 4 h, utilizando una frecuencia de 53 KHz y una temperatura de 40 °C. Posteriormente, se filtró y concentró en el rotavapor con vacío (40 °C, 337 mbar), resultando en la obtención de un extracto. A partir de una pequeña cantidad del extracto disuelto en  $\text{H}_2\text{O}$  destilada, se llevó a cabo una separación bifásica líquido-líquido (partición) con  $\text{Et}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$  en proporción 1:1. Se realizaron tres lavados con la fase orgánica, la cual se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se filtró y concentró en el rotavapor con vacío; el proceso se repitió con la fase acuosa, excluyendo el secado con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro.

Con el apoyo de los reveladores colorimétricos para alcaloides, se determinó que estos estaban presentes en las fases acuosas.

La fase acuosa se sometió a CC utilizando celulosa microcristalina como fase estacionaria y *n*-BuOH saturado con H<sub>2</sub>O como fase móvil. Se recogieron fracciones de 5 mL en viales de cristal, y las pruebas colorimétricas para alcaloides resultaron positivas en los eluatos 31-36.

Uno de los eluatos se utilizó para llevar a cabo una CC utilizando gel de sílice C18 como fase estacionaria y MeOH como fase móvil. Se recogieron fracciones de 2 mL en viales de cristal. En el eluato 5, se aisló y caracterizó el alcaloide principal, **la psilocibina** (resina ámbar oscura). Se realizaron análisis de RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C (Figuras 51 y 52), junto con experimentos COSY, HSQC y HMBC (Figuras 53, 72 y 73 respectivamente).

### ↑ Extracción con MeOH HPLC por reflujo

El carpóforo se extrajo con MeOH grado HPLC sometándose a un reflujo por 6 h, finalmente se filtra y se concentra en el rotavapor con vacío (40 °C, 337 mbar), obteniéndose el extracto correspondiente. En este producto se observó la formación de cristales incoloros, los cuales, correspondieron al disacárido **α,α-trehalosa**; Los cristales fueron adecuados para su estudio por difracción de rayos-X de monocristal (Figura 76), RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C (Figuras 42 y 43), experimentos COSY, HSQC, HMBC (Figuras 44, 69 y 70 respectivamente) y espectro de IR (Figura 75).

### ↑ Extracción con CH<sub>3</sub>COOH al 5%

El carpóforo fue sometido a extracción por maceración durante 30 días con CH<sub>3</sub>COOH glacial al 5% en H<sub>2</sub>O. Luego, se filtró y concentró en el rotavapor con vacío para obtener el extracto correspondiente, que presentó un color café oscuro y una consistencia aceitosa. Su análisis por RMN de <sup>1</sup>H (Figura 57) evidenció la presencia de **α- y β-D-glucopiranosas**.

## 6.4 Actividad antidepresiva y ansiolítica

Los estudios biológicos se llevaron a cabo en el Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz (INPRFM) ubicada en la CDMX, en colaboración con la Dra. María Eva González Trujano. A continuación, se describe de manera breve en qué consistieron las pruebas preclínicas.

### ↑ Efecto ansiolítico y antidepresivo en modelo murino

En el estudio se utilizaron ratones machos de la cepa Swiss Webster, con un peso de 25 - 30 g y una edad de  $8 \pm 1$  semanas, los cuales, fueron criados en las instalaciones del bioterio del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz (INPRFM).

Los animales se mantuvieron en condiciones estándares de laboratorio de investigación con un entorno a una temperatura constante de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  y un ciclo de luz/oscuridad de 12 h. Se organizaron en grupos de al menos 6 ratones y se les proporcionó acceso ilimitado a alimentos y agua (*ad libitum*).

El protocolo experimental se llevó a cabo de acuerdo con las pautas establecidas en la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999), los lineamientos del comité institucional (registro previo para el uso de modelos experimentales en ratones bajo el No. CONBIOETICA-09-CEI-010-20170316), así como las directrices del Comité de Bioseguridad CB-005/2023 y los proyectos de investigación NC12.3280.0/NC17073.0.

Los fármacos de referencia como ansiolíticos y antidepresivos fueron la Buspirona (BUS), la Fluoxetina (FLX) y la Imipramina (IMI), respectivamente, obtenidos de Sigma Aldrich (St. Louis Mo, USA).

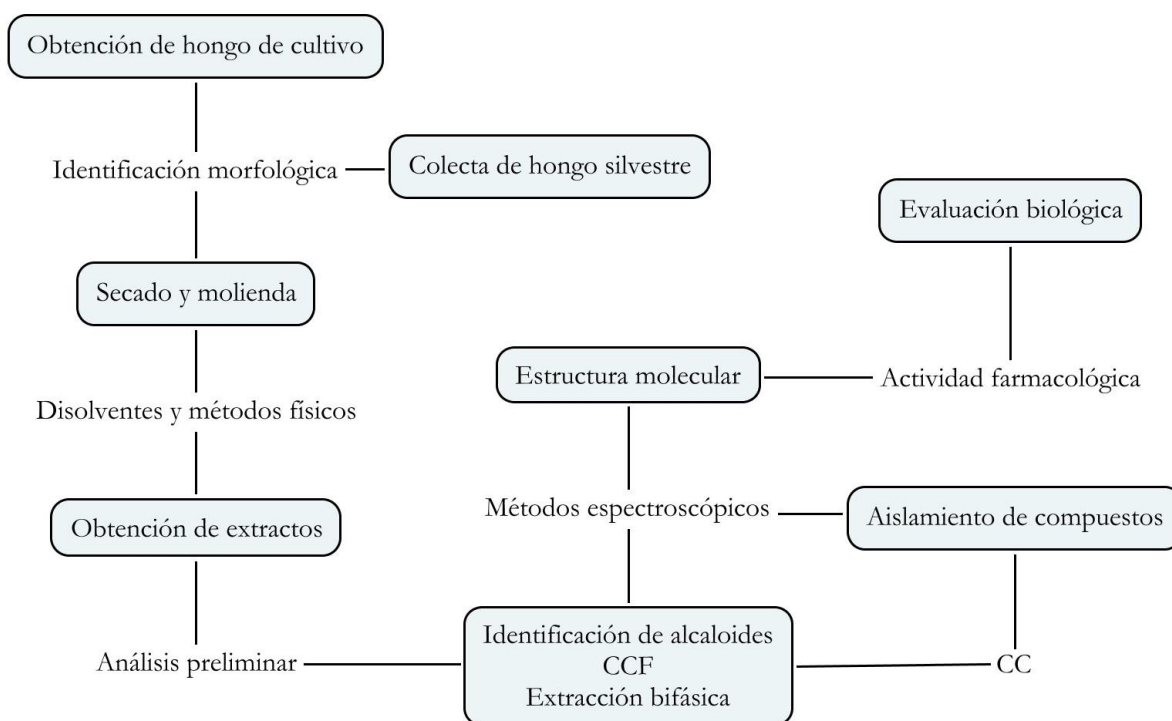
El hongo *P. cubensis* (Earle) Singer completo, el extracto metanólico por ultrasonido, así como sus particiones, se resuspendieron en agua destilada o en tween 80 al 0.5%, respectivamente, para su administración tanto por vía enteral (gastroesofágica, p.o.) como parenteral (intraperitoneal, i.p.) en un volumen de administración de 0.2 mL/10 g de peso corporal para las

dosis más altas (1000 mg/kg), y en 0.1 mL/10 g de peso corporal para las dosis bajas (1, 10, o 100 mg/kg) y para los fármacos de referencia.

Las dosis utilizadas en el diseño experimental fueron seleccionadas basándose en investigaciones previas de la literatura científica o en experimentos preliminares realizados en el laboratorio de Neurología de Productos Naturales del INPRFM (González-Trujano et al., 2021).

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La metodología empleada en el desarrollo del proyecto se presenta en la figura 8, este proceso abarca desde la obtención y recolección de hongos tanto de cultivo como silvestres, pasando por la identificación macroscópica y microscópica, hasta llegar al secado y molienda del material fúngico. Posteriormente, se lleva a cabo la extracción de compuestos mediante diversos métodos físicos y disolventes, seguido de un análisis preliminar mediante CCF y separaciones bifásicas. La CC se emplea para aislar compuestos específicos, los cuales son sometidos a un análisis a través de métodos espectroscópicos y físicos. Este análisis tiene como objetivo determinar la estructura molecular de los compuestos obtenidos. Finalmente, se realiza una evaluación biológica a través de pruebas preclínicas para analizar la actividad farmacológica de los compuestos identificados. Este enfoque integral garantiza una comprensión detallada de los aspectos químicos del proyecto.



**Figura 8.** Metodología para el desarrollo del proyecto.

## 7.1 Obtención, identificación y conservación del material fúngico

### 7.1.1 Sitio de recolecta y conservación de la biomasa

*Psilocybe cubensis* se recolectó de forma aleatoria en la zona Norte del estado de Hidalgo, dentro de la Sierra Madre Oriental de la Huasteca Hidalguense: Xochicoatlán (*xochitl*: flor y *cuauhtl*: árbol, “lugar de árboles que florecen”) (Figura 9). Colinda al norte con los municipios de Lolotla y Calnali; al este con el municipio de Tianguistengo; al sur con los municipios de Tianguistengo, Zacualtipán y Metztitlán; al oeste con los municipios de Metztitlán, Molango y Lolotla; se encuentra a una altitud sobre el nivel del mar de 1,680 metros (Mayorga-Saucedo et al., 1998). Posee un clima templado húmedo con régimen de lluvias de verano, porcentaje de lluvias de invierno mayor de 10.2, oscilación anual de las temperaturas mensuales extremas (entre 12°C a 22 °C). Los Ríos de Chinameca, Tecamachal y Xocontla cruzan el municipio, mayoritariamente hay sierras altas escarpadas y mesetas con lomeríos, por lo que cuenta con acantilados (INEGI, 2010).



**Figura 9.** Sitio de recolecta. Xochicoatlán, Hidalgo.

Se realizó una recolecta por año, en la primera (2021) se obtuvieron 581 g frescos, los cuales se secaron enteros a la sombra por 30 días en un espacio limpio, con ventilación y protegido para

evitar la presencia de insectos, roedores, animales domésticos o restos de estos animales. El peso de los hongos secos fue de 49.2 g, teniendo una pérdida aproximada del 91.5% de agua.

En la segunda (2022) se recolectaron 594 g de hongo fresco, los cuales se secaron a la sombra por 30 días. El peso de los hongos secos fue de 68.1 g, teniendo una pérdida de 88.54 % de agua. Además, se recolectaron 121.9 g de estiércol de vaca donde había micelio del hongo.

El hongo recolectado cumplió con las características macroscópicas descritas en la literatura (Stamets, 1996), de las cuales destacaron: color que varió de blanco a castaño oscuro con centro en tonos amarillos, láminas y esporas de color café oscuro, anillo o velo de color blanco y al rasgarse tomó un color azul marino (Figura 10).



**Figura 10.** Ejemplares de *P. cubensis* (Earle) Singer silvestre en diferentes etapas de madurez encontrados en estiércol de vaca en la zona de Xochicoatlán.

Por otro lado, se obtuvieron tres lotes de *Psilocybe cubensis* de cultivo. El primer lote (2021) pesó 1 Kg fresco, el cual se dejó secar por dos semanas y tuvo una pérdida aproximada de 92.52% de agua; el peso del hongo deshidratado fue 74.8 g.



El segundo lote (2022) tuvo un peso de 255.6 g deshidratado, perdiendo aproximadamente 91% en agua. El tercer lote (2023) tuvo un peso de 128.9 g deshidratado, perdiendo aproximadamente 90% en agua.

El hongo de cultivo presentó algunas variaciones de coloración y forma (tanto en vista lateral como en el centro) del píleo en comparación a las descritas en la literatura (Delgado Fuentes, 1989). Las características macroscópicas que destacaron fueron: color castaño oscuro, láminas y esporas de color café oscuro, anillo o velo de color blanco y, al rasgarse, tomó un color azul marino (Figura 11).



**Figura 11.** Ejemplares de *P. cubensis* (Earle) Singer de cultivo en diferentes etapas de madurez.

### 7.1.2 Identificación morfológica del hongo

La identificación morfológica se realizó mediante observación y análisis tanto macroscópico como microscópico, se siguieron los estándares y terminología propuesta por Largent et al., 1977, Delgado Fuentes, 1989 y Alban-J. et al., 2021. En el análisis microscópico se realizaron cortes a mano alzada con ayuda de un microscopio estereoscópico; se examinaron diversas estructuras como las esporas, los basidios y cistidios con un microscopio compuesto.



Las muestras se tiñeron con rojo Congo al 1%, las dimensiones se determinaron directamente utilizando objetivos de 40X y 100X, este último con aceite de inmersión; se capturaron fotografías con una cámara incorporada de 10 MP marca Velab y analizadas con el software ImageView.

Los autores de los nombres científicos se indican de acuerdo al Index Fungorum—Authors of Fungal Names (revisado en 2023) (Index Fungorum, 2023).

Finalmente, el material recolectado fue procesado y posteriormente un ejemplar se depositó en el Herbario “Gastón Guzmán Huerta” de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional con número de referencia 121805.

#### 7.1.2.1 Hongo silvestre

*Psilocybe cubensis* (Earle) Singer, (1948) = *Stropharia cubensis* Earle, = *S. caerulescens* (Pat.) Singer, = *S. cyanescens* Murril, = *S. subcyanescens* Rick = *Naematoloma caerulescens* Pat., = *Hypholoma caerulescens* (Pat.) Sacc. et Trotten, = *Psilocybe cubensis* var. *caerulescens* (Pat.) Singer et A. H. Smith, = *P. cubensis* var. *cyanescens* (Murrill) Singer et A. H. Smith (Guzmán, 2005).

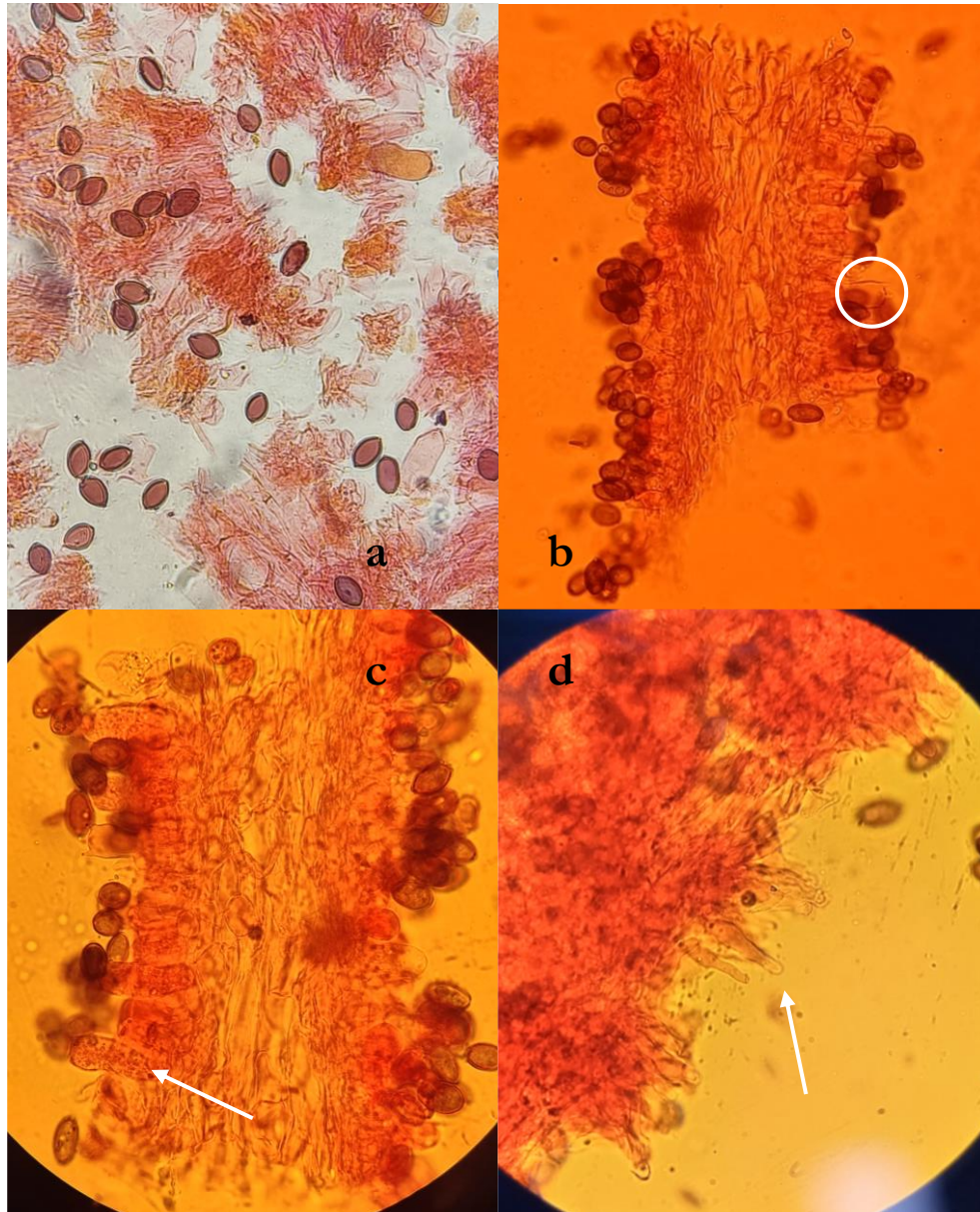
Hábito de crecimiento gregario, coprófilo de píleo con tamaño promedio de 70 x 14 mm de diámetro con variaciones de color de castaño claro a naranja claro, forma plano-convexa en vista lateral y orbicular en vista apical, centro umbonado con superficie seca y borde entero. Láminas de 24 x 13 mm con tonalidad grisácea subdistantes y subadheridas, siendo ventricosas con borde liso. El estípite de 85 mm de largo con unión central al píleo, de forma cilíndrica con una base subbulbosa de consistencia cartilaginosa y hueco. Superficie glabra con escamas, al ser lesionado cambia de color a azul marino o negro en ejemplar deshidratado. Velo o anillo de color blanco en una posición subapical, con permanencia fija y estructura simple, unión peronada o envolvente (del velo con el estípite) y membranáceo (Figura 12).



**Figura 12.** Basidiomas de *P. cubensis silvestre*. a) Especímen maduro. b) Primordio. c) Láminas. d) Píleo en vista apical. e) Corte longitudinal del estípite. f) Forma de la lámina. g) Corte transversal del estípite.

Esporas con tamaño promedio de  $10.3 \mu\text{m}$  de largo y  $6.2 \mu\text{m}$  de ancho, bilateralmente simétricas en vista frontal y, de acuerdo al coeficiente Q (Largent et al., 1977), heterodiamétricas elípticas con pared gruesa y lisa. Basidios con tamaño promedio de  $20.4 \mu\text{m}$  de largo por  $7.8 \mu\text{m}$  de ancho de pared delgada y esterigmados.

Pleurocistidios con tamaño promedio de 21.8  $\mu\text{m}$  de largo por 10  $\mu\text{m}$  de ancho de pared delgada, cilíndricos a ventricosos. Queilocistidios con tamaño promedio de 17.3  $\mu\text{m}$  de largo por 5  $\mu\text{m}$  de ancho de pared delgada, ventricosos a anchamente filiformes y abundantes (Figura 13).

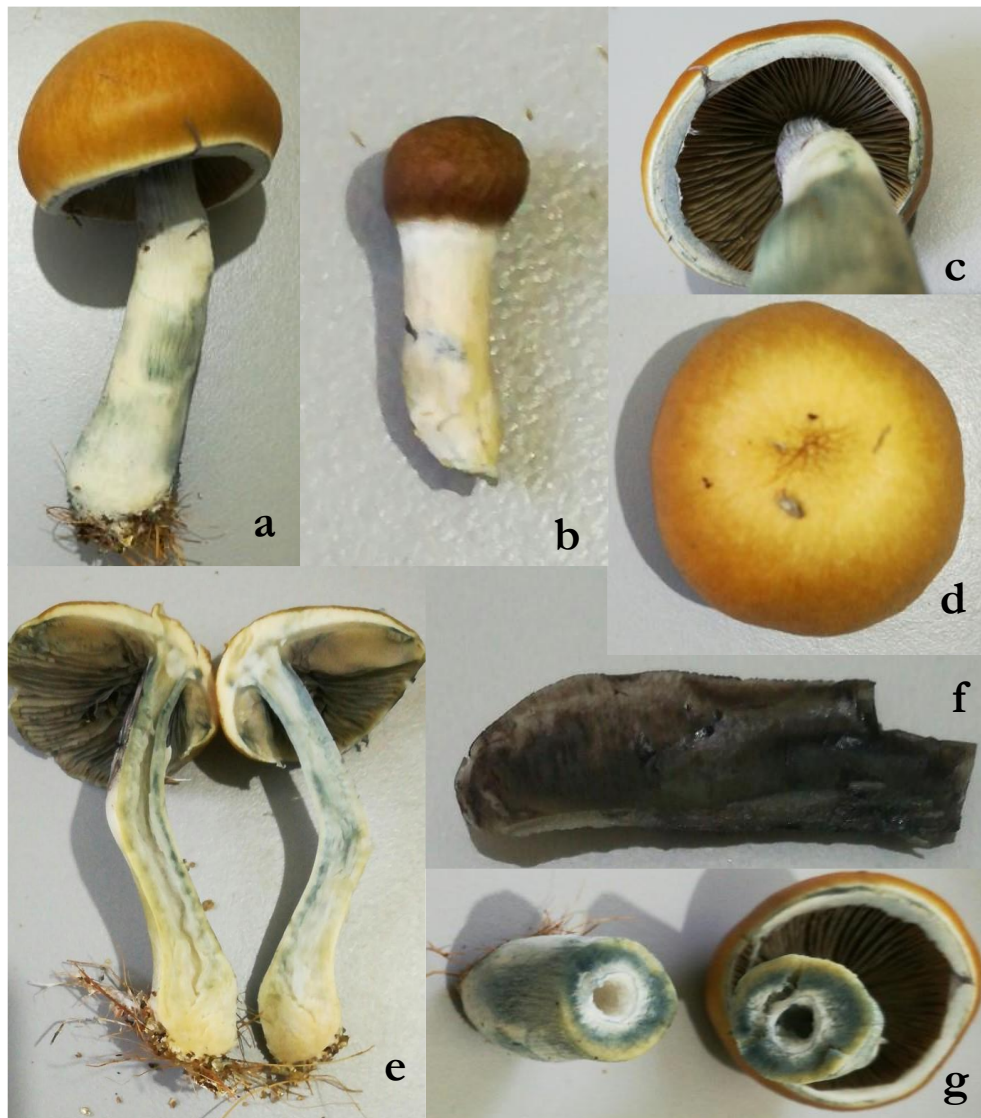


**Figura 13.** Microscopia de *P. cubensis* silvestre. a) Esporas. b) Basidios con esterigmas. c) Pleurocistidios. d) Queilocistidios.



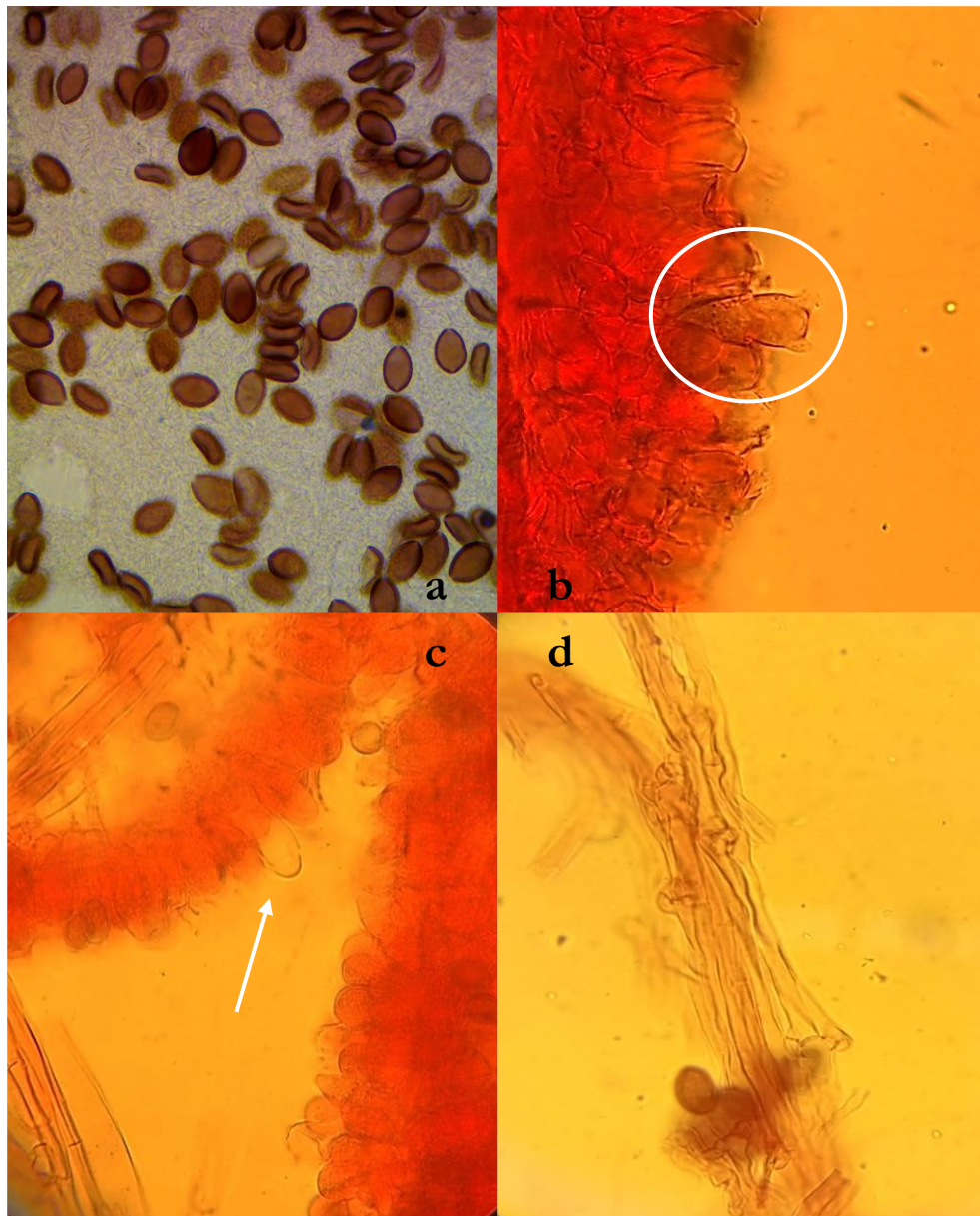
### 7.1.2.2 Hongo de cultivo

Hábito de crecimiento gregario con unión estipitada del cuerpo fructífero al sustrato. Píleo con variaciones de color de naranja oscuro a castaño oscuro, de forma pulviniforme en vista lateral y orbicular en vista apical, centro obtuso con superficie seca; su margen tuvo forma decurvada en corte longitudinal con borde entero y unión al contexto heterogéneo. Las láminas, de tonalidad grisácea, subdistantes y adheridas de forma ancha y borde liso.



**Figura 14.** Basidiomas de *P. cubensis* de cultivo. a) Especimen maduro. b) Primordio. c) Láminas. d) Píleo en vista apical. e) Corte longitudinal del espécimen. f) Forma de la lámina. g) Corte transversal del estípite.

El estípite con unión central al píleo, forma cilíndrica con base subbulbosa y contexto hueco. Superficie lisa y sin escamas, al ser lesionado con cambio de color a azul verdoso o negro en ejemplar deshidratado. Velo parcial de color blanco, en posición subapical con permanencia temporal y estructura de banda (Figura 14).

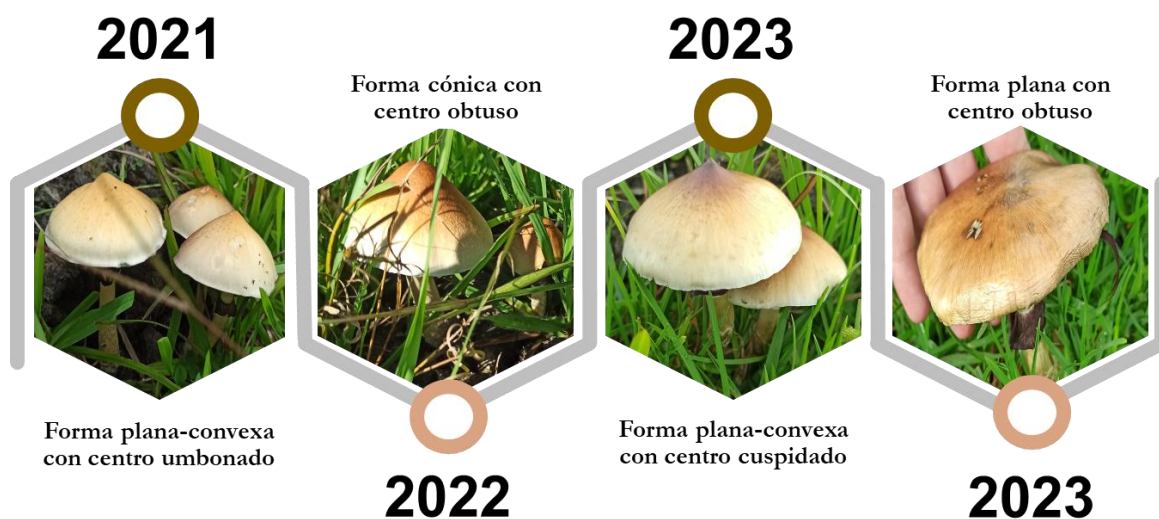


**Figura 15.** Microscopia de *P. cubensis* de cultivo. a) Esporas. b) Basidios con esterigmas. c) Pleurocistidios. d) Fibrulas.

Esporas con tamaño promedio de 12  $\mu\text{m}$  de largo y 7.5  $\mu\text{m}$  de ancho, bilateralmente simétricas y subhexagonales en vista frontal, heterodiamétricas elípticas con pared gruesa y lisa de acuerdo al coeficiente Q (Largent et al., 1977). Basidios de pared delgada y esterigmados, pleurocistidios de pared delgada con forma cilíndrica a ventricosa, fíbulas en abundancia (Figura 15).

Durante las recolecciones efectuadas en los últimos tres años, se identificaron modificaciones en la morfología y coloración del píleo de *P. cubensis* (Figura 16). Estas alteraciones se atribuyen a factores ambientales, como las condiciones físicas y químicas del entorno. En relación al estípite, láminas, la coloración azul al lastimar el hongo, así como el análisis microscópico, se observaron cumpliendo con todas las características descritas en la literatura (Alban-J. et al., 2021).

En la zona, se registró una notable reducción en el crecimiento del micelio y, como resultado, en la fructificación del hongo debido a la manipulación humana en el ambiente (deforestación, contaminación, mala técnica de recolección de hongos, escasez hídrica, etc.) (Moreno et al., s.f.).



**Figura 16.** Variaciones anuales en las características macroscópicas del píleo de *P. cubensis* silvestre.

## 7.2 Obtención de extractos

Los hongos enteros y secos de cada lote silvestre y de cultivo se molieron de forma mecánica en un mortero, ya triturados se sometieron a diversos métodos de extracción. La escasez de hongos silvestres para la obtención de extractos destacó la necesidad de enfocarse en el estudio químico de hongos cultivados.

A continuación, se describen los métodos de extracción que arrojaron los mejores resultados:

### 7.2.1 Hongos silvestres

#### 7.2.1.1 Extracción secuencial por reflujo

El primer lote recolectado de hongo silvestre seco (2021) fue procesado, pesando 49.2 g. El carpóforo fue extraído mediante reflujo durante 6 h, de manera secuencial, utilizando hexano al 99%, AcOEt grado HPLC y MeOH grado HPLC (450 mL de cada uno). Posteriormente, cada fracción fue filtrada y concentrada en el rotavapor con vacío (40 °C), obteniendo así los extractos respectivos de hexano (0.3101 g), AcOEt (0.4485 g) y MeOH (3.7983 g) (Figura 17). La consistencia de los extractos hexánico y AcOEt fue pastosa, mientras que la del extracto metanólico fue aceitosa.



**Figura 17.** Extractos obtenidos mediante reflujo secuencial del hongo silvestre. De izquierda a derecha: hexano, AcOEt y MeOH.



### 7.2.1.2 Extracción con MeOH por ultrasonido

Se llevó a cabo con el carpóforo del segundo lote de *P. cubensis*, que tenía un peso de 68.1 g. Fue extraído mediante agitación asistida por ultrasonido con MeOH grado HPLC (1000 mL) durante 6 h, utilizando una frecuencia de 53 KHz y una temperatura de 40 °C (Figura 18). El resultado fue un extracto de color ámbar con consistencia aceitosa, pesando 11.8532 g.



**Figura 18.** Segundo lote de carpóforo de *P. cubensis* en ultrasonido.

A partir de 10 g del extracto obtenido, se llevó a cabo una separación bifásica con Et<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O. El extracto se disolvió en 500 mL de H<sub>2</sub>O destilada mediante calentamiento y se añadió a un embudo de separación. Luego, se agregaron 250 mL de Et<sub>2</sub>O, se agitó y se dejó reposar para la separación de las fases. Se repitió el lavado dos veces con 250 mL cada vez, sumando un total de 500 mL de Et<sub>2</sub>O.

La fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y concentró en el rotavapor con vacío (40 °C), resultando en un residuo de 0.0650 g. Este proceso se repitió con la fase acuosa (exceptuando la adición de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro) para obtener 5.8379 g.



## 7.2.2 Hongos de cultivo

### 7.2.2.1 Extracción con MeOH por ultrasonido

30.1 g del primer lote de carpóforo se extrajo con MeOH grado HPLC (300 mL) mediante agitación asistida por ultrasonido durante 1 h, utilizando una frecuencia de 53 KHz y una temperatura de 40 °C. Luego, se filtró y concentró en el rotavapor con vacío (40 °C, 337 mbar). El extracto presentó una apariencia aceitosa de color ámbar, y en el fondo y paredes del matraz se observó un precipitado de color blanco con aspecto ceroso (Figura 19). Este precipitado resultó ser insoluble en MeOH y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, pero soluble en H<sub>2</sub>O.



**Figura 19.** Extracto de *Psilocybe cubensis* (izquierda) y precipitado blanco (derecha).

Se realizó una partición con hexano/H<sub>2</sub>O utilizando 3 g del extracto. Inicialmente, el extracto se disolvió con la mínima cantidad de H<sub>2</sub>O destilada mediante calentamiento y se agregó a un embudo de separación. Luego, se lavó dos veces con 40 mL de hexano cada una, sumando un total de 80 mL de hexano.

La fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se concentró en el rotavapor, resultando en un residuo de 0.2585 g. La fase acuosa también se concentró en el rotavapor, obteniendo 2.7001 g.

### 7.2.2.2 Extracción secuencial por reflujo

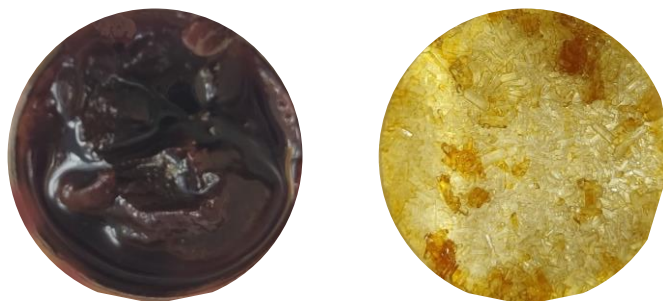
El carpóforo restante del primer lote (44.7 g) fue sometido a extracción mediante reflujo durante 6 h y de manera secuencial con hexano al 99%, AcOEt grado HPLC y MeOH grado HPLC, utilizando 450 mL de cada disolvente. Después, se filtró y concentró en el rotavapor, obteniendo así los correspondientes extractos de hexano (0.1749 g), AcOEt (0.4362 g) y MeOH (0.6302 g) (Figura 20).



**Figura 20.** Extractos obtenidos mediante reflujo secuencial del hongo de cultivo. De izquierda a derecha: hexano, AcOEt y MeOH.

### 7.2.2.3 Extracción con MeOH por reflujo

El segundo lote de carpóforo de cultivo tuvo un peso de 255.6 g. Fue extraído mediante reflujo durante 8 h a una temperatura máxima de 45 °C con MeOH grado HPLC (2.5 L). Luego, se filtró y concentró en el rotavapor con vacío (40 °C, 337 mbar), resultando en un extracto de color ámbar (más claro que los anteriores) con apariencia aceitosa y un peso de 21.3436 g. En el fondo del matraz se observaba la presencia de cristales alargados (Figura 21).



**Figura 21.** Extracto del segundo lote de *P. cubensis* de cultivo (izquierda) y cristales en el fondo del matraz (derecha).

#### 7.2.2.4 Extracción con CH<sub>3</sub>COOH al 5%

Se extrajeron 2.0345 g del tercer lote de carpóforo de cultivo utilizando 100 mL de una solución de CH<sub>3</sub>COOH glacial al 5% en H<sub>2</sub>O destilada mediante maceración durante 30 días a la sombra y a temperatura ambiente. Después, se filtró y concentró en el rotavapor con vacío, resultando en un extracto de color café oscuro con apariencia aceitosa que pesó 1.2234 g (Figura 22).



**Figura 22.** Extracto del tercer lote de *P. cubensis* de cultivo.

Los rendimientos de cada extracto se calcularon y se enlistaron en la siguiente tabla:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{g_{\text{extracto}}}{g_{\text{carpóforo}}} \times 100\%$$

**Tabla 1.** Rendimiento de los extractos obtenidos.

<i>Hongos silvestres</i>			
Extracto	$g_{\text{carpóforo}}$	$g_{\text{extracto}}$	% Rendimiento
Extracción secuencial por reflujo			
<i>Hexano</i>	49.2 g	0.3101 g	0.63 %
<i>AcOEt</i>		0.4485 g	0.91 %
<i>MeOH</i>		3.7983 g	7.72 %
Extracción con MeOH por ultrasonido	68.1 g	11.85 g	17.41 %
<i>Hongos de cultivo</i>			
Extracto	$g_{\text{carpóforo}}$	$g_{\text{extracto}}$	% Rendimiento
Extracción secuencial por reflujo			
<i>Hexano</i>	44.7 g	0.1749 g	0.39 %
<i>AcOEt</i>		0.4362 g	0.98 %
<i>MeOH</i>		0.6302 g	1.41 %
Extracción con MeOH por ultrasonido	30.1 g	6.7389 g	22.39 %
Extracción con MeOH por reflujo	255.6 g	21.3436 g	8.35 %
Extracción con CH <sub>3</sub> COOH al 5%	2.0345 g	1.2234 g	60.13 %

Analizando los rendimientos de extracción, se observa que el método de extracción con MeOH por ultrasonido supera en eficiencia a los procesos de reflujo y reflujo secuencial con diferentes disolventes. Esta superioridad se atribuye a la capacidad del ultrasonido para generar burbujas de cavitación mediante presión acústica. En otras palabras, la sonicación provoca fragmentación y erosión en el hongo triturado, aumentando significativamente el área de contacto con el disolvente. Esto, a su vez, acelera la velocidad de reacción y reduce el tiempo necesario para la extracción.

En contraste, la extracción con MeOH por reflujo resulta efectiva debido al aumento de temperatura, que provoca cambios en los momentos dipolares del disolvente, facilitando la extracción de diversos componentes. Sin embargo, este método se caracteriza por un tiempo de reacción prolongado, lo que puede afectar la integridad de compuestos termosensibles como los alcaloides, que disminuyen o se pierden durante el proceso. Esta observación se confirmó mediante pruebas colorimétricas para la identificación de alcaloides, donde se notó una mayor intensidad de mancha en el extracto obtenido por ultrasonido en comparación con el obtenido por reflujo, sugiriendo una mayor concentración de alcaloides.

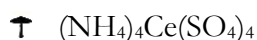
En cuanto a la extracción por maceración con  $\text{CH}_3\text{COOH}$  al 5%, aunque presenta un rendimiento superior, se limita a la extracción de sacáridos excluyendo otros compuestos, debido a que su propiedad ácida le permite interactuar con los enlaces glicosídicos, provocando su hidrólisis y dividiendo las moléculas de sacáridos en unidades más pequeñas y solubles.

Es importante considerar que el uso de ácidos puede ser selectivo y específico para ciertos tipos de compuestos, como los sacáridos en este contexto, y puede no ser igualmente eficiente para otros tipos de extracciones, por lo tanto, si el objetivo es la extracción específica de estos sacáridos, este método podría considerarse como la opción más adecuada.

## 7.3 Análisis químico preliminar

### 7.3.1 Extractos secuenciales por reflujo

Cada extracto del hongo silvestre y de cultivo fue analizado por RMN de  $^1\text{H}$  y CCF. En el análisis por CCF se usaron los reveladores  $(\text{NH}_4)_4\text{Ce}(\text{SO}_4)_4$  y  $\text{CoCl}_2$  en la CCF, los cuales, después de la aplicación se calentó en la parrilla para evidenciar los compuestos. Los reveladores fueron elaborados de la siguiente manera:



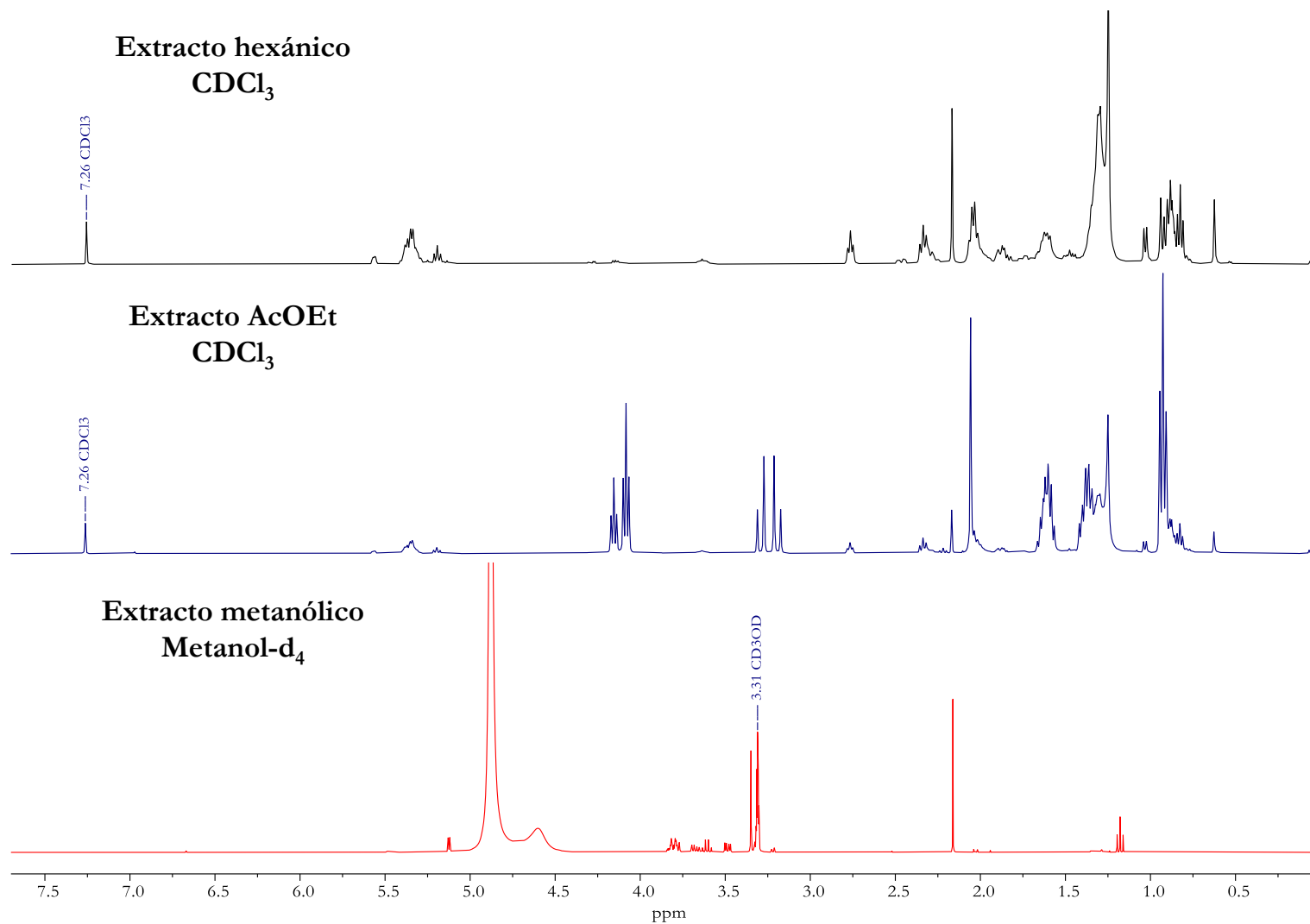
Se preparó una solución al 1% con 12 g de  $(\text{NH}_4)_4\text{Ce}(\text{SO}_4)_4$  y  $\text{H}_2\text{O}$  con hielos. Luego, se agregó gota a gota 12.5 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado, agitando constantemente hasta disolver.



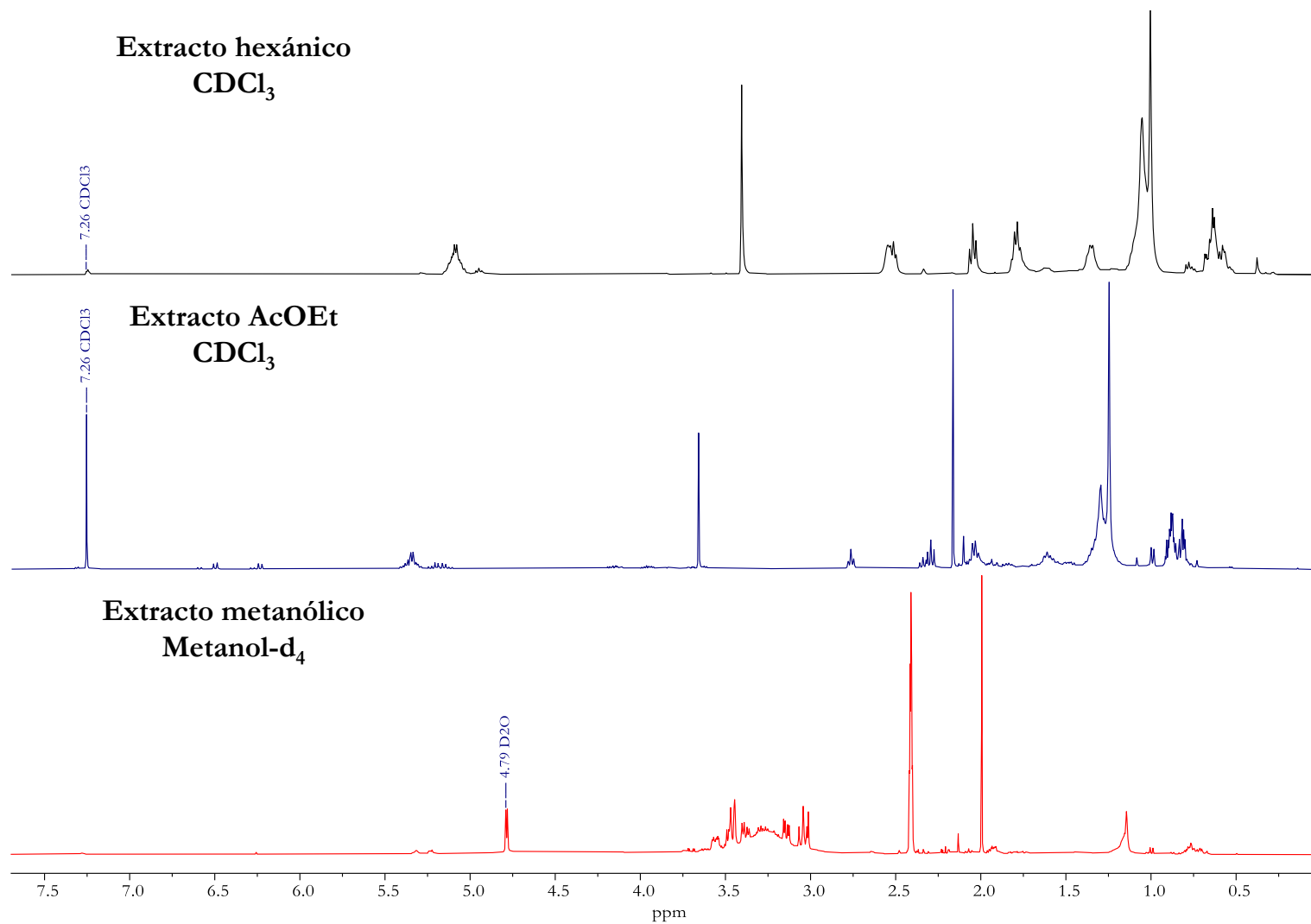
Se elaboró una solución con 3.5 g de  $\text{CoCl}_2$  en 100 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  fría, a la cual se agregaron lentamente 5 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado, agitando constantemente y hasta disolver.

En los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  del extracto hexánico, tanto en el de cultivo (Figura 23) como en el hongo silvestre (Figura 24) se observaron señales características de ácidos grasos insaturados y como compuestos minoritarios esteroides. En los espectros de AcOEt se observaron sustancias grasas y, en menor proporción, señales características de esteroides, mientras que en los extractos metanólicos se observaron señales principalmente de carbohidratos y compuestos grasos minoritarios.

El extracto hexánico del hongo de cultivo se analizó por cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (GC-MS), lo cual permitió identificar cuatro componentes mayoritarios: el éster metílico del ácido palmítico ( $t_{\text{R}} = 12.29$  min, Figura 77), la psilocina ( $t_{\text{R}} = 12.94$  min, Figura 78), éster metílico del ácido linoleico ( $t_{\text{R}} = 13.12$  min, Figura 79) y el ergosterol ( $t_{\text{R}} = 17.98$  min, Figura 80) (revisar información de soporte).



**Figura 23.** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) de la extracción secuencial del hongo de cultivo.



**Figura 24.** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) de la extracción secuencial del hongo silvestre.

### 7.3.2 Extractos con MeOH por ultrasonido

Tanto el extracto total como las respectivas particiones del hongo silvestre y de cultivo, se analizaron por RMN de  $^1\text{H}$  y por CCF. Se usaron tres reveladores colorimétricos para la identificación cualitativa de alcaloides, los cuales dieron positivo en el extracto total y en la fase acuosa de la partición. Los reactivos fueron elaborados de la siguiente manera:

#### ↑ Reactivo de Dragendorff

Una solución de 8 g de KI en 30 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  se agrega en proporción 1:1 a una solución de 0.85 g de  $\text{NO}_3\text{Bi}(\text{OH})_2$  con 10 mL de  $\text{CH}_3\text{COOH}$  glacial y 40 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada con agitación constante. Después de la aplicación se añadió una solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 10% en EtOH para intensificar las áreas coloreadas, la prueba es positiva para coloración roja o naranja brillante.

#### ↑ Reactivo de Ehrlich

1 g de *p*-dimetilaminobenzaldehído (DMAB) se disolvió en 95 mL de EtOH y lentamente se le agregó a esta solución 20 mL de HCl concentrado, agitando constantemente hasta disolver. La prueba es positiva si hay coloración violeta, verde, azul o roja.

#### ↑ Reactivo de Van-Urk

Una solución de  $\text{FeCl}_3$  al 5% en  $\text{H}_2\text{O}$  se agrega a otra solución con 0.125 g de DMAB disuelta en 100 mL de una solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 60% con agitación constante. La prueba es positiva si hay coloración azul.

En los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de los extractos con MeOH se observaron señales típicas de carbohidratos y en menor proporción señales de ácidos grasos, esteroides y compuestos aromáticos. En las particiones de hexano y  $\text{Et}_2\text{O}$  (fases orgánicas del hongo de cultivo y silvestre, respectivamente) se apreciaron principalmente señales de sustancias grasas y esteroides, mientras que en las fases acuosas se evidenció la presencia de carbohidratos y en cantidades pequeñas, señales de compuestos aromáticos (posibles alcaloides) (Figura 25 y 26). En el espectro del precipitado blanco se observaron señales típicas de carbohidratos.



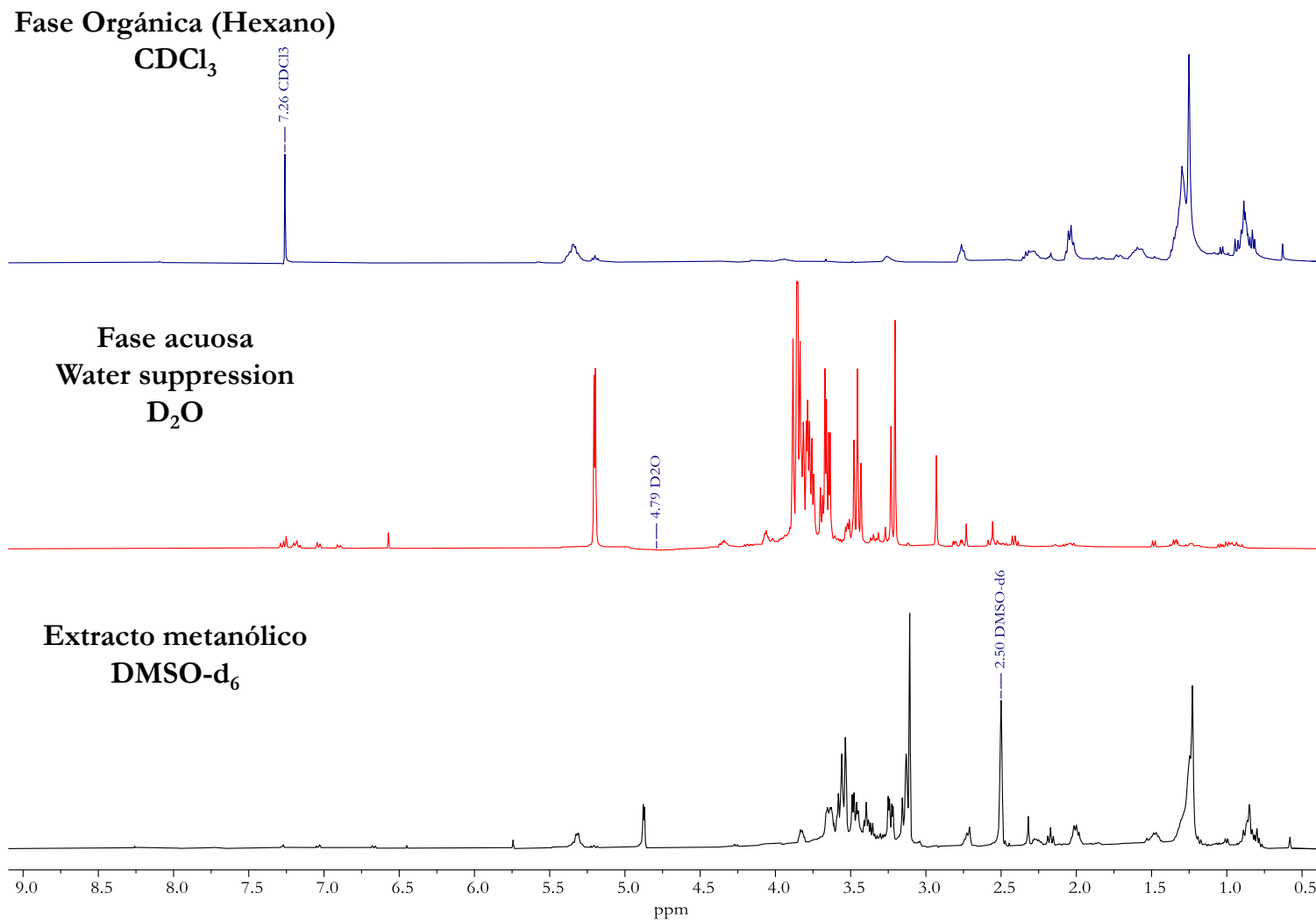


Figura 25. Espectros de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz) del extracto total (MeOH) y las particiones del hongo de cultivo.

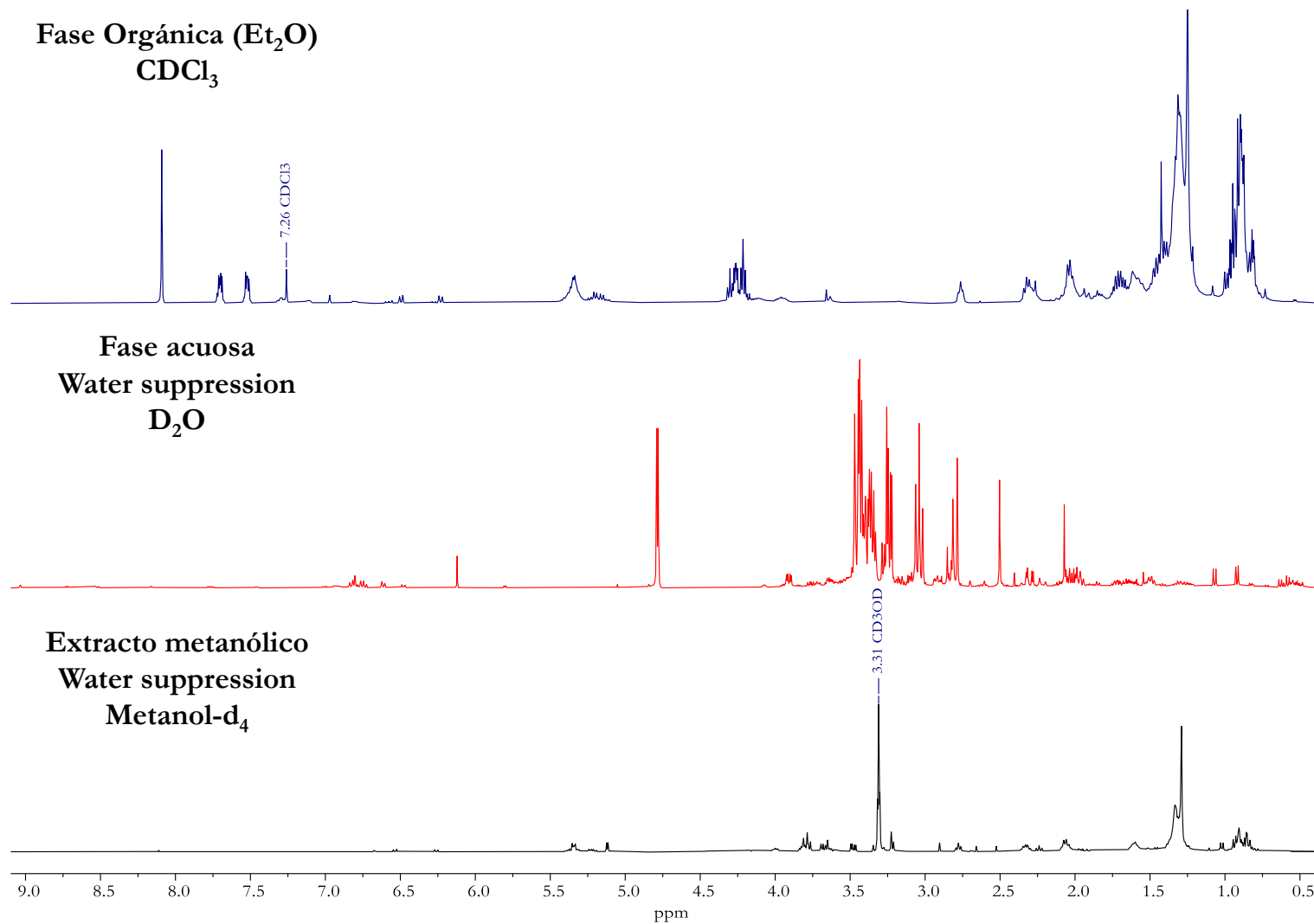


Figura 26. Espectros de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz) del extracto total (MeOH) y las particiones del hongo silvestre.

### 7.3.3 Extracto con MeOH por reflujo

#### 7.3.3.1 Identificación de alcaloides por UHPLC

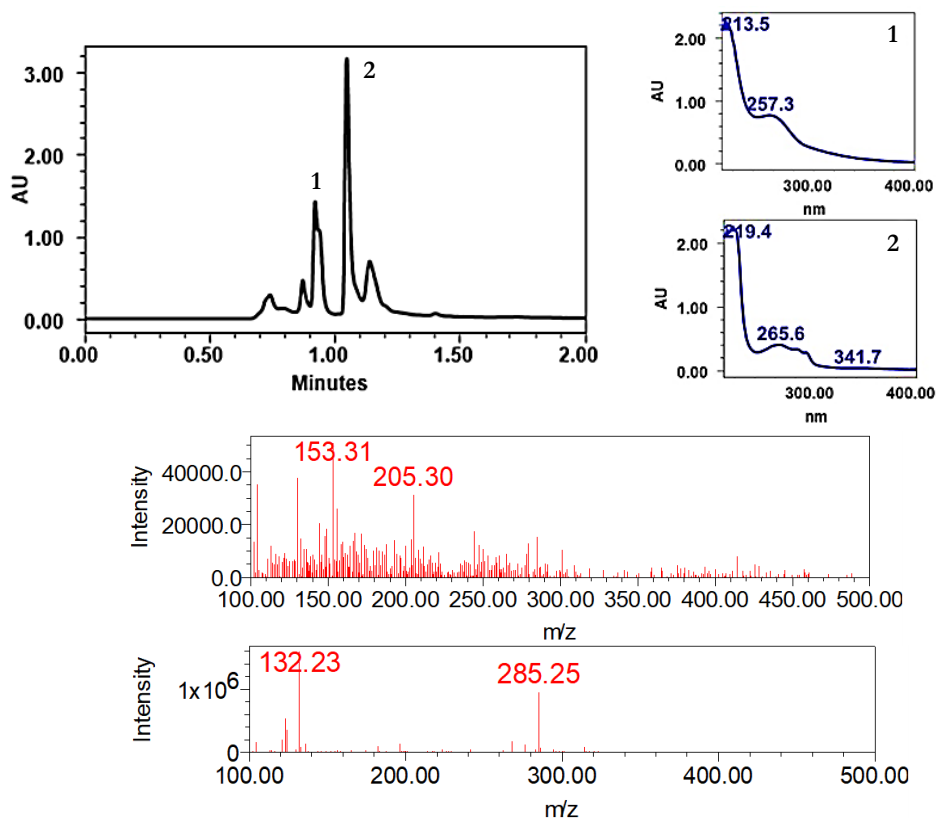
Para el análisis se disolvieron muestras de 1 o 20 mg del extracto MeOH y su partición acuosa en MeOH grado HPLC y se inyectaron en el equipo UHPLC. Se empleó una columna X-terra RP-18 y un volumen de inyección de 10  $\mu$ L. El análisis se realizó a 40 °C; como fase móvil se utilizó A: CH<sub>3</sub>COOH al 0.1 % y B: acetonitrilo (ACN) se programó en gradiente con un flujo de 0.3 mL/min con un total de 10 min (Tabla 2). La evaluación de masas estuvo en un rango de 100 a 500 Da, con la detección del ion en modo positivo.

**Tabla 2.** Gradiente de flujo en el análisis de UHPLC.

Tiempo (min)	CH <sub>3</sub> COOH al 1%	ACN
0	70 %	30 %
1.20	50 %	50 %
4	80 %	20 %
5	0 %	100 %
10	100 %	0 %

En el perfil cromatográfico UHPLC de la fase acuosa (Figura 27) se identificaron los alcaloides principales: psilocina (**1**) con PM = 204,30 g/mol y psilocibina (**2**) con PM = 284,25 g/mol; el tiempo de retención fue de 0.924 min y 1.051 min, respectivamente.

En el espectro de UV se observan las bandas de absorción a 257.3 nm y 265.6 nm que coinciden con el espectro de UV reportado de estos alcaloides (Hofmann et al., 1958). Estas bandas se han atribuido a la interacción  $\pi \rightarrow \pi^*$ . Por su parte, en el espectro de HRMS se observa el ión molecular M+1 de las dos sustancias.

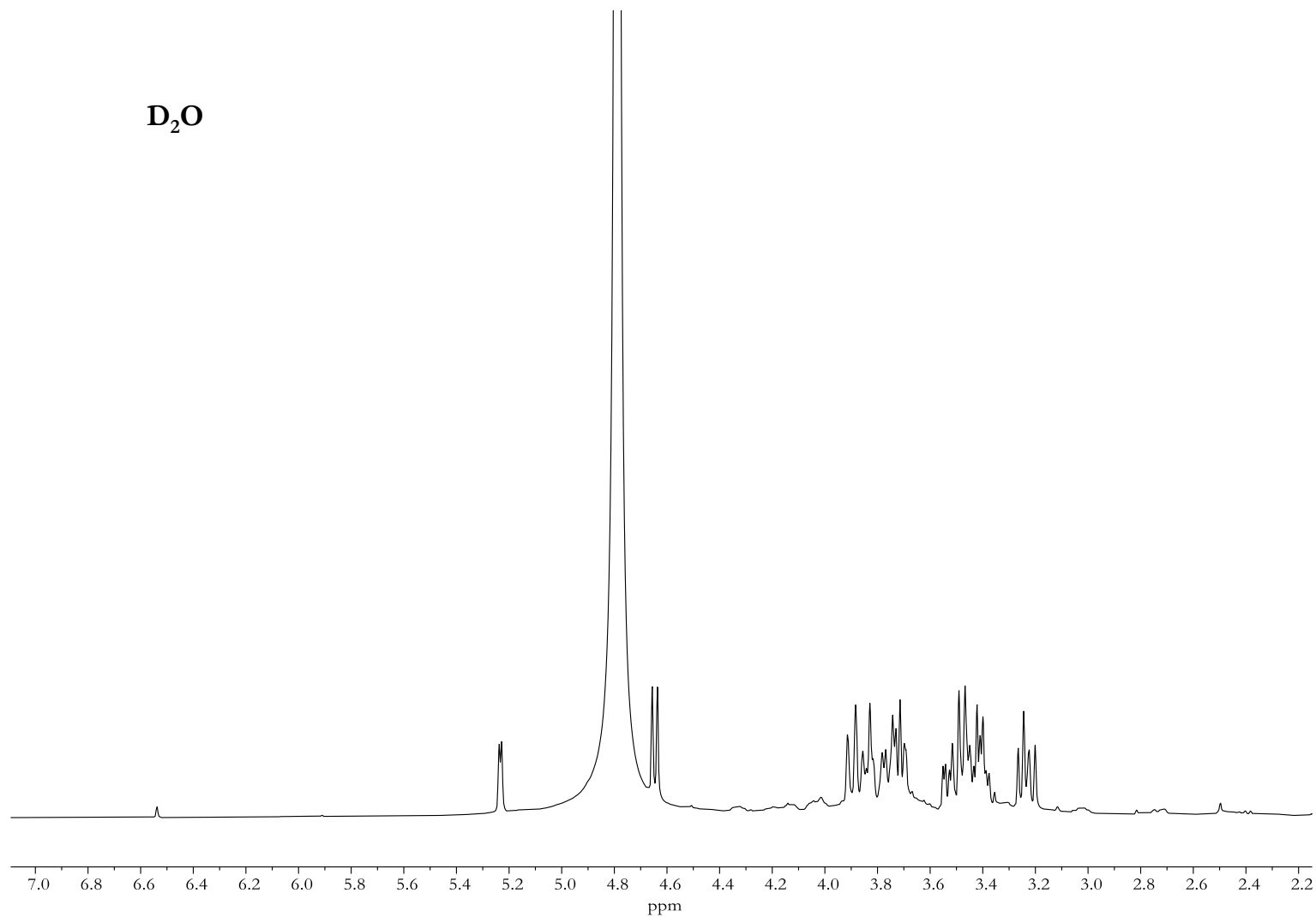


**Figura 27.** Cromatograma UHPLC de la fase acuosa (negro), espectros UV (azul) y HRMS (rojo).

### 7.3.4 Extracción con $\text{CH}_3\text{COOH}$ al 5%

El extracto del hongo de cultivo se analizó por RMN de  $^1\text{H}$  y por CCF. De igual forma se usaron los tres reveladores colorimétricos para la identificación cualitativa de alcaloides en la CCF: el reactivo de Dragendorff, reactivo de Ehrlich y el reactivo de Van-Urk. Las pruebas dieron levemente positivo a la presencia de anillos de indol.

En el espectro de RMN (Figura 28) se observan en mayor proporción señales de protón anomérico a diferentes desplazamientos, también se observan señales de  $-\text{CH}$  base de  $-\text{OH}$  entre 3.1–4.0 ppm típicas de los carbohidratos.



**Figura 28.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) del extracto con  $\text{CH}_3\text{COOH}$  al 5% del hongo de cultivo.

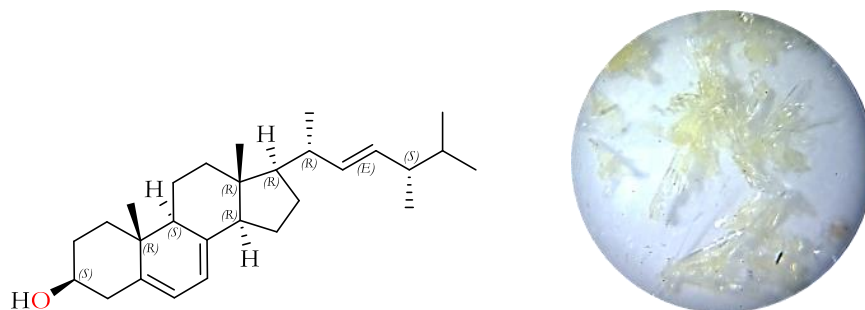
## 7.4 Separación cromatográfica e identificación de compuestos

### 7.4.1 Ergosterol

#### 7.4.1.1 Hongo de cultivo

El extracto hexánico por reflujo secuencial (0.0938 g) se sometió a CC empacada con 6'' de gel de sílice Sigma-Aldrich (6.0643 g), usando como eluyente un sistema de Hexano–AcOEt (9:1, 8:2, 7:3, 6:4 y 5:5) y colectando 28 fracciones de 20 mL. La fracción 5 eluída con mezcla 9:1 (7.7 mg), mostró la presencia de cristales en forma de agujas amarillas que posteriormente se lavaron con MeOH, quedando unos cristales en forma de agujas incoloras. Su espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 29 °C) (Figura 30) mostró señales entre 5.21–5.57 ppm pertenecientes a protones insaturados, en 3.64 ppm una señal múltiple para CH base de OH, entre 1.2–2.1 ppm señales pertenecientes a grupos metinos, en 2.29 y 2.47 ppm señales de un metileno, y entre 0.6–1.1 ppm señales de grupos metilo. En el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 29 °C) (Figura 31) se observaron señales entre 116–142 ppm de los carbonos insaturados, en 70.48 ppm el carbono base de OH y de 12.05–21.11 ppm señales de carbonos de metilos.

Con apoyo de una muestra auténtica (Sigma-Aldrich) y la comparación de su espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 33, Tabla 3) se comprobó que este compuesto es el ergosterol. El análisis mediante RMN en 2D (Figuras 64 y 65), incluyendo el experimento COSY (Figura 32) y la comparación con la literatura (Seo et al., 2009) son consistentes. Igualmente se determinó el punto de fusión de los cristales (163–167 °C) junto con su  $[\alpha]_D^{20} -106^\circ$  (c 0.1,  $\text{CHCl}_3$ ) y se comparó con la reportada (164–165 °C y  $[\alpha]_D^{20} -103^\circ$  [c 0.1,  $\text{CHCl}_3$ ]) (Seo et al., 2009); también se determinó su espectro de IR (Figura 74).



**Figura 29.** Estructura molecular del ergosterol (izquierda) y extracto aislado (derecha).

Ergosterol  
CDCl<sub>3</sub>

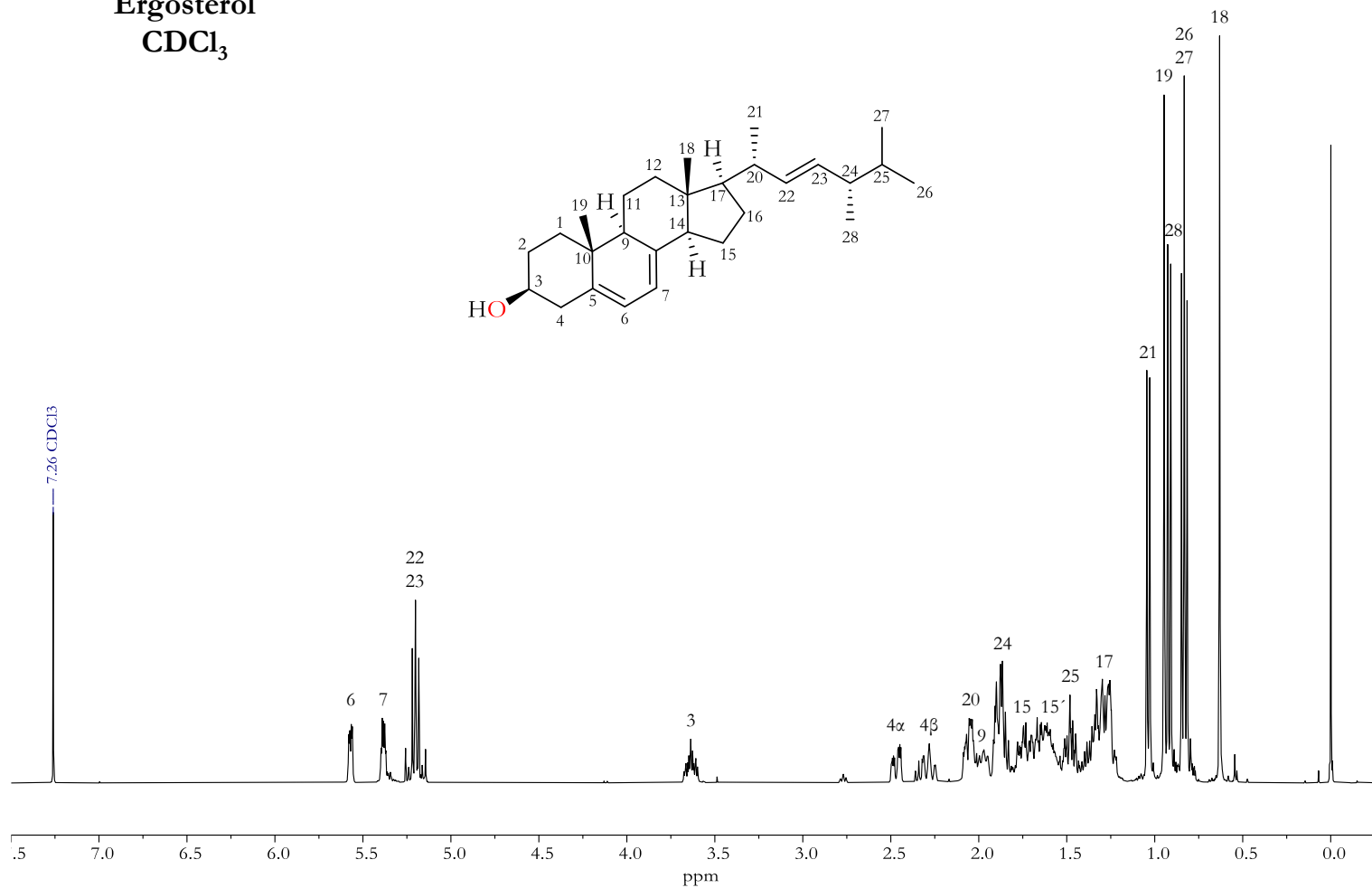
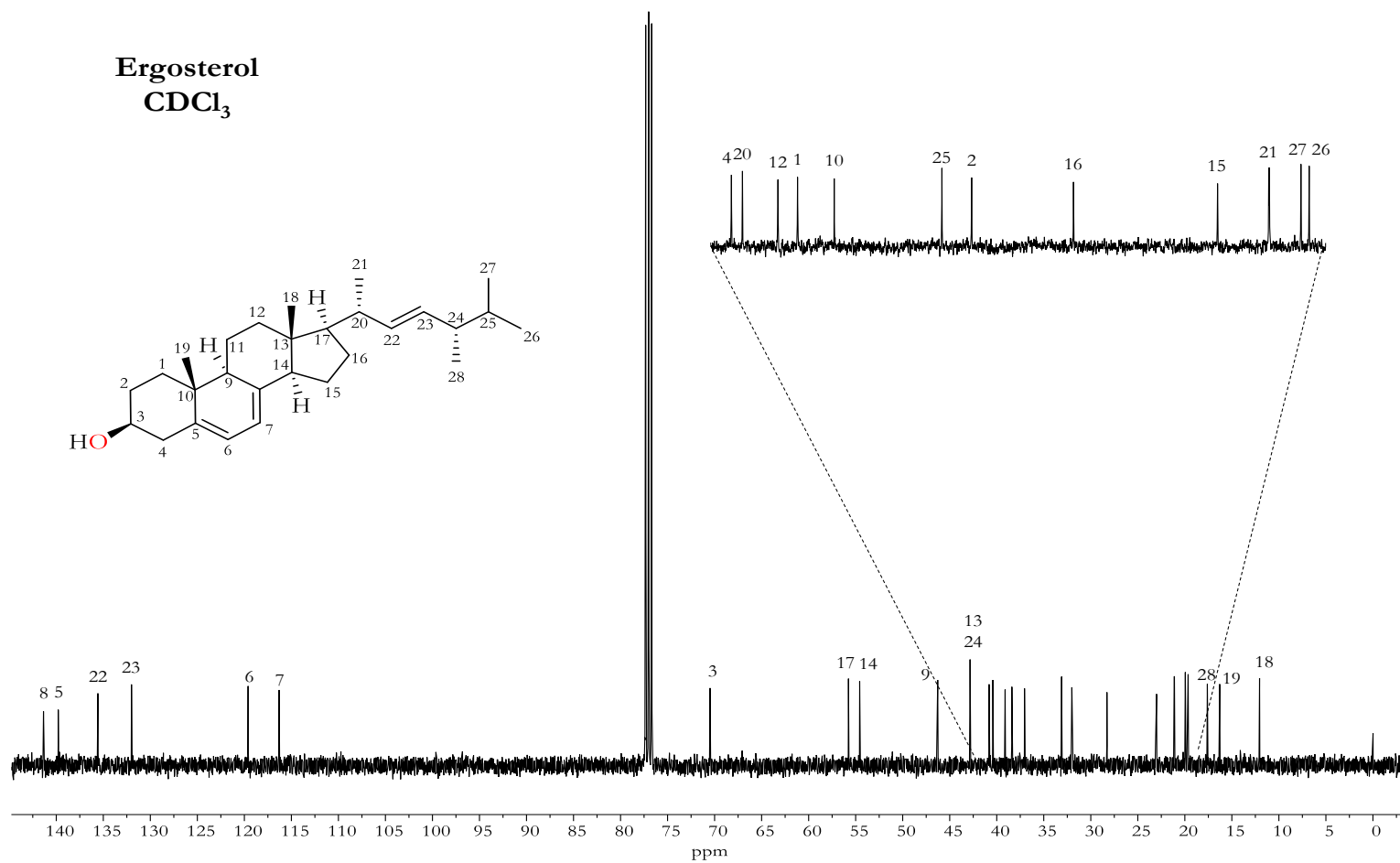
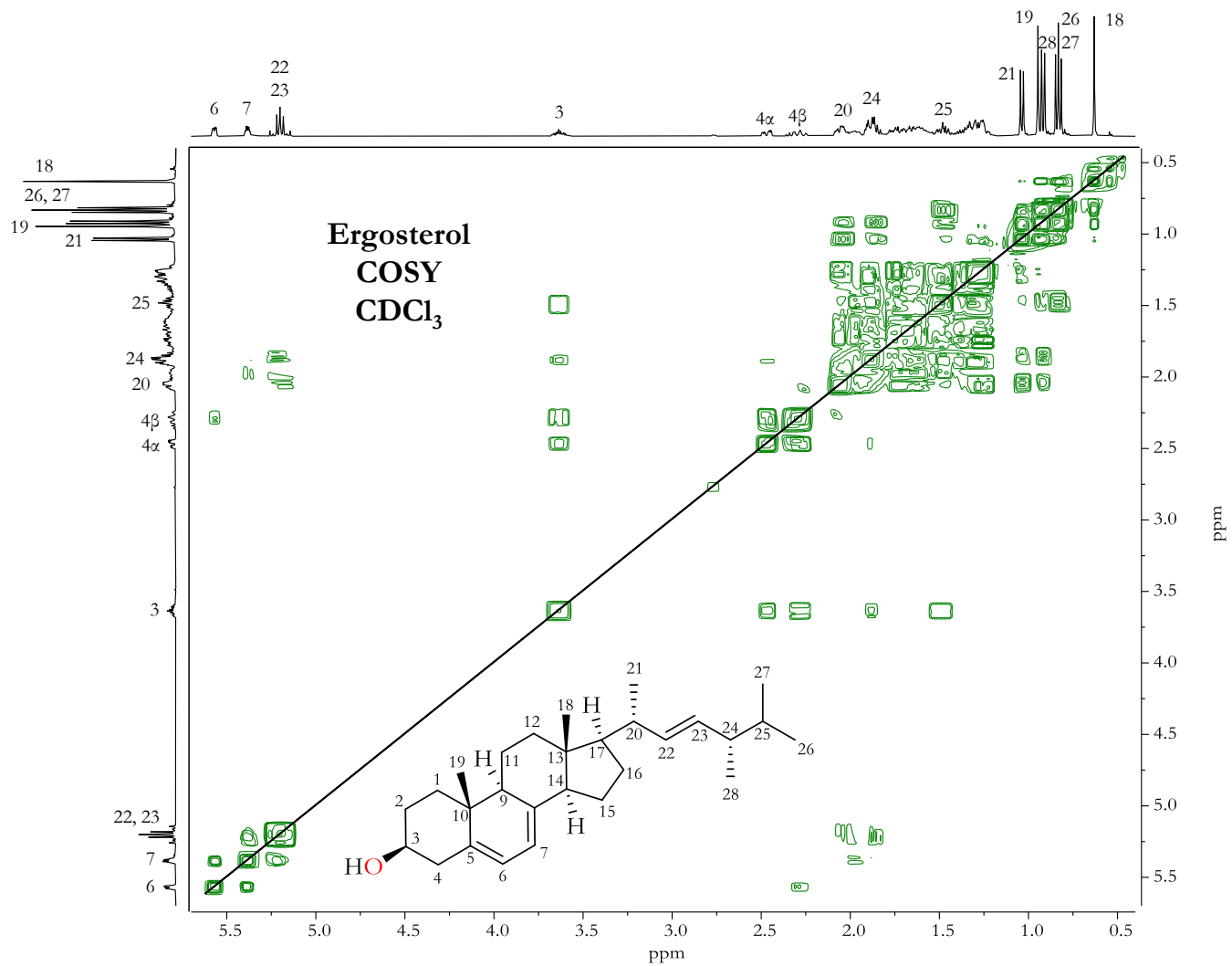


Figura 30. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz) del ergosterol aislado del hongo de cultivo.

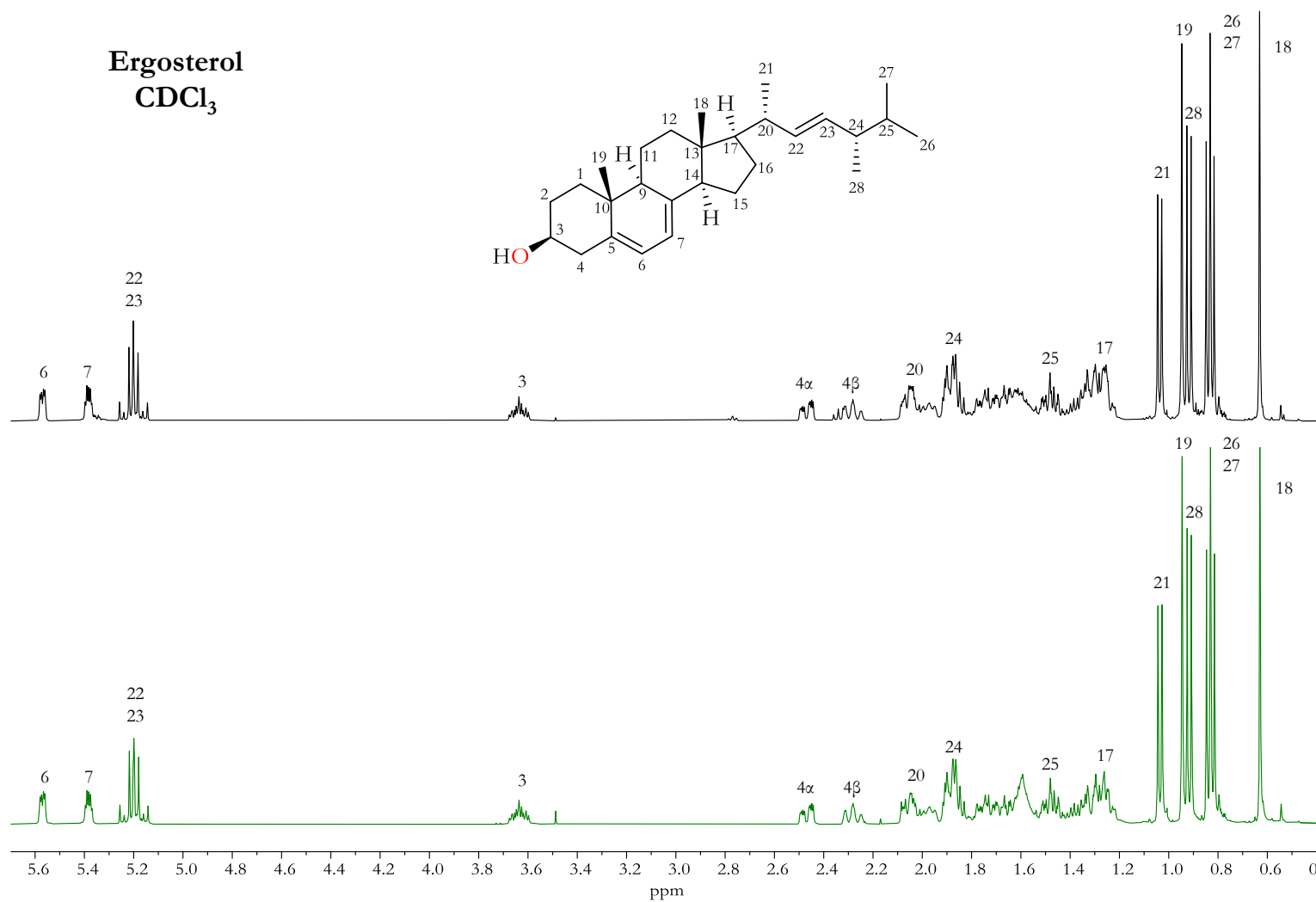


**Figura 31.** Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz) del ergosterol aislado del hongo de cultivo.





**Figura 32.** Espectro COSY del ergosterol aislado del hongo de cultivo.



**Figura 33.** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) del ergosterol aislado del hongo de cultivo (negro) y el reactivo de Sigma-Aldrich (verde).

**Tabla 3.** Comparación de los datos del desplazamiento químico (en ppm) entre el ergosterol aislado del hongo de cultivo y el reportado (Seo et al., 2009).

Posición	Aislado		Referencia	
	$\delta^1\text{H}$ (mult., <i>J</i> en Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (mult., <i>J</i> en Hz)	$\delta^{13}\text{C}$
1	-	38.39	-	38.6
2	-	32.01	-	32.2
3	3.64 (m)	70.48	-	70.7
4	-	40.81	-	41
5	-	139.79	-	140
6	5.57 (dd, 2.6 y 5.7)	119.6	5.55 (dd, 2.8 y 5.4)	119.8
7	5.38 (dt, 2.6 y 5.5)	116.3	5.36 (q, 2.8)	116.5
8	-	141.36	-	141.6
9	-	46.28	-	46.5
10	-	37.05	-	37.2
11	-	21.13	-	21.7
12	-	39.11	-	39.3
13	-	42.85	-	43
14	-	54.57	-	54.8
15	-	23	-	23.2
16	-	28.28	-	28.5
17	-	55.77	-	55.9
18	0.6313 (s)	12.05	0.61 (s)	12.3
19	0.9469 (s)	16.29	0.93 (s)	16.5
20		40.41		40.6
21	1.04 (d, 6.6)	21.11	1.02 (d, 6.8)	21.3
22	5.19 (dd, 7.6 y 15.3)	135.58	5.15 (m)	135.8
23	5.21 (dd, 7.2 y 15.3)	132	5.19 (m)	132.2
24	-	42.83	-	43
25	-	33.1	-	33.3
26	0.82 (d, 6.0)	19.65	0.79 (d, 7.6)	19.9
27	0.84 (d, 6.0)	19.95	0.82 (d, 6.8)	20.2
28	0.92 (d, 6.8)	17.61	0.90 (d, 6.8)	17.8

## 7.4.2 Peróxido de ergosterol

### 7.4.2.1 Hongo de cultivo

A partir de 0.3559 g del extracto de AcOEt por reflujo secuencial se realizó una CC empacada con 5'' de gel de sílice Sigma-Aldrich (5.2085 g). Se usó Hexano-AcOEt (9:1, 8:2, 7:3, 6:4 y 5:5) como eluyente; en total se colectaron 36 fracciones de 20 mL. La fracción 11 eluída con mezcla 8:2 (6.8 mg) mostró la formación de un precipitado blanco. Su espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 21 °C) (Figura 34) es parecido al del ergosterol con algunas variaciones, entre ellas las señales en 5.14 ppm, 5.22 ppm, 6.24 ppm y 6.50 ppm de protones vinílicos y en 3.94 ppm la señal múltiple para CH base de OH. Entre 0.7–1.0 ppm se observaron las señales de los metilos.

Se realizó la comparación de los desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento obtenidos con los de la literatura (Seo et al., 2009) (Tabla 4), al igual que la comparación del espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de la muestra auténtica obtenida en nuestro grupo de investigación del hongo *Ganoderma applanatum* (Figura 35), los cuales son consistentes y confirmaron la presencia del peróxido de ergosterol.

Peróxido de ergosterol  
 $\text{CDCl}_3$

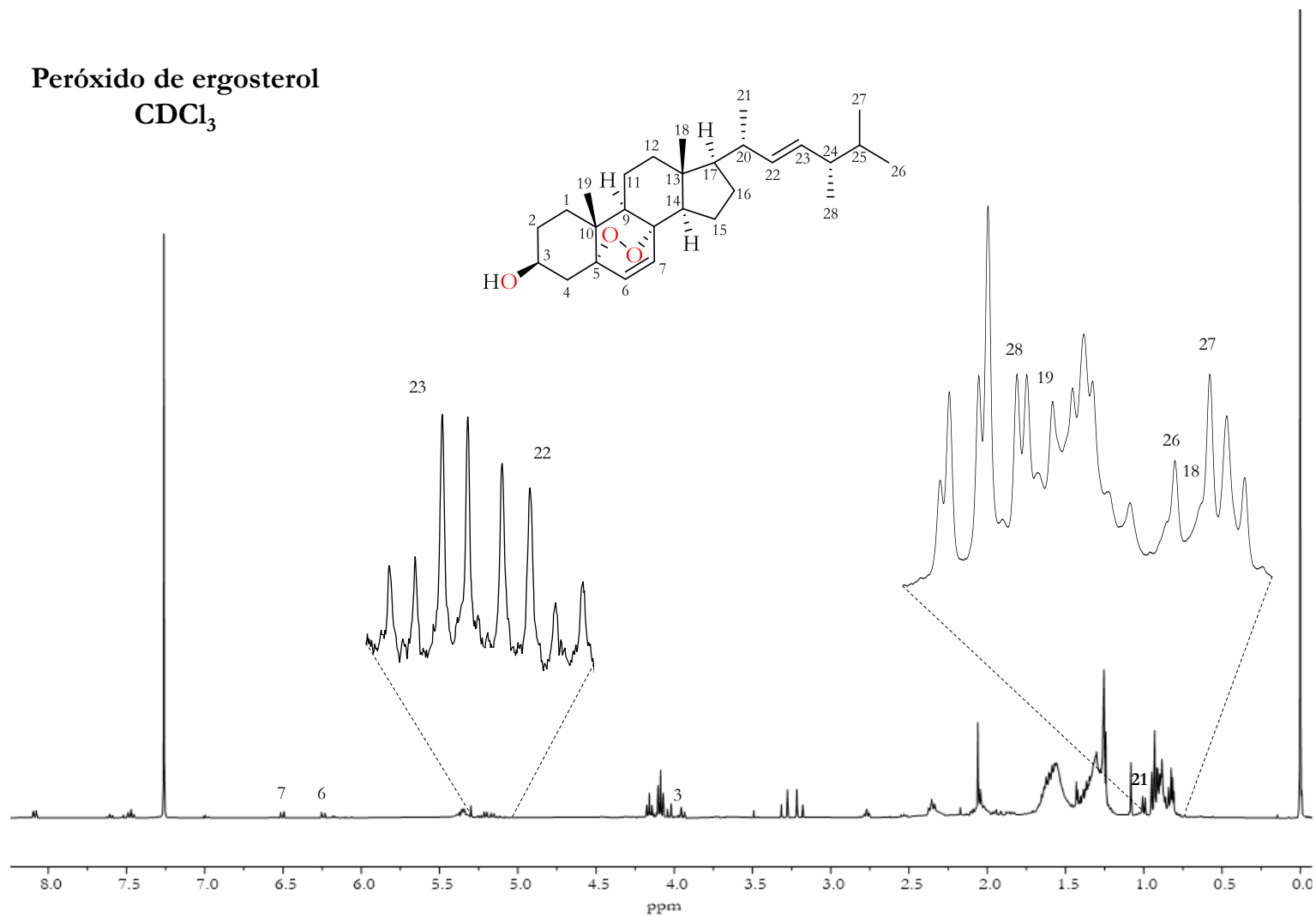
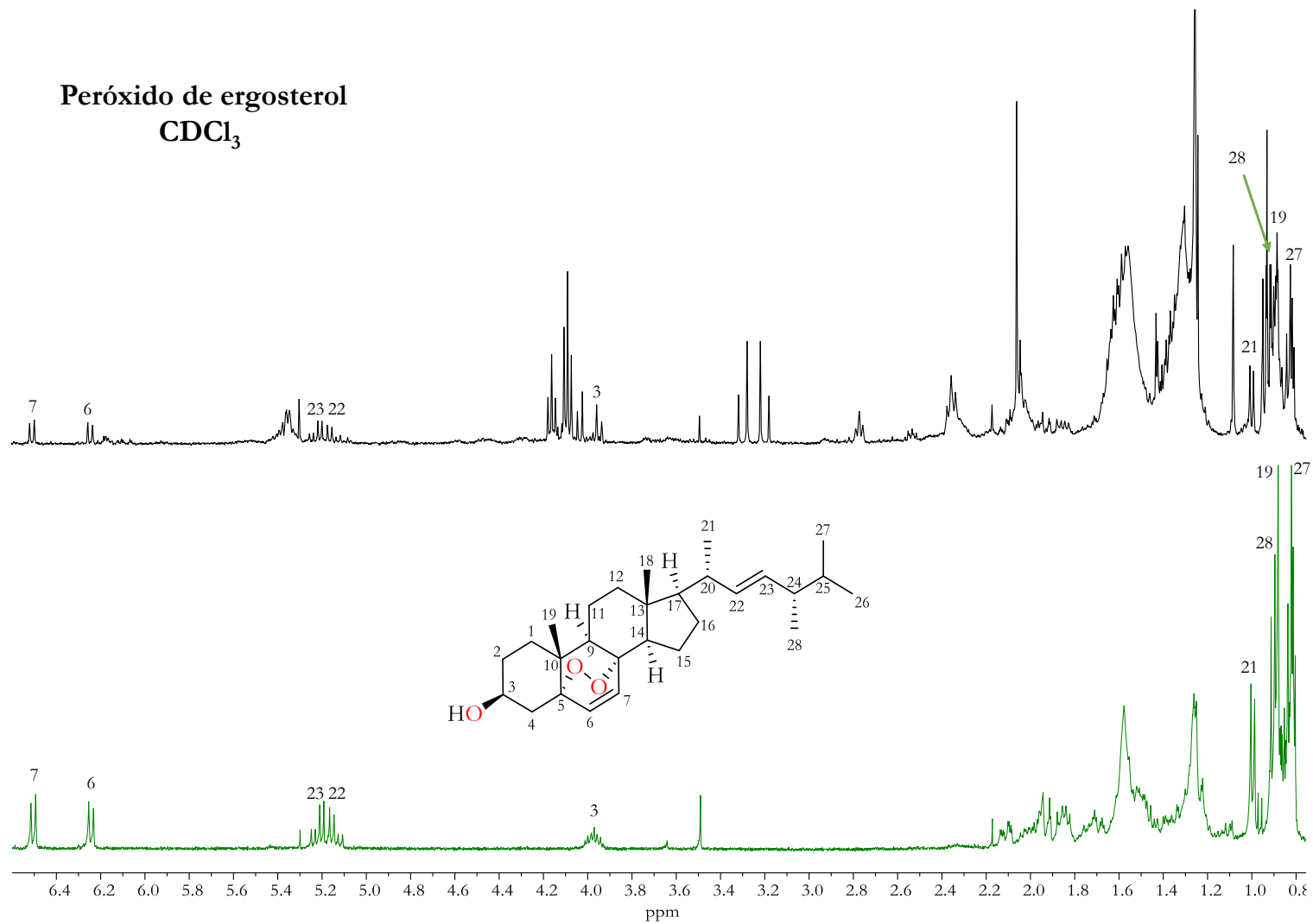


Figura 34. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) del peróxido de ergosterol identificado del hongo de cultivo.

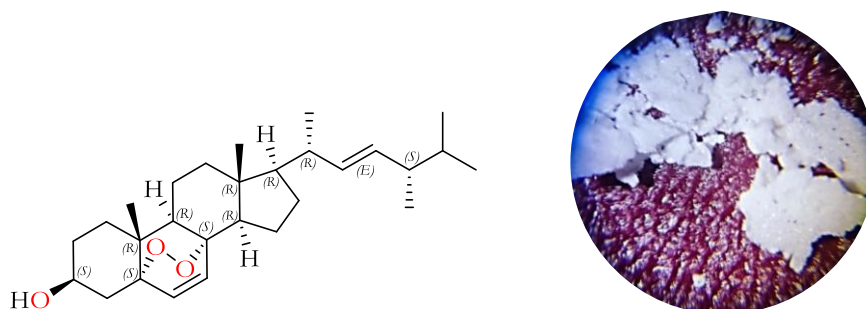


**Figura 35.** Espectros de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz) del peróxido de ergosterol identificado del hongo de cultivo (negro) y el de *G. applanatum* (verde).

#### 7.4.2.2 Hongo silvestre

Con 0.0508 g del extracto de AcOEt por reflujo secuencial se realizó una CC empacada con gel de sílice Sigma-Aldrich (1.85 g). Se usaron sistemas  $\text{CHCl}_3$ -AcOEt que comenzaron con mezcla 9:1 y sucesivamente hasta la mezcla 1:1 como eluyente; en total, se recolectaron 9 fracciones de 10 mL. La fracción 4 y 5 (sistema 4:1) (6.9 mg) mostró la formación de un precipitado blanco. En su espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 27 °C) (Figura 37) se observaron las señales a 5.16 ppm, 5.20 ppm, 6.24 ppm y 6.50 ppm pertenecientes a protones vinílicos, en 3.98 ppm una señal múltiple para CH base de OH, entre 0.81–1.0 ppm se observan las señales de los metilos. En el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 27 °C) (Figura 38) mostró señales entre 130–136 ppm de los carbonos insaturados, en 66.63 ppm el carbono base de OH y de 13.02–21.02 ppm señales de carbonos de metilos.

Con apoyo de la muestra auténtica obtenida en nuestro grupo de investigación del hongo *Ganoderma applanatum* y la comparación con su espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 40), además del análisis mediante RMN en 2D (Figuras 66 y 67), incluyendo el experimento COSY (Figura 39) y la comparación con la literatura (Seo et al., 2009) (Tabla 4) son consistentes y confirman que es el peróxido de ergosterol.



**Figura 36.** Estructura molecular del peróxido de ergosterol(izquierda) y extracto identificado (derecha).

Peróxido de ergosterol  
CDCl<sub>3</sub>

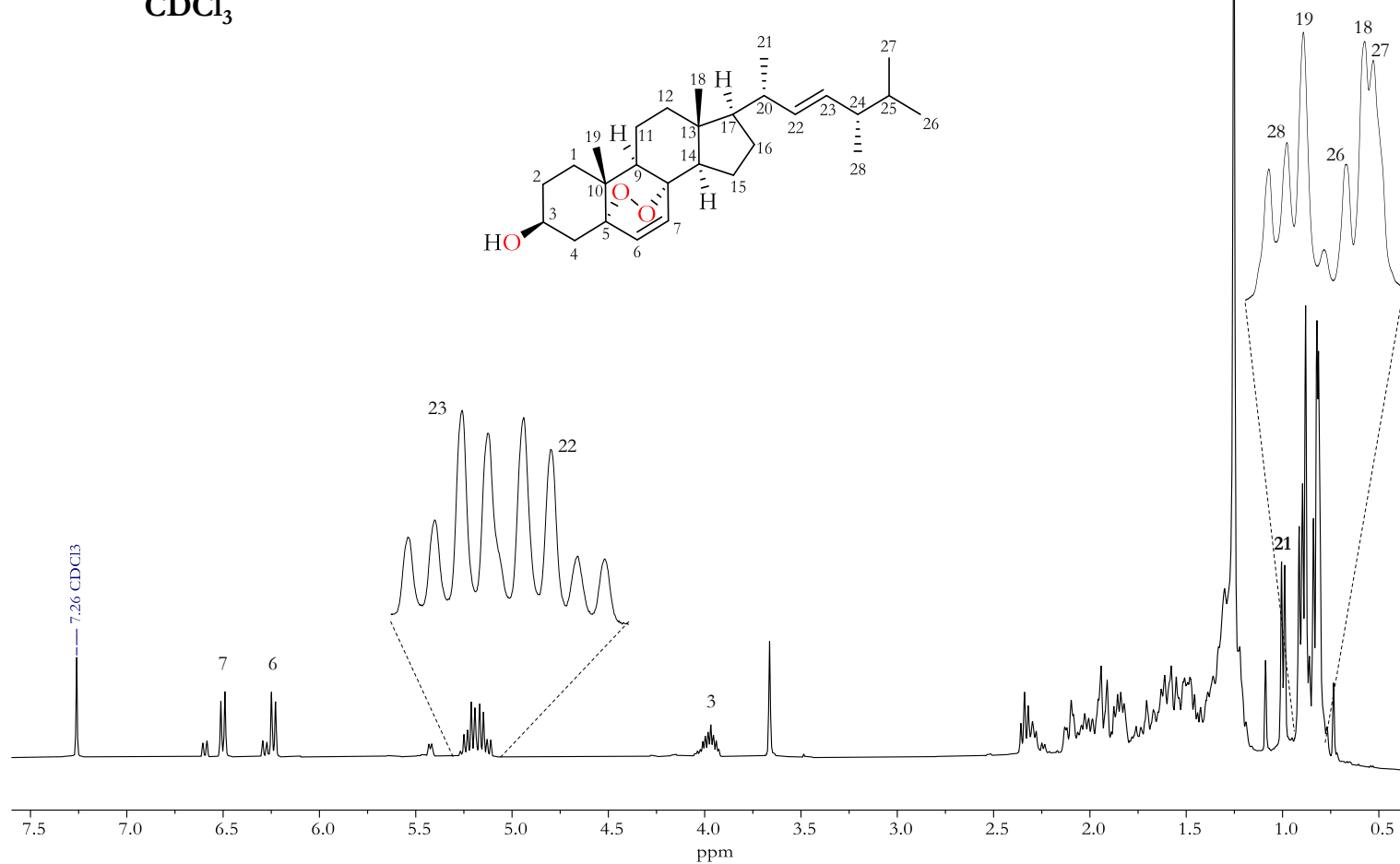


Figura 37. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz) del peróxido de ergosterol identificado del hongo silvestre.



Peróxido de ergosterol  
CDCl<sub>3</sub>

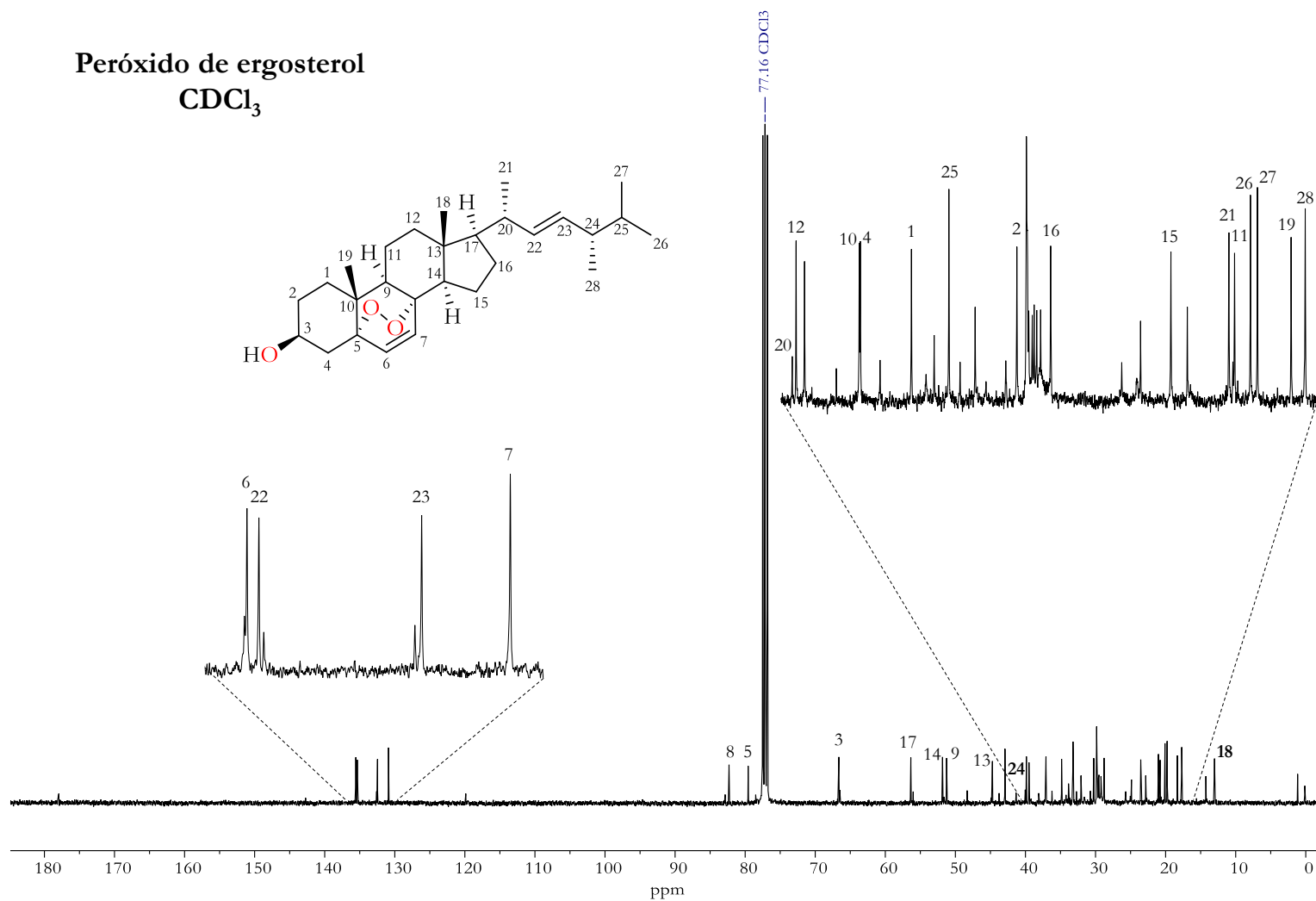
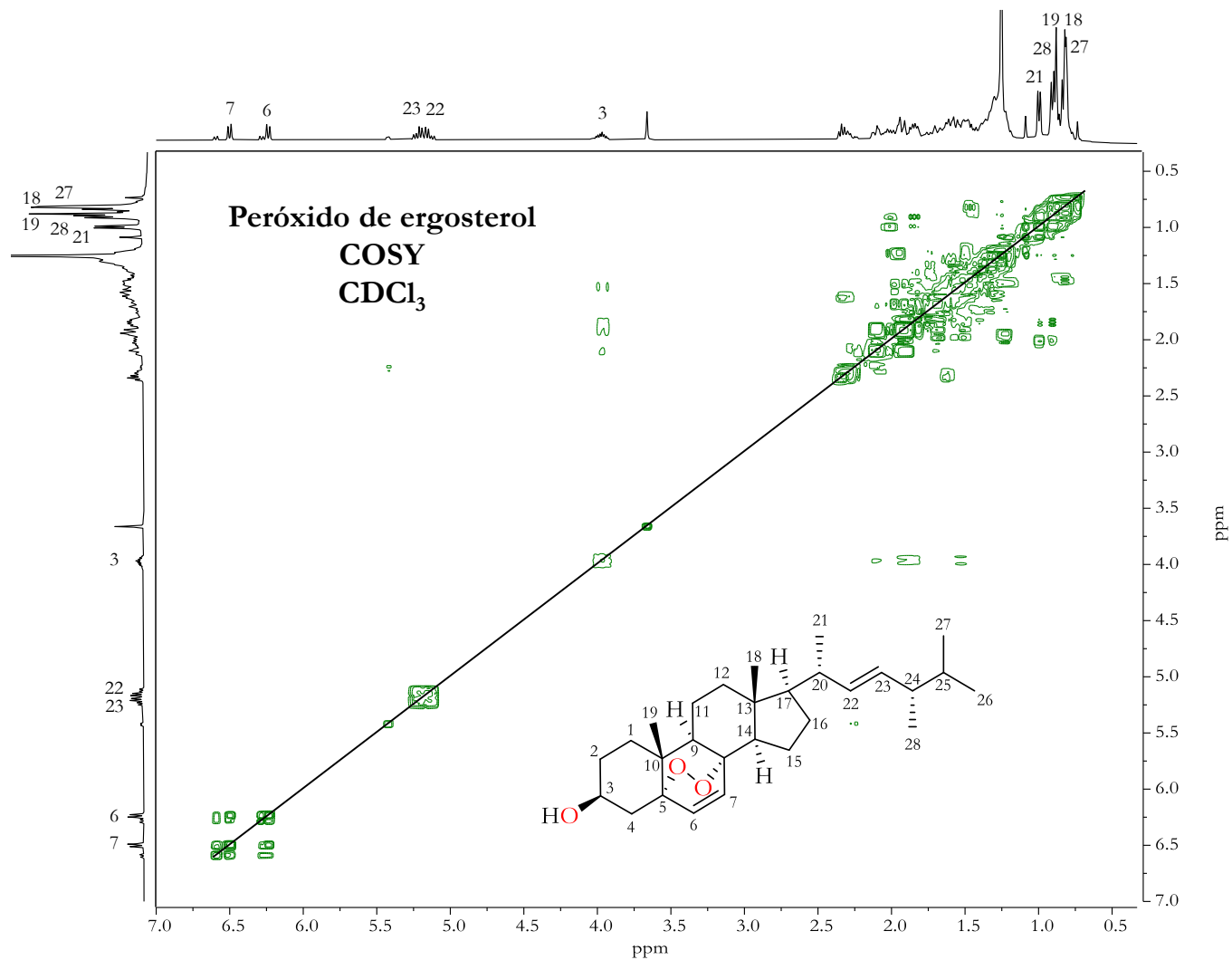
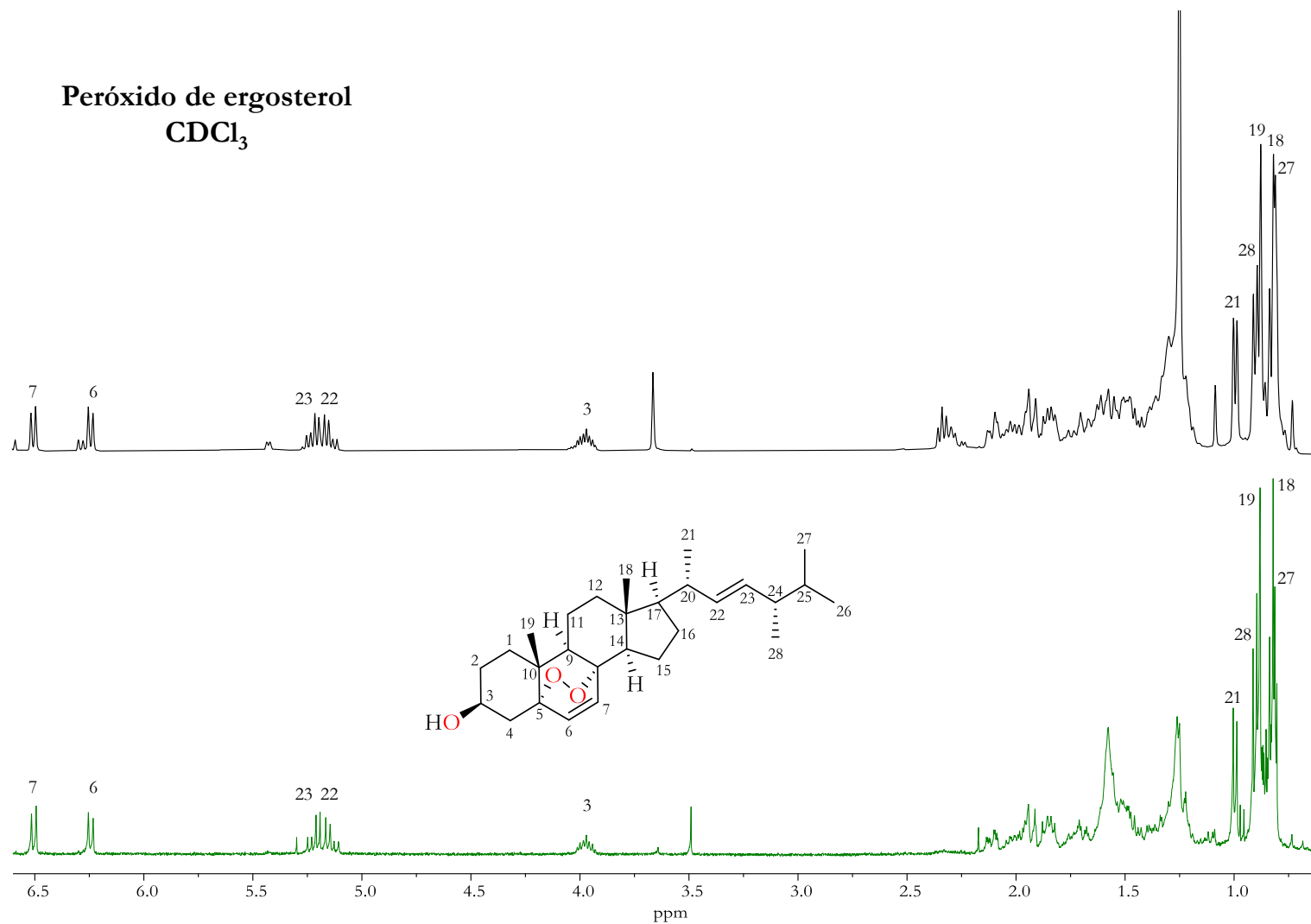


Figura 38. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz) del peróxido de ergosterol identificado del hongo silvestre.



**Figura 39.** Espectro de COSY del peróxido de ergosterol identificado del hongo silvestre.



**Figura 40.** Espectros de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz) del peróxido de ergosterol identificado del hongo silvestre (negro) y el aislado de *Ganoderma applanatum* (verde).

**Tabla 4.** Comparación de los datos del desplazamiento químico (en ppm) entre el peróxido de ergosterol identificado del hongo silvestre, el identificado del hongo de cultivo y el reportado (Seo et al., 2009).

Posición	Identificado (silvestre)		Identificado (cultivo)		Referencia	
	$\delta^1\text{H}$ (mult., <i>J</i> en Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (mult., <i>J</i> en Hz)	$\delta^1\text{H}$ (mult., <i>J</i> en Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$
1	-	34.85	-	-	34.9	
2	-	30.26	-	-	30.3	
3	3.98 (m)	66.63	3.94 (m)	3.97 (m)	66.7	
4	-	37.07	-	-	37.1	
5	-	79.57	-	-	79.6	
6	6.24 (d, 8.7)	135.56	6.50 (d, 8.4)	6.24 (d, 8.4)	135.5	
7	6.50 (d, 8.6)	130.89	6.24 (d, 8.4)	6.50 (d, 8.4)	131	
8	13	-	-	-	82.4	44.8
9	14	-	-	-	51.3	51.9
10	15	-	-	-	37.2	23.6
11	16	-	-	-	20.9	28.9
12	17	-	-	-	39.5	56.4
18	0.82 (s)	13.02	0.82 (s)	0.83 (s)	13.1	
19	0.88 (s)	18.32	0.90 (s)	0.89 (s)	18.4	
20	-	40.03	-	-	40	
21	0.99 (d, 6.7)	21.02	1.0 (d, 6.5)	1.0 (d, 6.4)	21.1	
22	5.16 (dd, 8.3 y 16)	135.35	5.14 (dd, 8.0 y 15.3)	5.14 (dd, 8.0 y 15.2)	135.4	
23	5.20 (dd, 7.3 y 16)	132.46	5.22 (dd, 7.5 y 15.3)	5.23 (dd, 7.6 y 15.2)	132.5	
24	-	42.93	-	-	43	
25	-	33.22	-	-	33.3	
26	0.85 (d, 7.0)	20.09	0.83	0.84 (d, 6.8)	20.2	
27	0.81 (d, 7.0)	19.78	0.82 (d, 6.2)	0.82 (d, 6.8)	19.8	
28	0.91 (d, 6.9)	17.7	0.91 (d, 6.1)	0.91 (d, 6.8)	17.8	

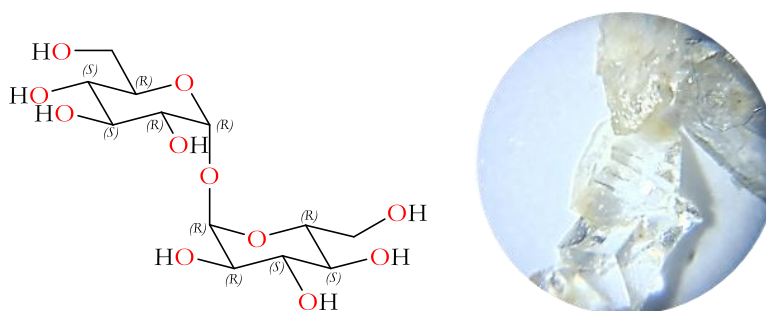
### 7.4.3 $\alpha,\alpha$ -trehalosa

#### 7.4.3.1 Hongo de cultivo

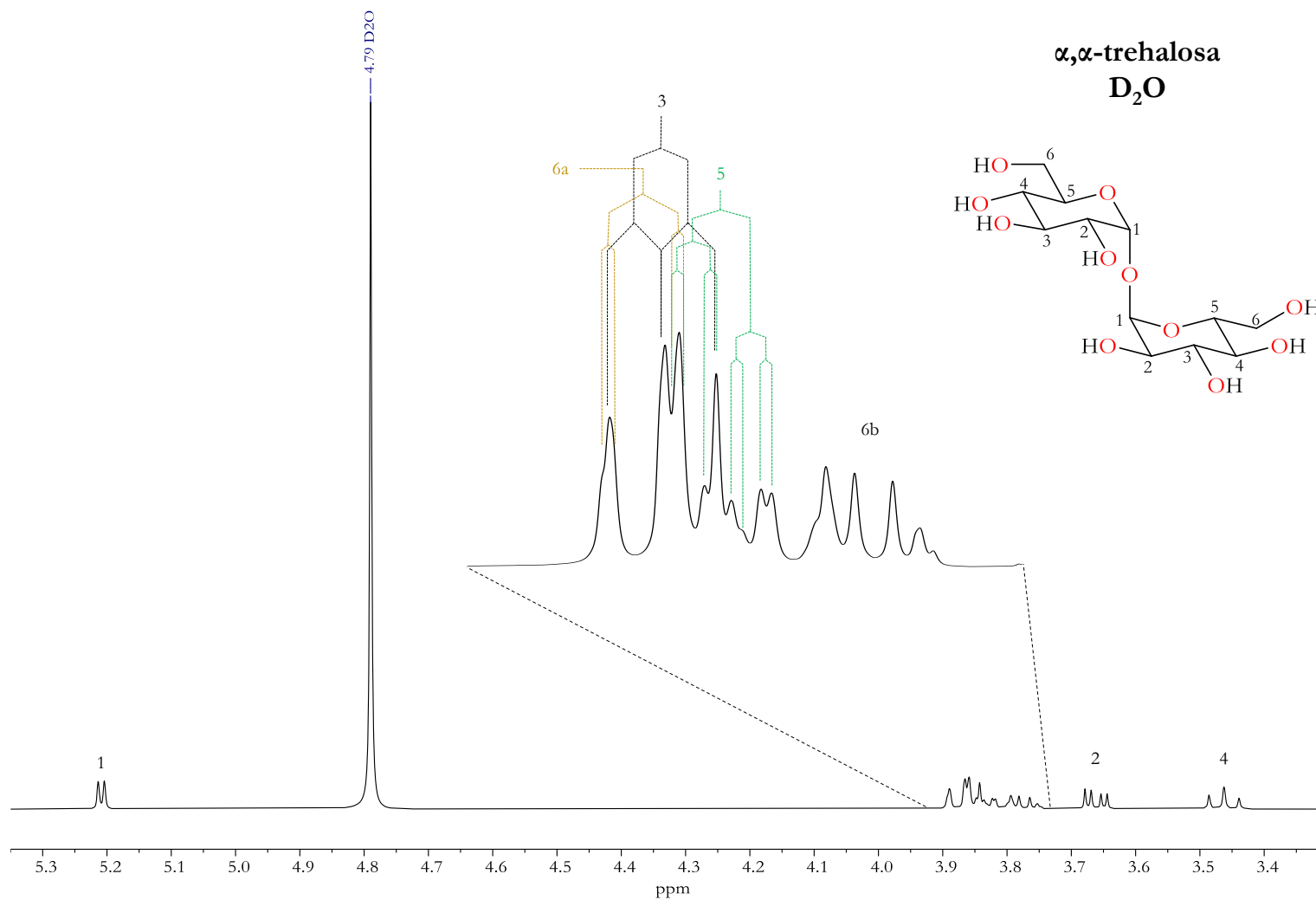
De los 21.3436 g del extracto con MeOH por reflujo, precipitaron 1.7464 g de cristales en las paredes y fondo del matraz. Debido a la coloración amarillenta (por los restos del extracto) se lavaron con hexano, quedando incoloros y con forma de prismas. Las pruebas colorimétricas para la identificación cualitativa de alcaloides dieron negativo.

En el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 21 °C) (Figura 42) se observaron señales típicas de carbohidratos, como la señal doble en 5.21 ppm ( $J = 3.8$  Hz) característica de un protón anomérico con orientación alfa, también se observaron señales entre 3.4–3.9 ppm de CH base de OH. En el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 43) se observó la señal del carbono anomérico a 93.23 ppm, entre 69–73 ppm señales de carbonos CH base de OH y en 60.52 ppm una señal característica de metileno base de oxígeno. Con apoyo de una muestra auténtica de  $\alpha,\alpha$ -trehalosa (Sigma-Aldrich) y la comparación de su espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 45) se comprobó su identidad. El análisis mediante RMN en 2D (Figuras 69 y 70), incluyendo el experimento COSY (Figura 44) y la comparación con la literatura (Roslund et al., 2008) (Tabla 5) son consistentes. Igualmente se determinó el punto de fusión de los cristales (96–99 °C) junto con su  $[\alpha]_D^{20}$  °C +165° (c 0.02,  $\text{H}_2\text{O}$ ) y se comparó con la reportada (95–97 °C y  $[\alpha]_D^{20}$  °C +169°) (Koike et al., 1981); también se determinó la estructura de rayos-X (Figura 76) y su espectro de IR (Figura 75), lo que corroboró su estructura.

Debido a la simetría del azúcar (dos  $\alpha$ -D-glucopiranosas unidas), en los espectros de RMN se consideró que cada señal integra para el doble de protones o carbonos. También se determinó el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  con el experimento Water Suppression para mejor observación de las señales cercanas a la remanente del  $\text{D}_2\text{O}$  (Figuras 68).



**Figura 41.** Estructura molecular de la  $\alpha,\alpha$ -trehalosa (izquierda) y extracto aislado (derecha).



**Figura 42.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz) del  $\alpha,\alpha$ -trehalosa aislada del hongo de cultivo.

$\alpha,\alpha$ -trehalosa  
 $D_2O$

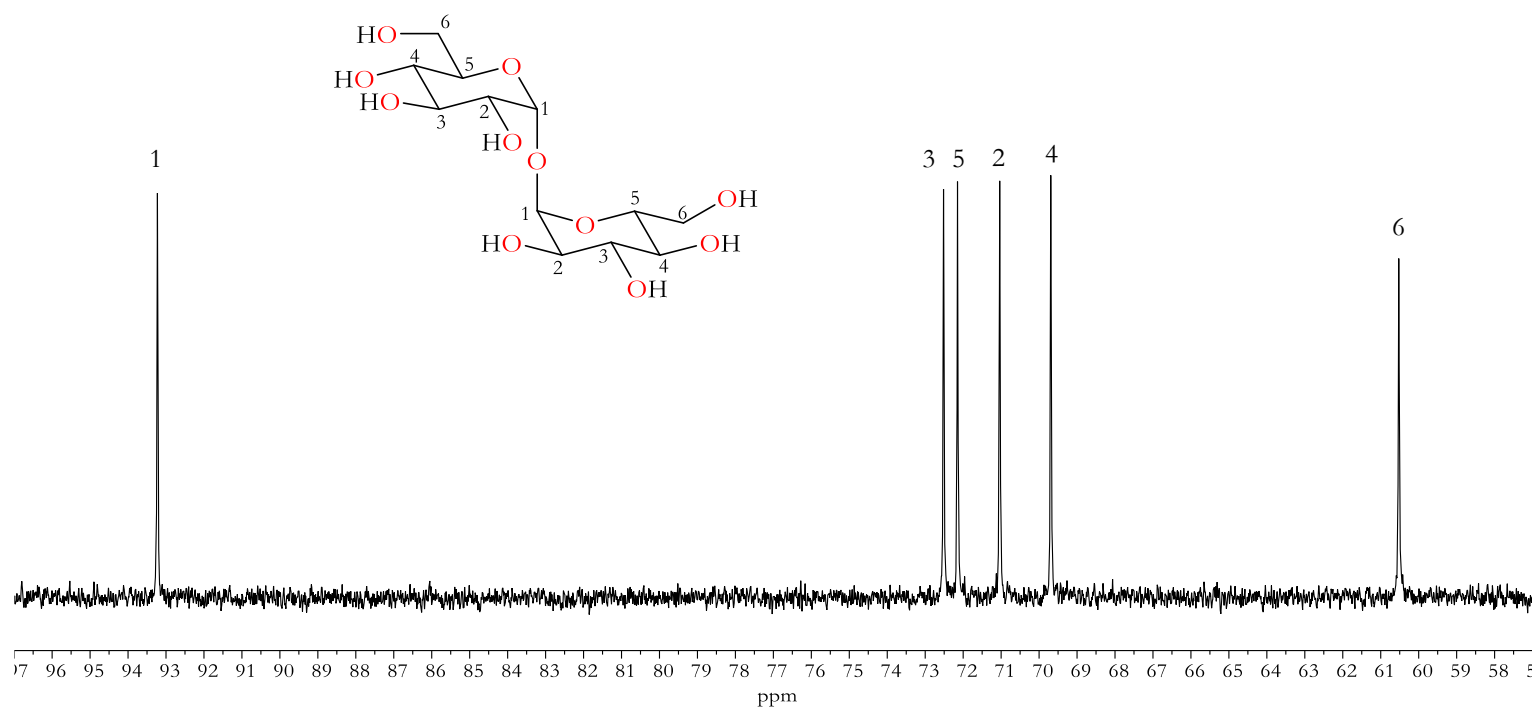
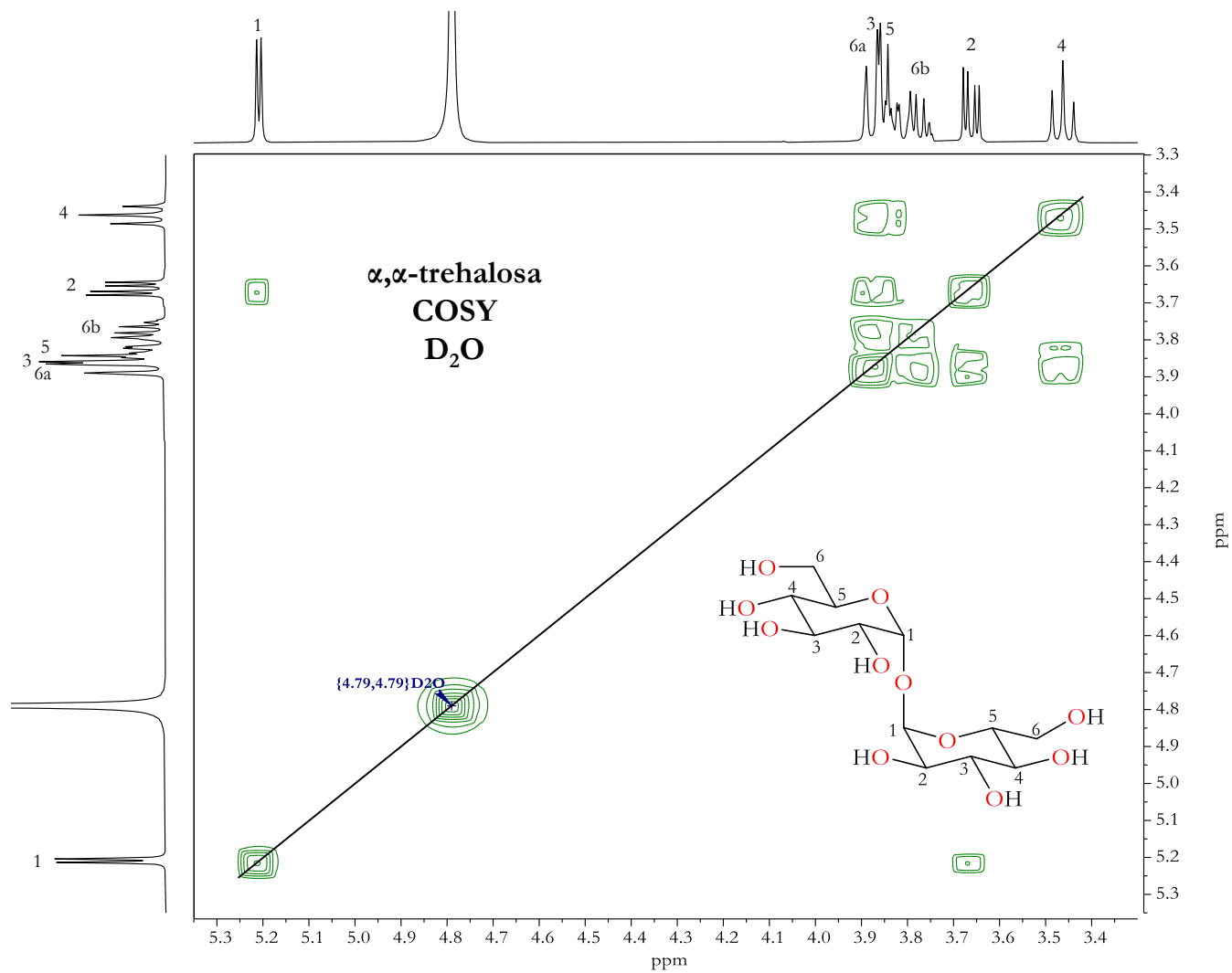
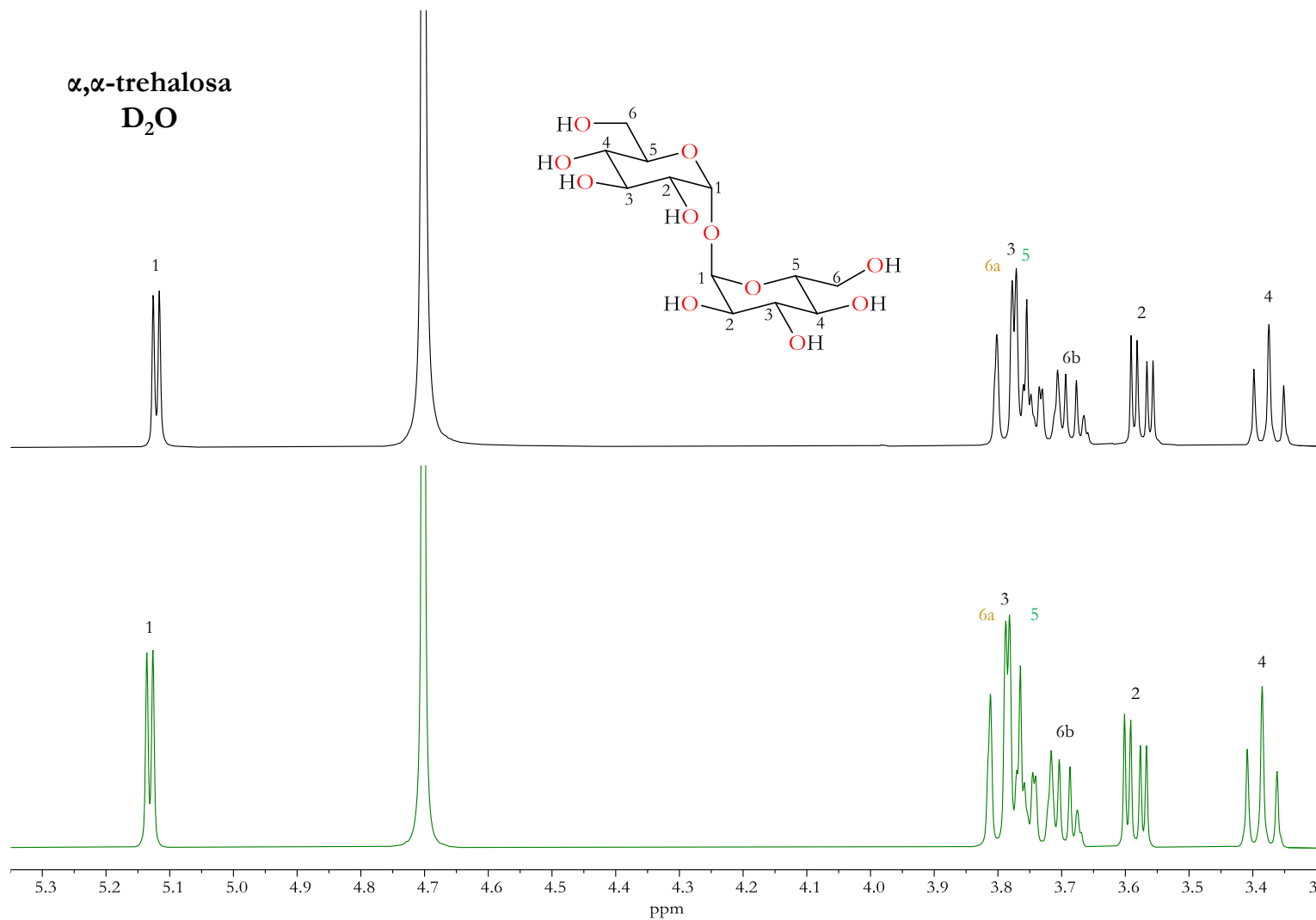


Figura 43. Espectro de RMN de  $^{13}C$  (100 MHz) del  $\alpha,\alpha$ -trehalosa aislada del hongo de cultivo.



**Figura 44.** Espectro de COSY del  $\alpha,\alpha$ -trehalosa aislada del hongo de cultivo.





**Figura 45.** Espectros de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz) del  $\alpha,\alpha$ -trehalosa aislada del hongo de cultivo (negro) y el reactivo de Sigma-Aldrich (verde).

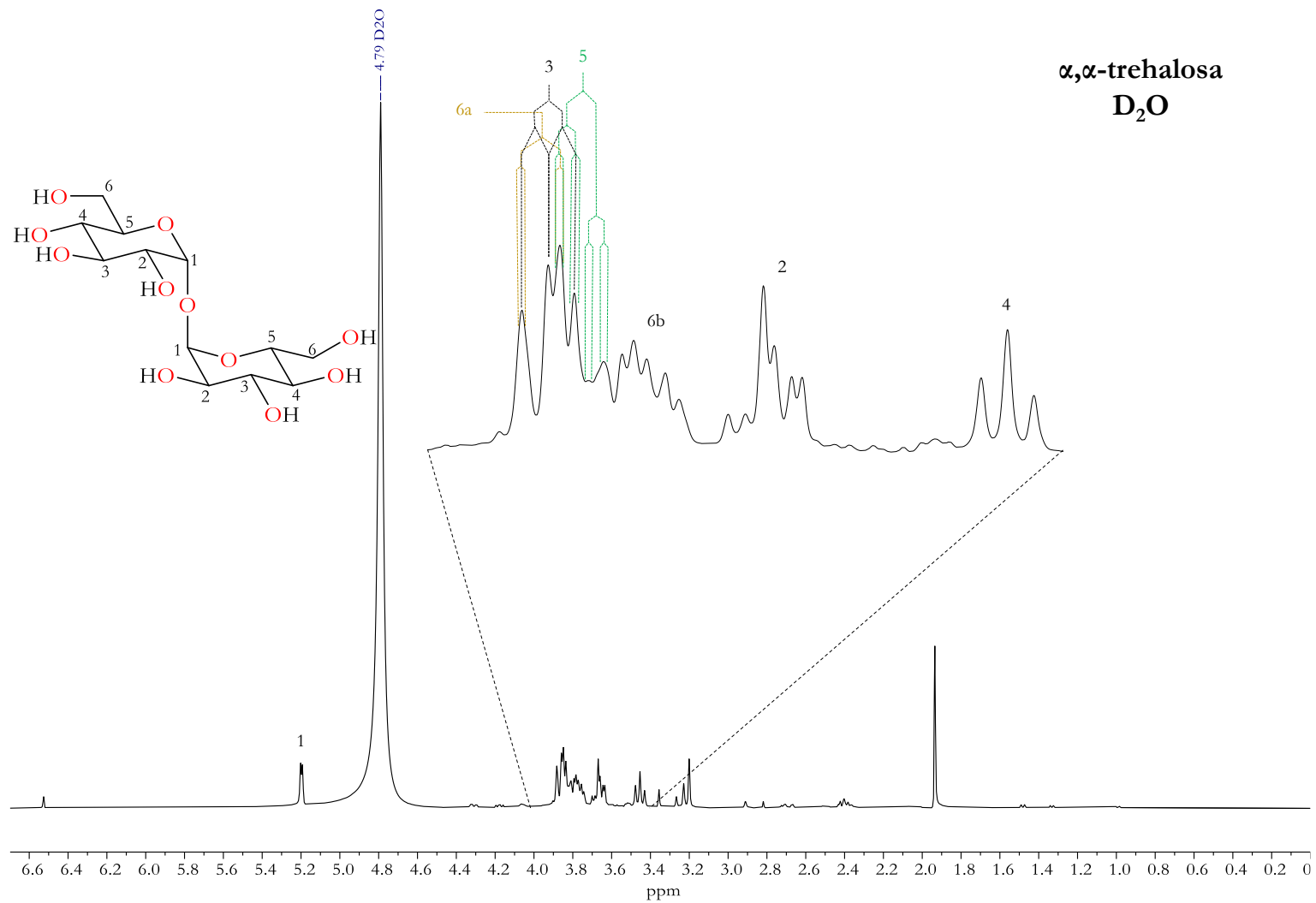
#### 7.4.3.2 Hongo silvestre

1.8 g de la fase acuosa del extracto con MeOH por ultrasonido se sometió a CC empacada con 7.5 pulgadas de celulosa microcristalina Avicel (133.8 g), usando 1.5 L de *n*-BuOH saturado con H<sub>2</sub>O y 1 L de H<sub>2</sub>O destilada como eluyente, obteniéndose 36 fracciones de 20 mL.

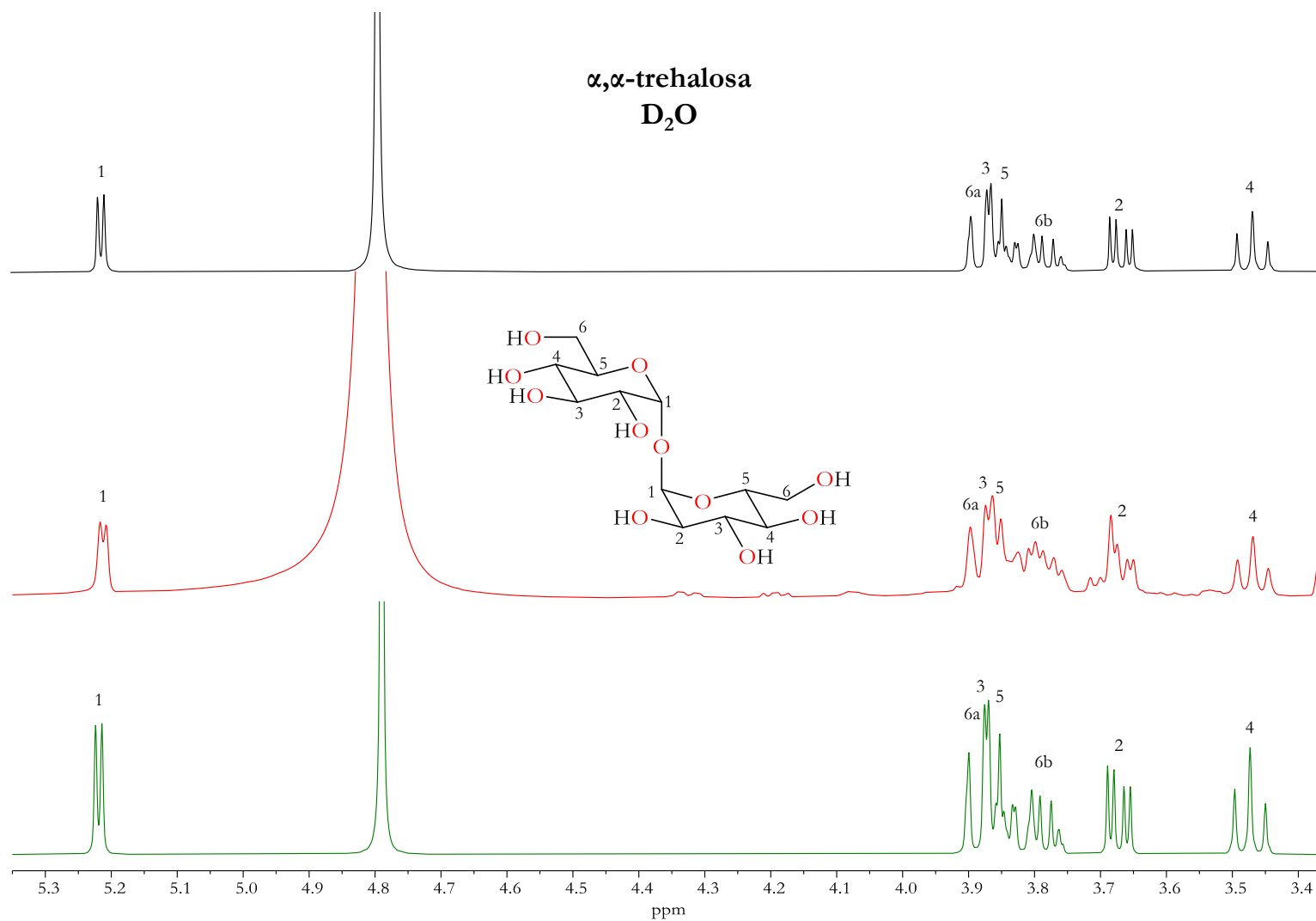
Las fracciones 31–36 dieron positivo a las pruebas cualitativas para identificación de alcaloides. La fracción 31 (0.2166 g) se sometió nuevamente a CC empacada con 6 pulgadas de celulosa microcristalina Avicel (49 g) como fase estacionaria y *n*-BuOH saturado con H<sub>2</sub>O destilada, CH<sub>3</sub>COOH al 5% y H<sub>2</sub>O como eluyente. La fracción 15 también dio positivo a las pruebas cualitativas para identificación de alcaloides, pero en menor intensidad.

En el espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, D<sub>2</sub>O, 28 °C) de la fracción 15 (Figura 46) se observaron las señales características de la  $\alpha,\alpha$ -trehalosa. También se apreciaron señales de otros posibles carbohidratos.

Realizando la comparación de los espectros de RMN de <sup>1</sup>H de la  $\alpha,\alpha$ -trehalosa aislada del hongo de cultivo y de la muestra auténtica de Sigma-Aldrich (Figura 47) confirmamos la identidad del compuesto. También se determinó el espectro de RMN de <sup>1</sup>H con el experimento Water Suppression (Figuras 71) para observar mejor las señales del compuesto.



**Figura 46.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) del  $\alpha,\alpha$ -trehalosa identificada del hongo silvestre.



**Figura 47.** Espectros de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz) del  $\alpha,\alpha$ -trehalosa aislada del hongo de cultivo (negro), identificada del hongo silvestre (rojo) y el reactivo de Sigma-Aldrich (verde).

**Tabla 5.** Comparación de los datos del desplazamiento químico (en ppm) entre la  $\alpha,\alpha$ -trehalosa aislada del hongo de cultivo y el reportado (Roslund et al., 2008).

Posición	Aislado		Referencia	
	$\delta$ $^1\text{H}$ (mult., <i>J</i> en Hz)	$\delta$ $^{13}\text{C}$	$\delta$ $^1\text{H}$ ( <i>J</i> en Hz) <sup>a</sup>	$\delta$ $^{13}\text{C}$ <sup>b</sup>
1	5.21 (d, 3.8)	93.23	5.178 (3.86)	93.93
2	3.66 (dd, 9.9 y 3.9)	71.04	3.633 (9.94)	71.71
3	3.87 (t, 9.7)	72.52	3.835 (9.12)	73.20
4	3.46 (t, 9.4)	69.69	3.434 (10.09)	70.37
5	3.85 (ddd, 9.4, 5.0 y 1.8)	72.15	3.809 (2.33 y 5.43)	72.83
6a	3.88 (dd, 12.1 y 1.8)	60.52	3.843 (12.35)	61.20
6b	3.77 (dd, 11.9 y 5.1)		3.746	

<sup>a</sup> Referenciado con DMSO no deuterado en 2,71 ppm con D<sub>2</sub>O a 500 MHz. <sup>b</sup> Referenciado con DMSO no deuterado en 39,39 ppm con D<sub>2</sub>O a 126 MHz.

## 7.4.4 Psilocibina

### 7.4.4.1 Hongo de cultivo

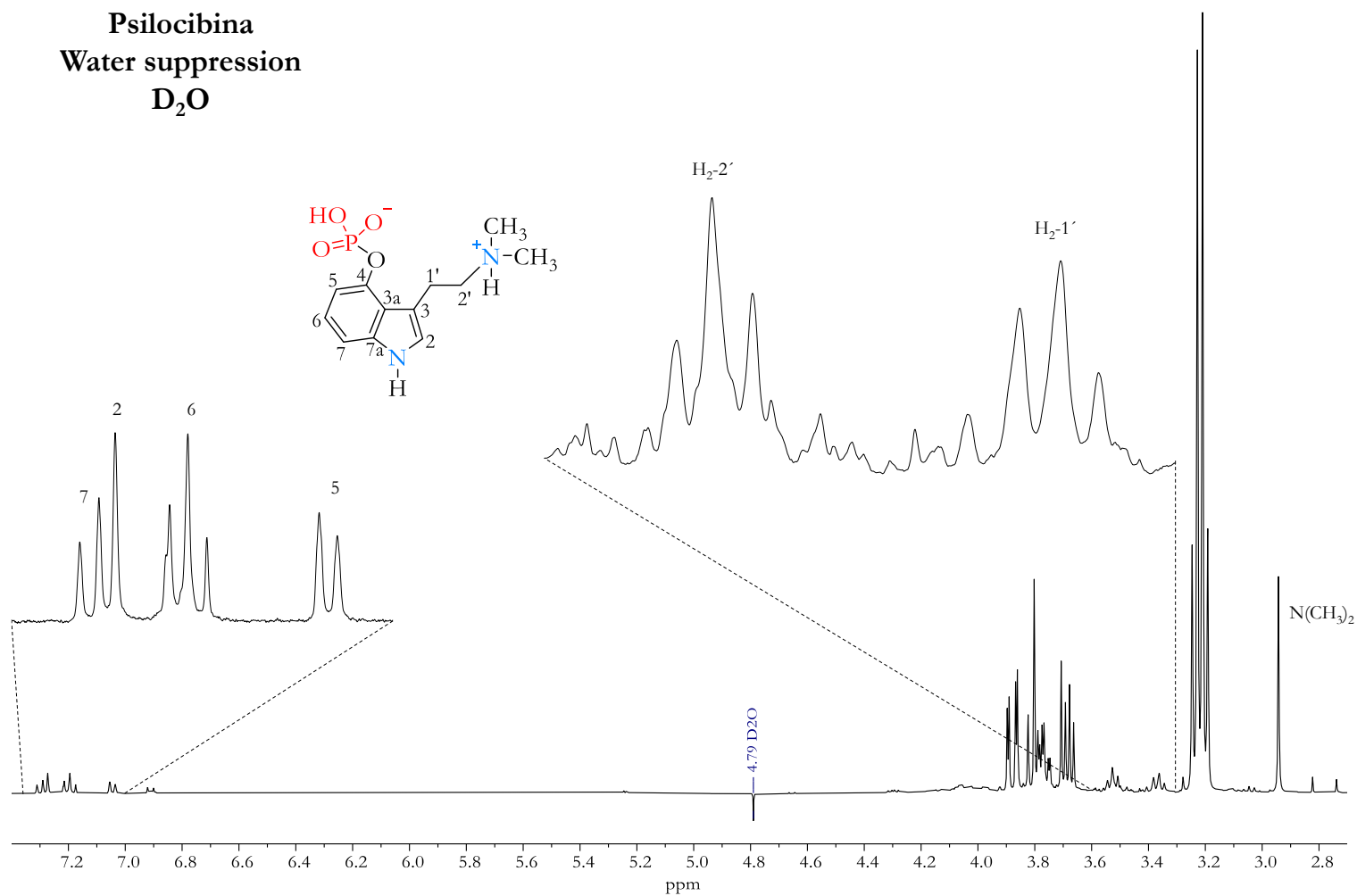
0.0567 g de la fase acuosa de la partición del extracto con MeOH por ultrasonido se sometió a CC empacada 5.5 pulgadas de celulosa microcristalina Avicel (4.4696 g), usando 150 mL de *n*-BuOH saturado con H<sub>2</sub>O destilada como eluyente, se colectaron 11 fracciones de 10 mL.

El espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, D<sub>2</sub>O, 20 °C) (Figura 48) de la fracción 4 (3.4 mg), de consistencia pastosa y color ámbar, mostró señales de protones en la zona de aromáticos entre 7.02–7.32 ppm, señales de metilenos entre 3.33–3.55 ppm y una señal simple en 2.94 ppm perteneciente a grupos metilo unidos al nitrógeno. También se observaron señales para la  $\alpha,\alpha$ -trehalosa, y otras entre 3.66–3.90 ppm que pudieran ser de otro carbohidrato.

Las pruebas colorimétricas para la identificación cualitativa de alcaloides dieron positivo en esta fracción. La comparación de los desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento obtenidos con los reportados (Shirota et al., 2003) son consistentes y confirmaron la identidad de la psilocibina.

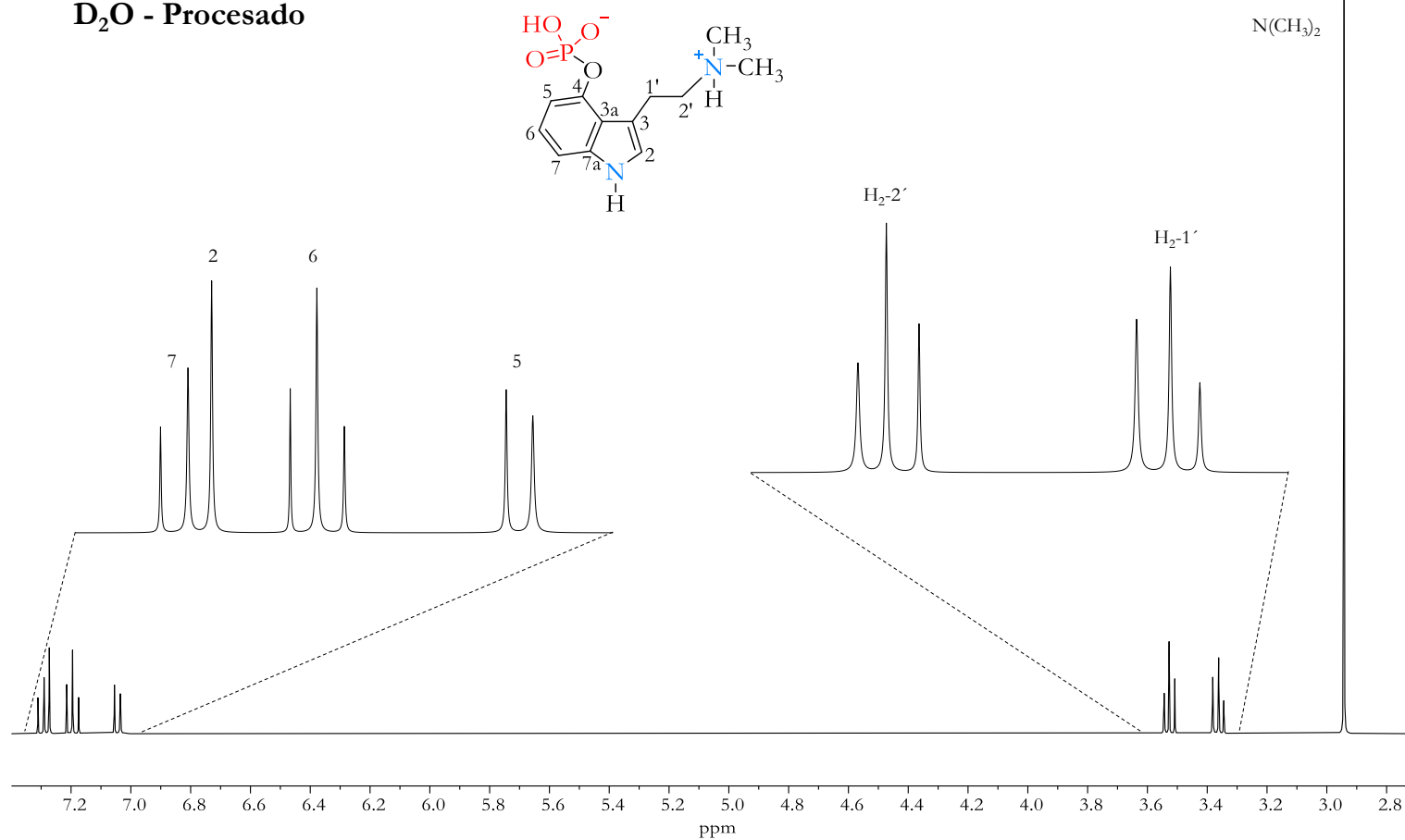
Utilizando el espectro de RMN de <sup>1</sup>H y empleando la herramienta de procesamiento de software MestReNova 12, se llevaron a cabo las operaciones necesarias para obtener un espectro en donde sólo se observan las señales del compuesto (libre de señales contaminantes) (Figura 49).

**Psilocibina**  
Water suppression  
D<sub>2</sub>O



**Figura 48.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz) de la psilocibina identificada en el hongo de cultivo.

**Psilocibina**  
**Water suppression**  
**D<sub>2</sub>O - Procesado**



**Figura 49.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz) procesado de la psilocibina identificada en el hongo de cultivo.



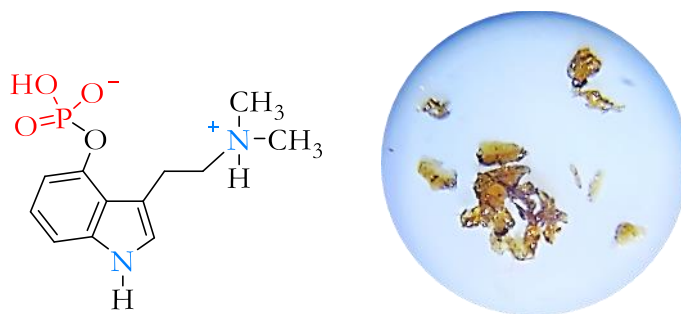
#### 7.4.4.2 Hongo silvestre

1.8 g de la fase acuosa del extracto con MeOH por ultrasonido se sometió a CC empacada con 7.5 pulgadas de celulosa microcristalina Avicel (133.8 g), usando 1.5 L de *n*-BuOH saturado con H<sub>2</sub>O y 1 L de H<sub>2</sub>O destilada como eluyente, obteniéndose 36 fracciones de 20 mL.

De las fracciones 31–36 se obtuvieron resultados positivos a las pruebas cualitativas para identificación de alcaloides. La fracción 31 (0.2514 g) se sometió a CC empacada con gel de sílice C18 (1.86 g) como fase estacionaria y MeOH como eluyente, se colectaron 10 fracciones de 5 mL. En la fracción 5 se obtuvo un compuesto en forma de resina ámbar oscura (6.6 mg), cuyo espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, D<sub>2</sub>O, 30 °C) (Figura 51) evidenció la presencia de la psilocibina. En el espectro de <sup>13</sup>C (100 MHz, D<sub>2</sub>O, 30 °C) (Figura 52) se observaron señales correspondientes a los carbonos aromáticos entre 107.44–146.18 ppm, los carbonos de metilenos en 21.77 ppm y 59.04 ppm y una señal en 42.74 ppm perteneciente a los carbonos de los metilos unidos al nitrógeno.

La comparación de los datos espectroscópicos con los de la literatura (Shirota et al., 2003) (Tabla 6) reveló una consistencia general. No obstante, se observa una discrepancia en la señal del protón 2, la cual presenta un desplazamiento de 7.2 ppm. Esta diferencia se debe a que en nuestro caso se presentó la superposición de esta señal con una de las señales del protón 6, y esto se atribuye a la temperatura de análisis en el equipo de RMN utilizado por nosotros, la cual, estuvo cercana a los 30 °C.

El análisis mediante RMN en 2D (Figuras 72 y 73), incluyendo el experimento COSY (Figura 53) de este compuesto confirman que la identidad del compuesto es la psilocibina (Figura 49).



**Figura 50.** Estructura molecular de la psilocibina (izquierda) y extracto aislado (derecha).

Al analizar los espectros de RMN se pueden identificar las señales correspondientes a un disolvente contaminante, el EtOH. Utilizando el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  y empleando la herramienta de procesamiento de software MestReNova 12, se llevaron a cabo las operaciones necesarias para obtener un espectro libre de las señales del EtOH (Figura 54).

La comparación de los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  del hongo de cultivo y hongo silvestre sin el procesamiento de software (Figura 55) mostró que en el espectro del hongo de cultivo no está presente el traslape de la señal del protón 2 con el 6 y que los desplazamientos y constantes de acoplamiento son totalmente consistentes con los descritos. Lo anterior, se atribuye a las variaciones de temperatura de análisis en el equipo de RMN (20-30 °C) y a la presencia de la  $\alpha,\alpha$ -trehalosa que pudiera formar puentes de hidrógeno con el alcaloide.

Psilocibina  
D<sub>2</sub>O

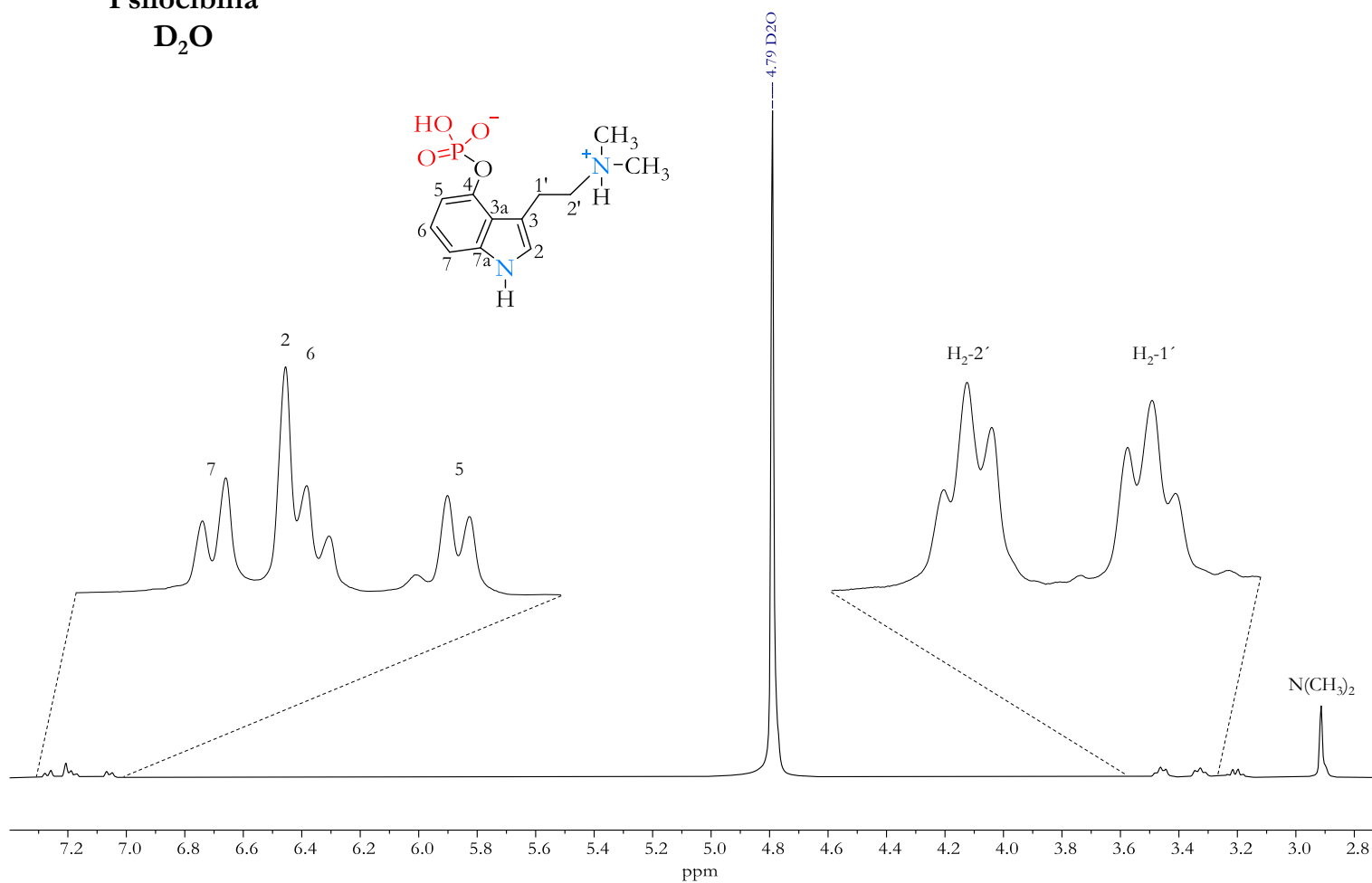


Figura 51. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz) de la psilocibina aislada en el hongo silvestre.

Psilocibina  
D<sub>2</sub>O

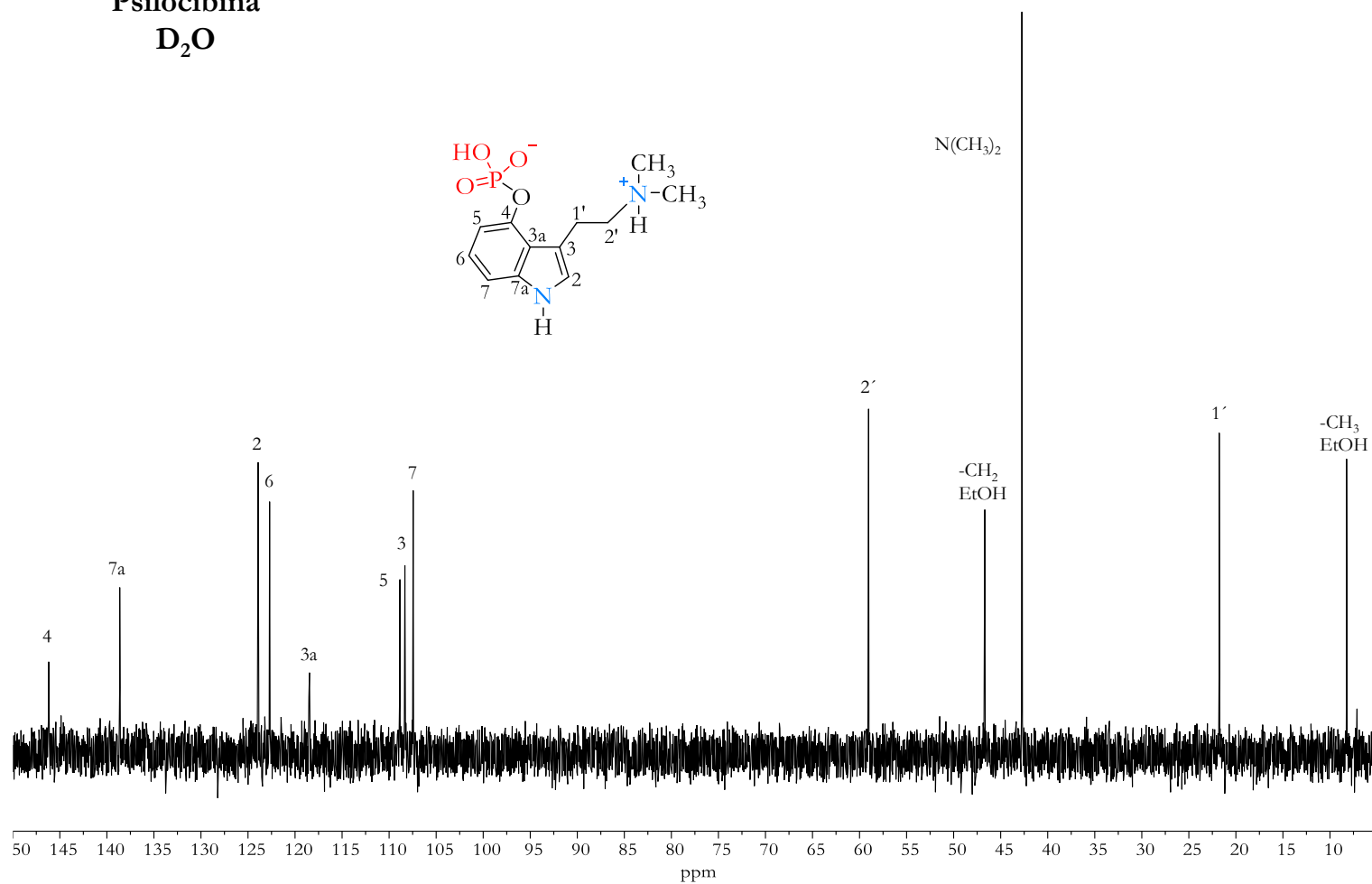
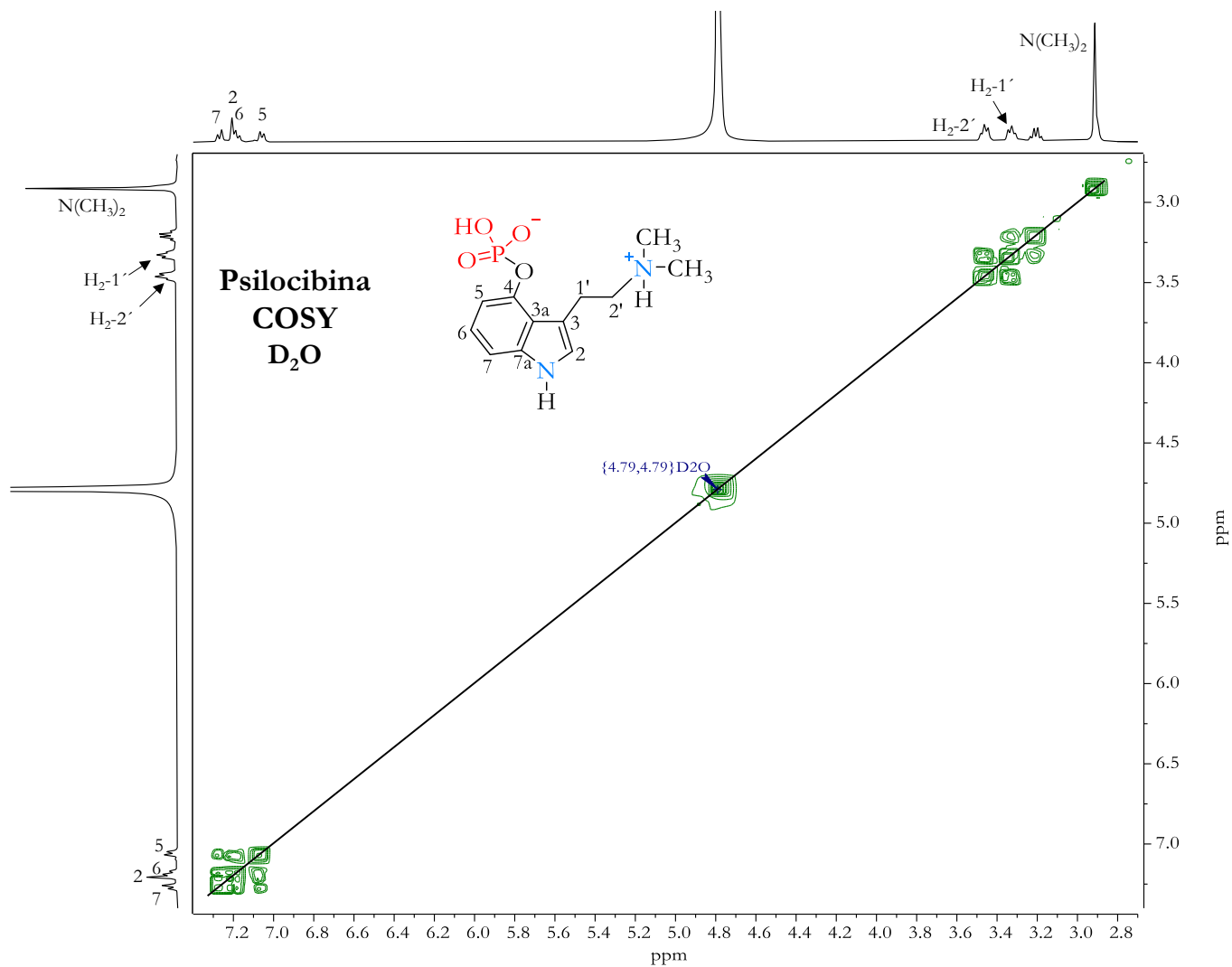
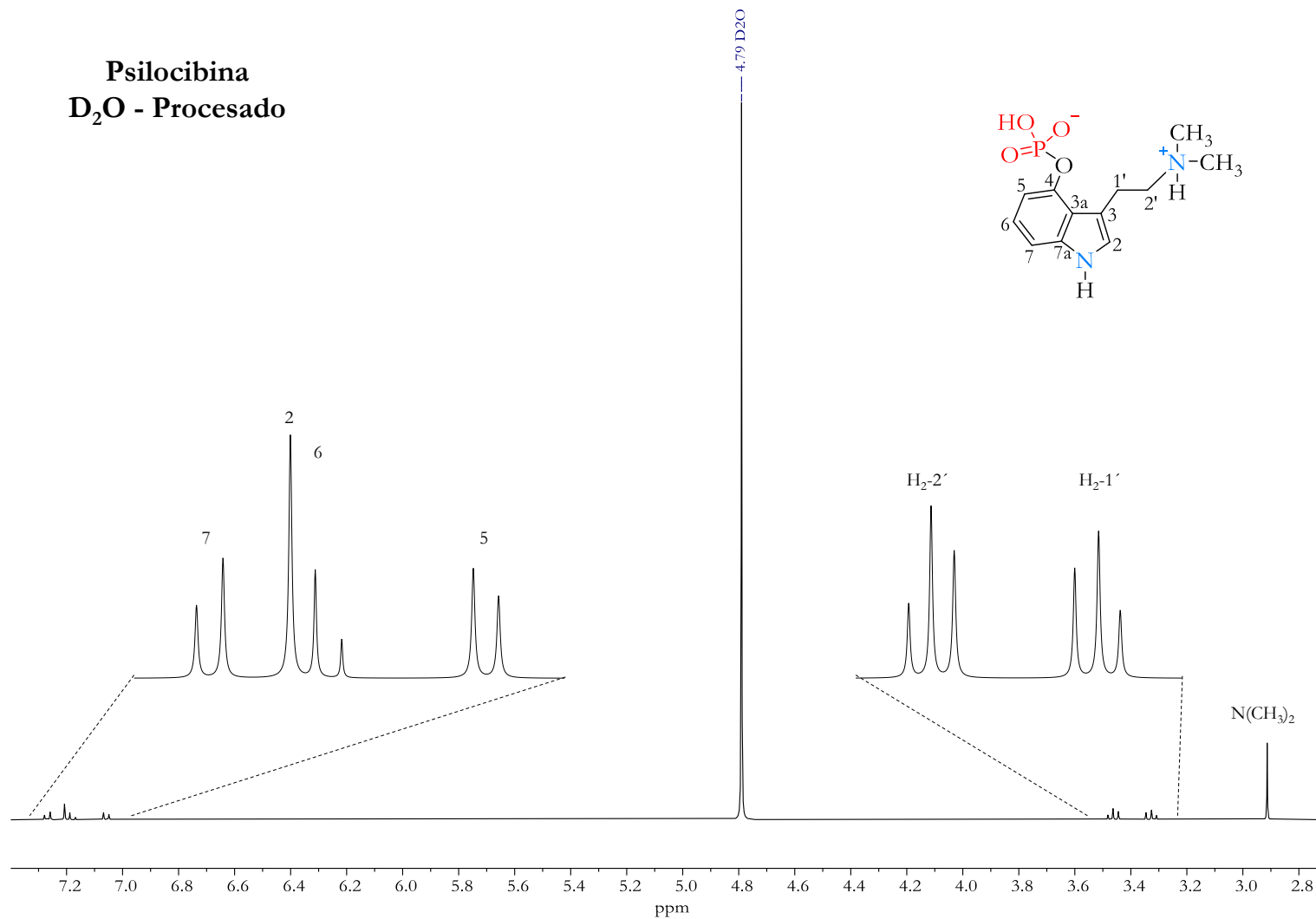


Figura 52. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz) de la psilocibina aislada del hongo silvestre.

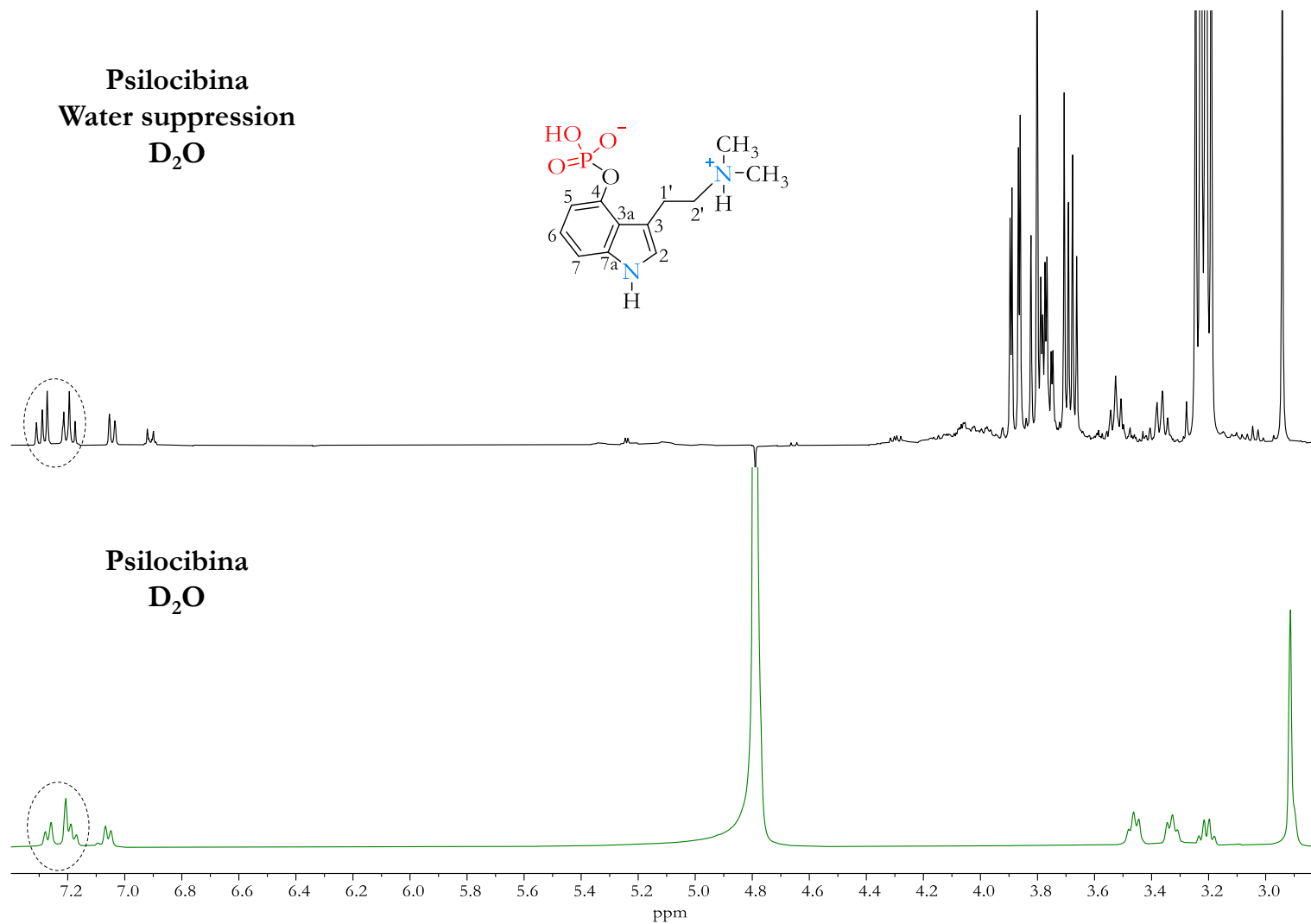


**Figura 53.** Espectro de COSY de la psilocibina aislada del hongo silvestre.

**Psilocibina**  
**D<sub>2</sub>O - Procesado**



**Figura 54.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz) procesado de la psilocibina aislada en el hongo silvestre.



**Figura 55.** Espectros de RMN de  $^1H$  (400 MHz) de la psilocibina identificada en el hongo de cultivo (negro) y aislada en el hongo silvestre (verde).

**Tabla 6.** Comparación de los datos del desplazamiento químico (en ppm) entre la psilocibina aislada del hongo silvestre, identificada del hongo de cultivo y el reportado (Shirota et al., 2003).

Posición	Aislado		Identificado	Referencia	
	$\delta$ <sup>1</sup> H (mult., <i>J</i> en Hz)	$\delta$ <sup>13</sup> C	$\delta$ <sup>1</sup> H (mult., <i>J</i> en Hz)	$\delta$ <sup>1</sup> H (mult., <i>J</i> en Hz)	$\delta$ <sup>13</sup> C <sup>a</sup>
1'	3.33 (t, 7.4)	21.77	3.28 (t, 7.4)	3.28 (t, 7.2)	22.4
2	7.21 (s)	123.92	7.19 (s)	7.18 (s)	123.3
2'	3.46 (t, 7.5)	59.04	3.44 (t, 7.1)	3.44 (t, 7.2)	59.7
3	-	108.33	-	-	108.6
3a	-	118.47	-	-	119.1
4	-	146.18	-	-	146.4
5	7.06 (d, 7.7)	108.85	6.96 (d, 7.9)	6.98 (d, 7.6)	109.5
6	7.20 (t, 7.6)	122.70	7.11 (t, 8.0)	7.13 (t, 7.6)	124.8
7	7.27 (d, 8.1)	107.44	7.21 (d, 8.0)	7.22 (d, 7.6)	108.4
7a	-	138.63	-	-	139.4
N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	2.91 (s)	42.74	2.86 (s)	2.86 (s)	43.4

<sup>a</sup> Se determinó en D<sub>2</sub>O +1 gota de MeOH para referenciar.



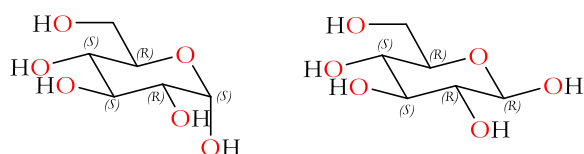
## 7.4.5 $\alpha$ - y $\beta$ -D-glucopiranosas

### 7.4.5.1 Hongo de cultivo

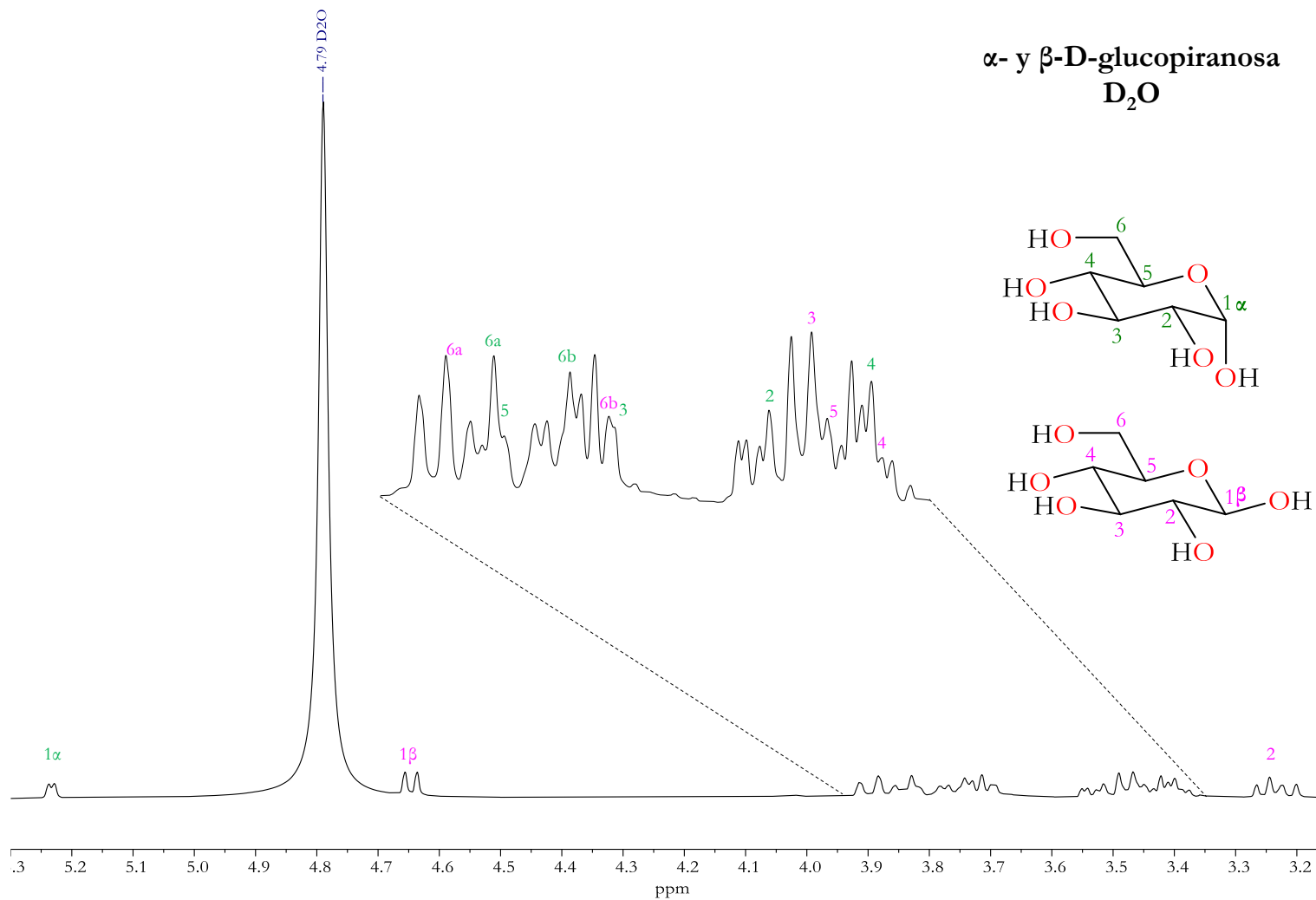
El análisis del espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 28 °C) (Figura 57) se observaron señales típicas de carbohidratos, como la señal doble en 5.23 ppm ( $J = 3.9$  Hz) característica de un protón anomérico con orientación alfa y la señal doble en 4.65 ppm ( $J = 7.9$  Hz) característica de un protón anomérico con orientación beta. También se observaron señales entre 3.0–4.0 ppm de CH base de OH.

Con apoyo de una muestra auténtica de glucosa (Sigma-Aldrich) y la comparación de su espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 58) y con la literatura (Roslund et al., 2008) (Tabla 7) se determinó que es una mezcla de  $\alpha$ - y  $\beta$ -D-glucopiranosas.

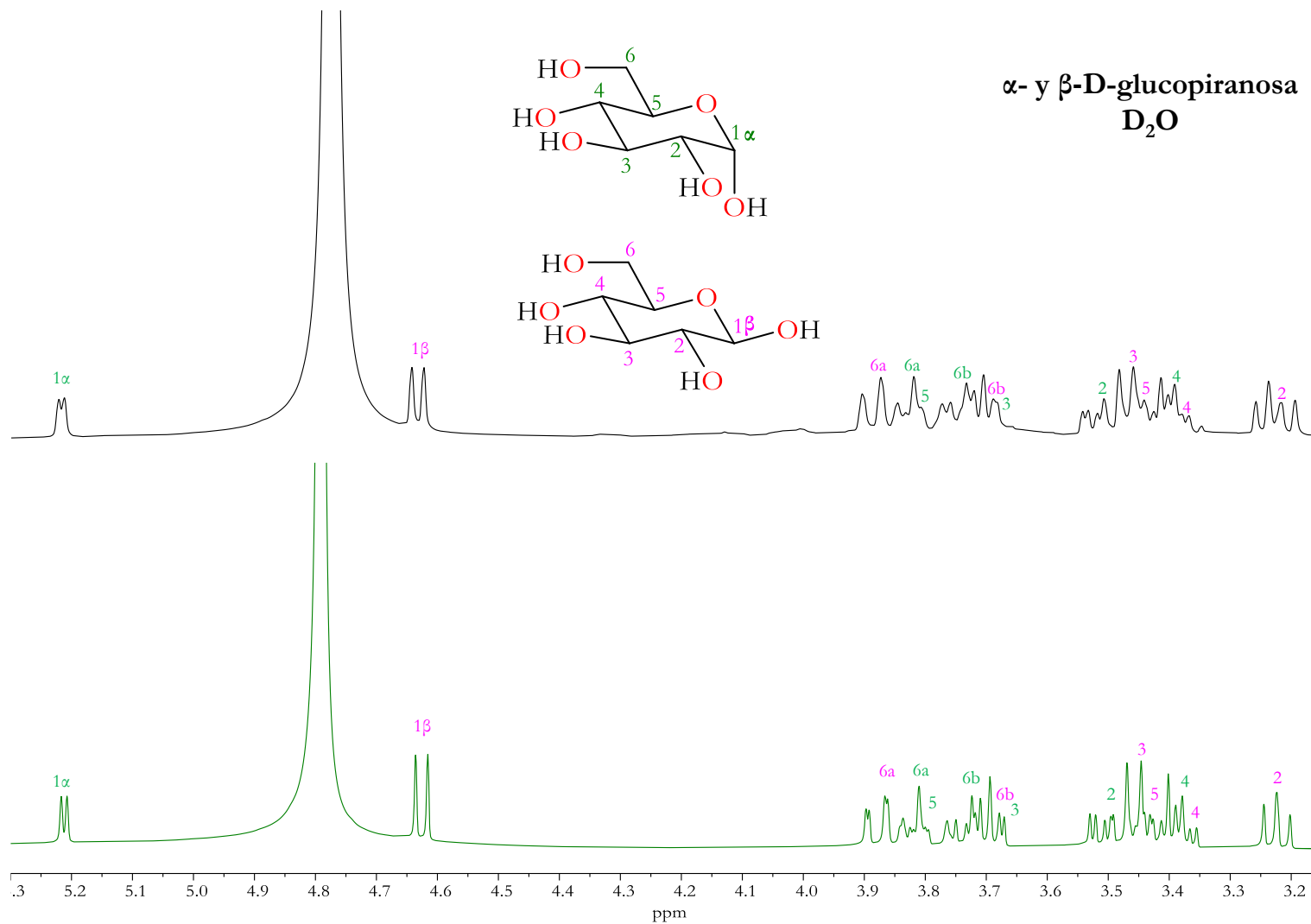
Es crucial tener en cuenta que, en el hongo la  $\alpha$ - y  $\beta$ -D-glucopiranosas no se encuentran en forma directa; las señales se generan debido a la hidrólisis ácida de la trehalosa, que se convierte a  $\alpha$ -D-glucopiranosas. La presencia de  $\beta$ -D-glucopiranosas se debe a la epimerización inducida por  $\text{D}_2\text{O}$  en la glucosa, logrando un equilibrio que proporciona estabilidad a la molécula, mitigando el efecto estérico.



**Figura 56.** Estructuras moleculares de la  $\alpha$ -D-glucopiranosas (izquierda) y la  $\beta$ -D-glucopiranosas (derecha).



**Figura 57.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz) de la  $\alpha$ - y  $\beta$ -D-glucopiranososa identificada en el hongo de cultivo.



**Figura 58.** Espectros de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz) de la  $\alpha$ - y  $\beta$ -D-glucopiranososa identificada en el hongo de cultivo (negro) y la muestra de Sigma-Aldrich.

**Tabla 7.** Comparación de los datos del desplazamiento químico (en ppm) entre la  $\alpha$ - y  $\beta$ -D-glucopiranososa identificada del hongo de cultivo y el reportado (Roslund et al., 2008).

Posición	Identificado		Referencia	
	$\alpha$	$\beta$	$\alpha$	$\beta$
	$\delta$ $^1\text{H}$ (mult., $J$ en Hz)	$\delta$ $^1\text{H}$ (mult., $J$ en Hz)	$\delta$ $^1\text{H}$ ( $J$ en Hz)	$\delta$ $^1\text{H}$ ( $J$ en Hz)
1	5.23 (d, 3.9)	4.65 (d, 7.9)	5.214 (3.80)	4.627 (7.97)
2	3.517	3.226	3.516 (9.84)	3.226 (9.46)
3	3.69	3.468	3.696 (9.17)	3.469 (9.17)
4	3.398	3.386	3.393 (9.99)	3.385 (9.92)
5	3.816	3.449	3.817 (2.31 y 5.40)	3.447 (2.27 y 5.95)
6a	3.817	3.879	3.823 (12.37)	3.879 (12.30)
6b	3.742	3.699	3.745	3.704

## 7.5 Cuantificación absoluta por RMN de $^1\text{H}$ en 1D (qHNMR)

Las muestras fueron pesadas con alta precisión en una balanza analítica, al igual que el 1,4-dinitrobenceno (que se empleó como estándar interno en todas las muestras). Luego, se disolvieron en DMSO- $d_6$  para su posterior transferencia a los tubos de RMN. Los parámetros del software se ajustaron meticulosamente para permitir la cuantificación, y a continuación, se procedió con el análisis.

Al obtener el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  se seleccionan las señales de interés y se integran, para obtener el valor de la integral y el rango. Para el cálculo de la cuantificación absoluta se utilizó la siguiente fórmula y se consideraron los siguientes parámetros en todos los casos:

$$P [\%] = \frac{n_{EI} \cdot \text{Int}_t \cdot \text{PM}_t \cdot m_{EI}}{n_t \cdot \text{Int}_{EI} \cdot \text{PM}_{EI} \cdot m_s} \cdot P_{EI}$$

$m_{EI}$  = masa del estándar interno (EI)

$m_s$  = masa de la muestra

$\text{Int}_{EI}$  = integral de la señal de resonancia del EI que se utiliza para la cuantificación

$\text{Int}_t$  = integral de la señal de resonancia del analito objetivo (t) que se utiliza para cuantificación

$n_{EI}$  = número de protones que dan lugar a  $\text{Int}_{EI}$

$n_t$  = número de protones del analito objetivo que dan lugar a  $\text{Int}_t$

$\text{PM}_{EI}$  = peso molecular del estándar interno

$\text{PM}_t$  = peso molecular del analito objetivo

$P_{EI}$  = pureza del estándar interno, como valor porcentual

Para el cálculo del porcentaje relativo (relación porcentual entre los compuestos) se utilizó la siguiente fórmula:

$$PR_A [\%] = \frac{\text{Int}_A}{n_A} \qquad PR_A + PR_B = PR_T \qquad \%A = \frac{PR_A}{PR_T} \cdot 100\%$$

Considerando que:  $\%A + \%B = 100\%$

### 7.5.1 Extracto con MeOH por ultrasonido del hongo silvestre

$$m_{EI} = 1.4 \text{ mg}$$

$$Int_{EI} = 4$$

$$PM_{EI} = 168.11 \text{ g/mol}$$

$$P_{EI} = 98 \%$$

$$n_{EI} = 4$$

$$m_S = 3.8 \text{ mg}$$

#### ↑ $\alpha, \alpha$ -trehalosa

$$Int_t = 0.35$$

$$n_t = 2$$

$$PM_t = 342.30 \text{ g/mol}$$

$$P [\%] = \frac{(4)(0.35)\left(342.30 \frac{\text{g}}{\text{mol}}\right)(1.4 \text{ mg})}{(2)(4)\left(168.11 \frac{\text{g}}{\text{mol}}\right)(3.8 \text{ mg})} \cdot 98\% \quad P [\%] = 12.8654 \% \quad PR [\%] = 0.175 \%$$

#### ↑ Psilocibina

$$Int_t = 0.04$$

$$n_t = 2$$

$$PM_t = 284.25 \text{ g/mol}$$

$$P [\%] = \frac{(4)(0.04)\left(284.25 \frac{\text{g}}{\text{mol}}\right)(1.4 \text{ mg})}{(2)(4)\left(168.11 \frac{\text{g}}{\text{mol}}\right)(3.8 \text{ mg})} \cdot 98\% \quad P [\%] = 1.2210 \% \quad PR [\%] = 0.02 \%$$

#### ↑ Peróxido de ergosterol

$$Int_t = 0.13$$

$$n_t = 2$$

$$PM_t = 428.65 \text{ g/mol}$$

$$P [\%] = \frac{(4)(0.13)\left(428.65 \frac{\text{g}}{\text{mol}}\right)(1.4 \text{ mg})}{(2)(4)\left(168.11 \frac{\text{g}}{\text{mol}}\right)(3.8 \text{ mg})} \cdot 98\% \quad P [\%] = 5.9840 \% \quad PR [\%] = 0.065 \%$$

Hay un porcentaje relativo de 8.3 de  $\alpha, \alpha$ -trehalosa por uno de psilocibina:

$$\% \alpha, \alpha\text{-trehalosa} = 89.74 \%$$

$$\% \text{Psilocibina} = 10.26 \%$$

Hay un porcentaje relativo de 2.7 de  $\alpha, \alpha$ -trehalosa por uno de peróxido de ergosterol:

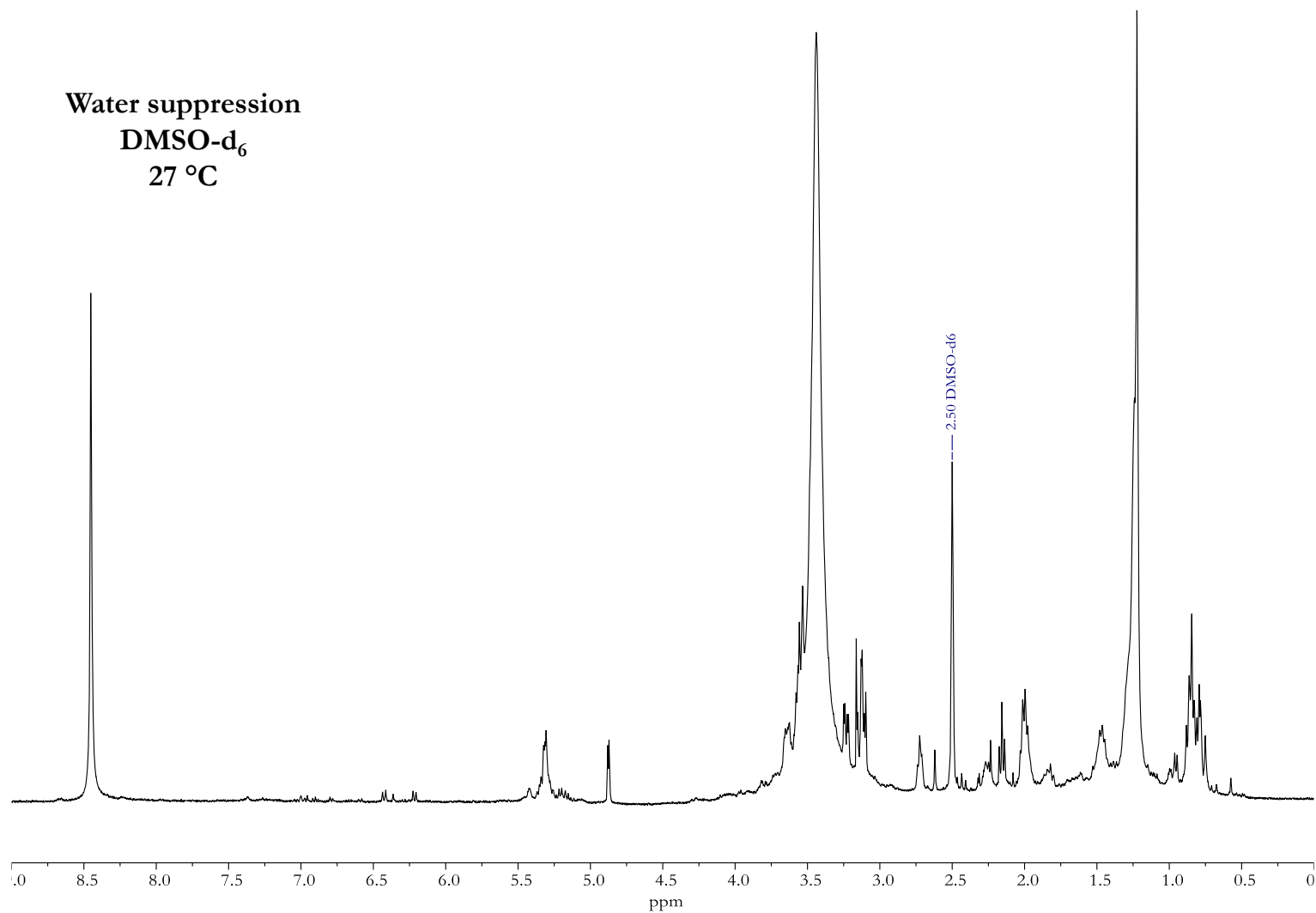
$$\% \alpha, \alpha\text{-trehalosa} = 72.92 \%$$

$$\% \text{Peróxido de ergosterol} = 27.08 \%$$

Hay un porcentaje relativo de 3.25 de peróxido de ergosterol por uno de psilocibina:

$$\% \text{Peróxido de ergosterol} = 76.47 \%$$

$$\% \text{Psilocibina} = 23.53 \%$$



**Figura 59.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz) de la cuantificación del extracto con MeOH por ultrasonido del hongo silvestre.

## 7.5.2 Extracto con MeOH por ultrasonido del hongo de cultivo

$$m_{EI} = 0.4 \text{ mg}$$

$$Int_{EI} = 4$$

$$PM_{EI} = 168.11 \text{ g/mol}$$

$$P_{EI} = 98 \%$$

$$n_{EI} = 4$$

$$m_s = 4 \text{ mg}$$

### ↑ $\alpha, \alpha$ -trehalosa

$$Int_t = 2.14$$

$$n_t = 2$$

$$PM_t = 342.30 \text{ g/mol}$$

$$P [\%] = \frac{(4)(2.14)\left(342.30 \frac{\text{g}}{\text{mol}}\right)(0.4 \text{ mg})}{(2)(4)\left(168.11 \frac{\text{g}}{\text{mol}}\right)(4 \text{ mg})} \cdot 98\% \quad P [\%] = 21.3513 \% \quad PR [\%] = 1.07 \%$$

### ↑ Psilocibina

$$Int_t = 0.42$$

$$n_t = 2$$

$$PM_t = 284.25 \text{ g/mol}$$

$$P [\%] = \frac{(4)(0.42)\left(284.25 \frac{\text{g}}{\text{mol}}\right)(0.4 \text{ mg})}{(2)(4)\left(168.11 \frac{\text{g}}{\text{mol}}\right)(4 \text{ mg})} \cdot 98\% \quad P [\%] = 3.4798 \% \quad PR [\%] = 0.21 \%$$

### ↑ Ergosterol

$$Int_t = 0.05$$

$$n_t = 1$$

$$PM_t = 396.65 \text{ g/mol}$$

$$P [\%] = \frac{(4)(0.05)\left(396.65 \frac{\text{g}}{\text{mol}}\right)(0.4 \text{ mg})}{(1)(4)\left(168.11 \frac{\text{g}}{\text{mol}}\right)(4 \text{ mg})} \cdot 98\% \quad P [\%] = 1.1561 \% \quad PR [\%] = 0.05 \%$$

Hay un porcentaje relativo de 5.1 de  $\alpha, \alpha$ -trehalosa por uno de psilocibina:

$$\% \alpha, \alpha\text{-trehalosa} = 83.59 \%$$

$$\% \text{Psilocibina} = 16.41 \%$$

Hay un porcentaje relativo de 21.4 de  $\alpha, \alpha$ -trehalosa por uno de ergosterol:

$$\% \alpha, \alpha\text{-trehalosa} = 95.54 \%$$

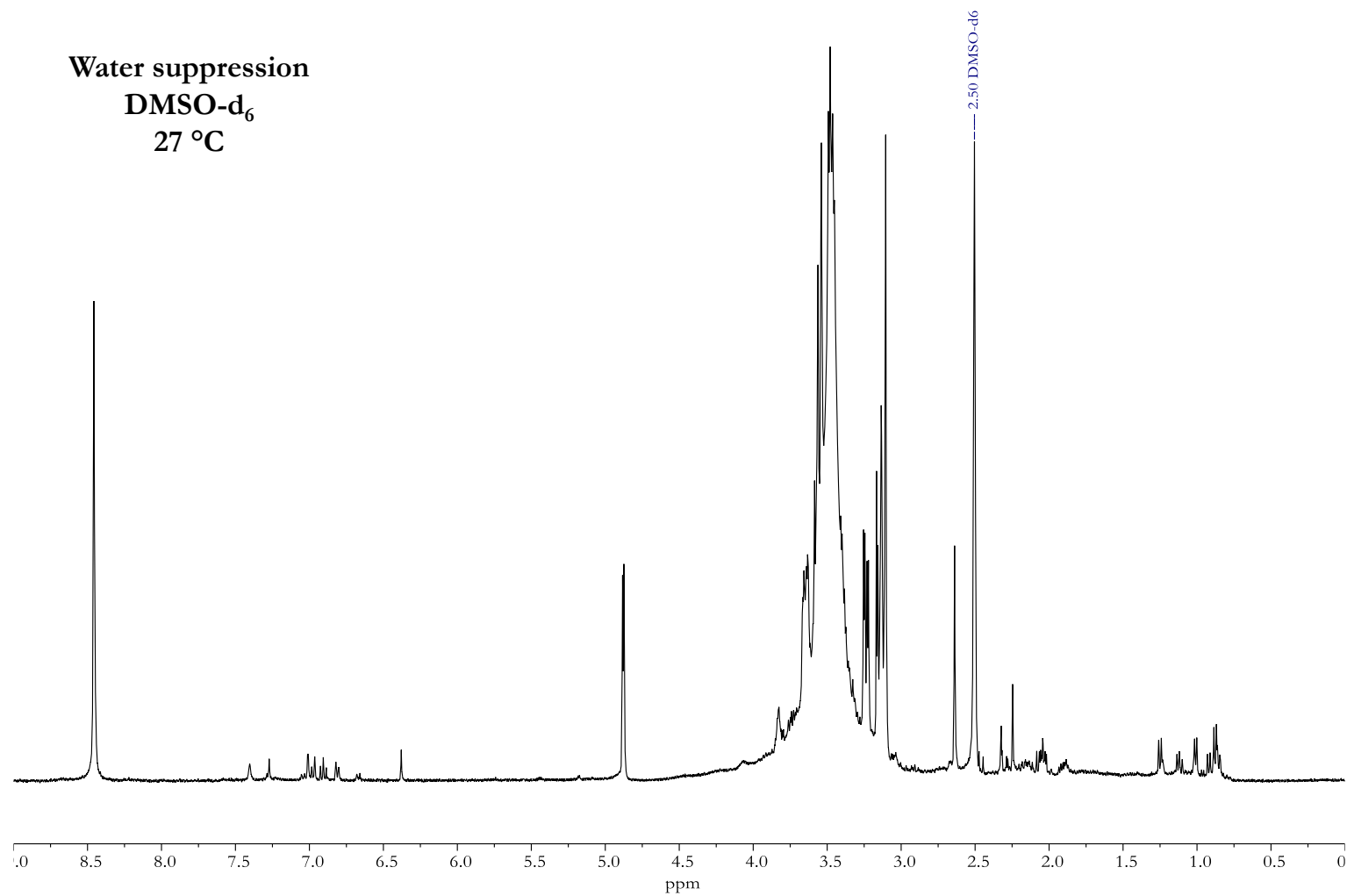
$$\% \text{Peróxido de ergosterol} = 4.46 \%$$

Hay un porcentaje relativo de 4.2 de ergosterol por uno de psilocibina:

$$\% \text{Peróxido de ergosterol} = 80.77 \%$$

$$\% \text{Psilocibina} = 19.23 \%$$





**Figura 60.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz) de la cuantificación del extracto con MeOH por ultrasonido del hongo de cultivo.

La sobreexplotación y la pérdida de hábitats naturales han disminuido la disponibilidad de hongos en entornos silvestres, lo que plantea desafíos para la obtención sostenible de compuestos beneficiosos. En este contexto, el análisis de hongos de cultivo emerge como una alternativa viable y ética.

Al comprender la química de los hongos cultivados, se puede optimizar la producción de compuestos específicos, manteniendo un control riguroso sobre las condiciones de cultivo. Esto no solo garantiza un suministro constante de extractos valiosos, sino que también permite la investigación y desarrollo continuo, promoviendo prácticas sostenibles y preservando la biodiversidad al reducir la presión sobre las poblaciones silvestres.

Analizando la cuantificación absoluta de los compuestos mayoritarios identificados en el hongo de cultivo y el hongo silvestre, es evidente una mayor concentración de metabolitos secundarios en el hongo de cultivo, este fenómeno se atribuye a las condiciones controladas de cultivo, donde los organismos se eligen y reproducen selectivamente. Estas condiciones controladas también han influido en las diferencias morfológicas entre las dos poblaciones.

Sin embargo, al examinar el porcentaje relativo de  $\alpha,\alpha$ -trehalosa con respecto a la psilocibina, constante en ambos casos, se destaca que es mayor en los hongos silvestres en comparación con los de cultivo. Este hallazgo se explica por la necesidad de los hongos silvestres de generar una mayor cantidad de ciertos metabolitos secundarios en un entorno natural, donde no hay control sobre las condiciones de crecimiento. Un ejemplo significativo es la  $\alpha,\alpha$ -trehalosa, que desempeña un papel crucial al preservar enzimas y proteger las membranas durante la deshidratación, permitiendo así que el hongo silvestre sobreviva en condiciones más desafiantes (Suárez Rodríguez et al., 2015).

## **7.6 Evaluación de la actividad antidepresiva y ansiolítica del extracto con MeOH por ultrasonido y la fase acuosa del hongo de cultivo**

### **7.6.1 Prueba de campo abierto (prueba de ansiedad)**

Esta prueba consistió en colocar cada ratón en una caja de acrílico dividida en 12 cuadros de medida 6 cm x 6 cm, en donde se registró la actividad ambulatoria contando el número de cuadros explorados por los ratones en un lapso de 2 minutos (Prut & Belzung, 2003). Una disminución significativa en los eventos se consideró como respuesta ansiolítica, mientras que si esta reducción era casi total se relacionó con efecto sedante (Hernandez-León et al., 2017). Además, el número de veces que los ratones se pararon sobre sus patas traseras y apoyaron sus patas delanteras en la pared del cilindro se registró durante 5 minutos, esto como un indicador adicional del efecto tranquilizante o ansiolítico.

### **7.6.2 Prueba de Rota-rod (prueba de coordinación motora)**

Para seleccionar sólo los ratones con habilidad para realizar la actividad de nado, éstos se habituaron inicialmente a la actividad motora en la prueba de rota-rod (prueba utilizada también para evaluar neurotoxicidad) (modelo 7600 marca Ugo Basile, con rodillo de diámetro de 4 cm). El entrenamiento de los ratones fue para aquellos que pudieran permanecer en el rodillo giratorio a 16 rpm durante al menos 5 minutos. Luego, los ratones que completaron con éxito esta prueba preliminar se seleccionaron y se agruparon en grupos de seis. Posteriormente, a los animales se les realiza una preprueba de nado y al siguiente día la prueba después de 30 minutos de la administración de los tratamientos. Para ello se registró el tiempo que cada ratón pudo mantenerse en el Rota-rod durante al menos 2 minutos, lo cual se consideró como el tiempo de actividad motora (González-Trujano et al., 1998).

### 7.6.3 Prueba de nado forzado (PNF) para inducir conducta tipo depresiva

La prueba consiste en colocar a los animales de forma individual en un cilindro de vidrio que mide 26 cm de alto y 12 cm de diámetro conteniendo 17 cm de agua a una temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . La PNF consistió en dos sesiones de nado; en la primera sesión llamada "pre-prueba", los ratones son expuestos al nado durante 15 minutos, 24 h después se sometieron a una segunda sesión de 5 minutos denominada "prueba final". Después de cada sesión, los ratones fueron retirados del cilindro, secados con una toalla y colocados en una jaula con aserrín y una lámpara de luz roja durante 15 minutos antes de ser regresados a sus jaulas regulares (Porsolt et al., 1977).

Para el registro de la actividad de nado se empleó una técnica de conteo en intervalos de tiempo de 5 segundos para evaluar la presencia de los siguientes comportamientos:

- † Inmovilidad, que implicaba flotar sin luchar y realizar movimientos mínimos necesarios para mantener la cabeza por encima del agua.
- † Nado, que incluyó movimientos activos, es decir, los animales que se desplazaban y se sumergían alrededor del cilindro.
- † Escalamiento, se refiere a los movimientos vigorosos con sus patas delanteras y sobre la pared del cilindro.

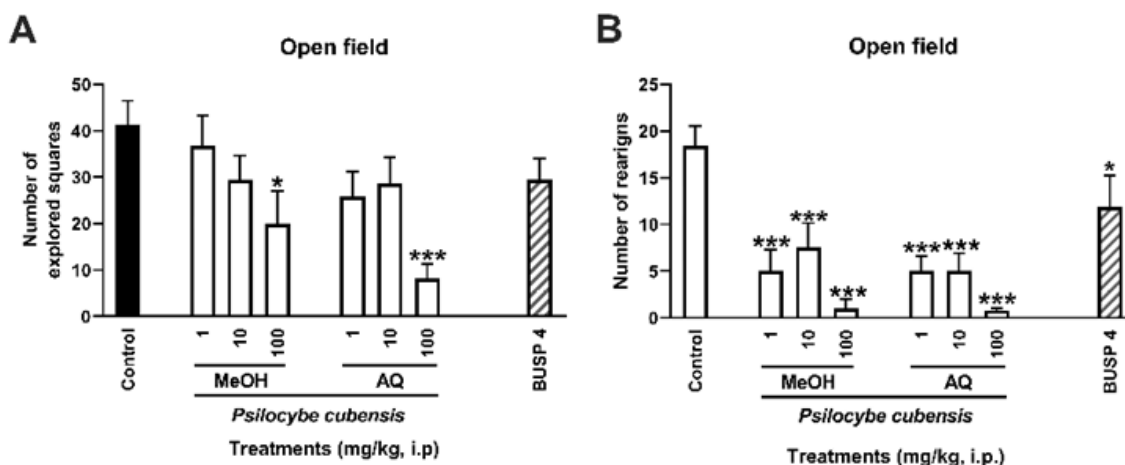
Los resultados se expresan como el promedio de los registros de comportamientos en cuentas  $\pm$  SEM realizados cada 5 segundos durante un período de 5 minutos. Imipramina (10 mg/kg, i.p) y Fluoxetina (10 mg/kg, subcutánea) como fármacos de referencia (Valdés-Sustaita et al., 2017).

### 7.6.4 Análisis estadístico

Los resultados se presentan como la media  $\pm$  SEM de un grupo de 6 ratones. Las pruebas estadísticas para evaluar las diferencias dependieron de la comparación de más de 2 grupos contra el vehículo o entre dosis en casos de la evaluación dosis-respuesta mediante un análisis de varianza de una vía (ANADEVA) seguido de la prueba de Dunnett o Tukey, respectivamente. En el análisis del electroencefalograma (EEG) se obtuvo la potencia espectral, donde se

compararon las condiciones basales y después del tratamiento mediante un ANADEVIA de un factor seguido de la prueba de Bonferroni. Los datos posteriores al tratamiento se contrastaron con los datos del grupo de control (vehículo) mediante una prueba t de Student no pareada. Las diferencias se consideraron como significativas cuando el valor de  $p$  fue menor a 0.05. El software utilizado para el análisis estadístico fue el GraphPad Prism (Versión 9.5 para Windows, GraphPad Software, 2022).

Después del tratamiento con el extracto metanólico (MeOH) y la fase acuosa (AQ) se realizaron las pruebas de campo abierto (Figura 61) para observar el efecto tipo ansiolítico, igualmente, las pruebas de rota-rod, escalamiento, inmovilidad y conductas de nado para observar el efecto de tipo antidepresivo (Figura 62). Finalmente, se realizó el análisis EEG donde se observa un registro representativo de la actividad de la corteza frontal izquierda en la basal y postratamiento a los 30-35, 60-65 y 85-90 minutos, notándose la disminución en la amplitud de la actividad EEG desde los primeros 30 minutos (Figura 63).

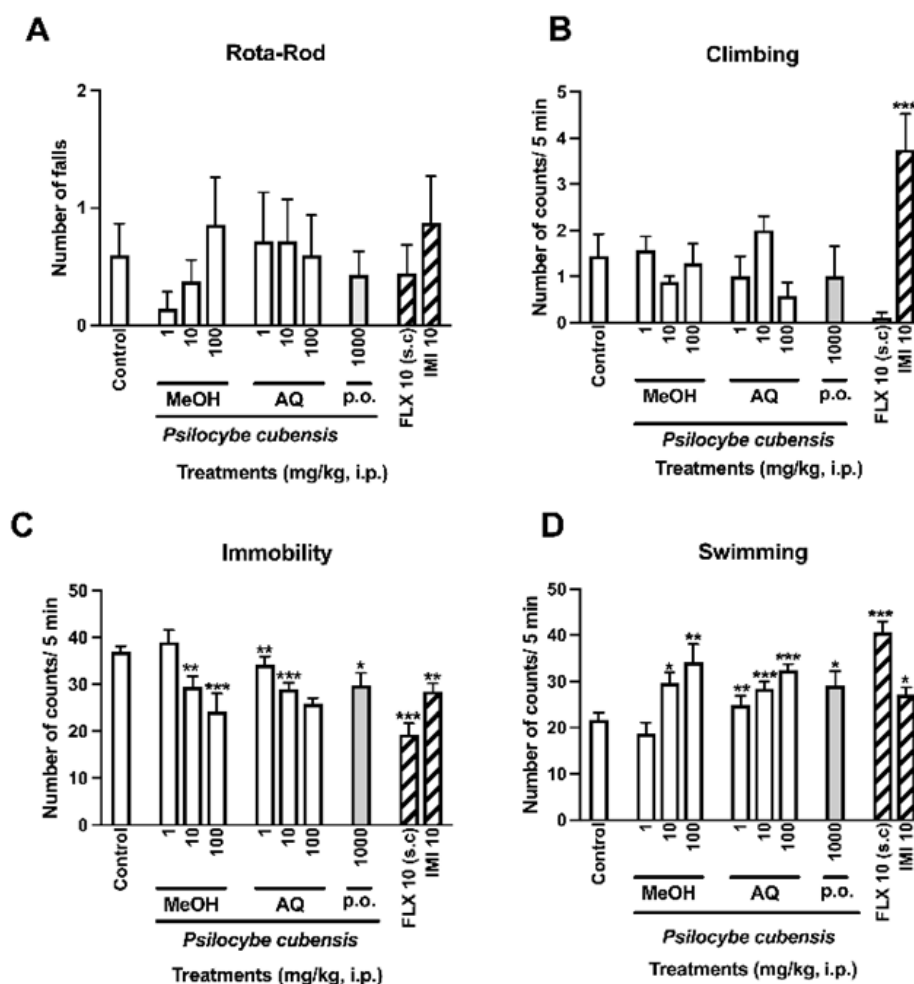


**Figura 61.** Efectos de tipo ansiolítico en la actividad ambulatoria (A) y el comportamiento de levantamientos (B).

En la prueba de campo abierto (Figura 61) se observa el efecto tipo ansiolítico después del tratamiento con la fase acuosa (AQ) y el extracto metanólico (MeOH) del hongo, comparados

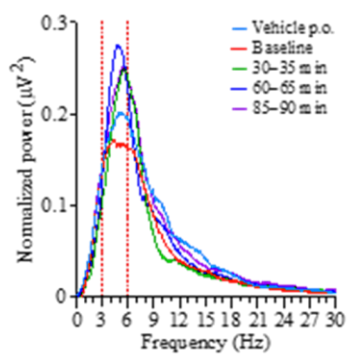
con el fármaco de referencia (BUSP 4, 4 mg/kg, i.p.) en la actividad ambulatoria (A) y el comportamiento de levantamientos (B) en el ensayo de campo abierto en ratones, ANADEVa de un factor seguido de la prueba de Dunnett en la comparación con el grupo de vehículos. \* $p < 0.05$  ó \*\*\* $p < 0.001$  para  $n > 6$  ratones.

En las pruebas de tipo antidepresivo la vía de administración fue parenteral (i.p.) o enteral (p.o.) y se realizó una comparación con los fármacos de referencia Fluoxetina (FLX, 10 mg/kg, s.c.) o Imipramina (IMI, 10 mg/kg, i.p.) y el vehículo (H<sub>2</sub>O destilada, grupo control). En la prueba de nadado forzado en ratones se realizó una evaluación preliminar de la capacidad motora para nadar. Los datos se muestran como la media  $\pm$  S.E.M. de al menos seis animales, ANADEVa de un factor seguido de la prueba de Dunnett, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  ó \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

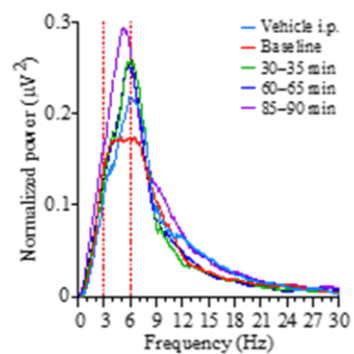


**Figura 62.** Efecto tipo antidepresivo en: A) prueba de la rota-rod, B) escalamiento, C) inmovilidad y D) conductas de nado.

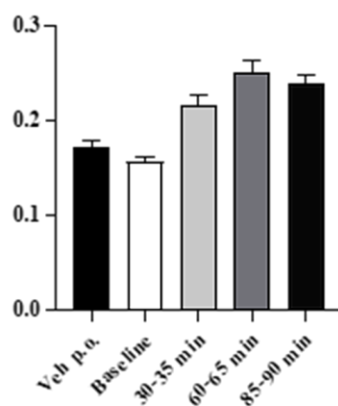
Hongo completo 1000 mg/kg p.o.



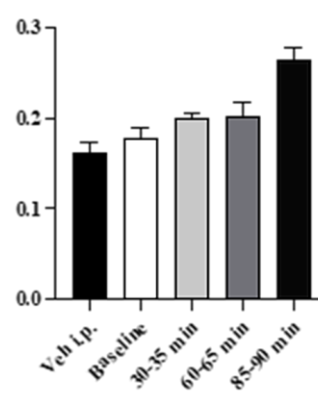
Extracto acuoso 100 mg/kg i.p.



Banda 3-6 Hz



Banda 3-6 Hz



**Figura 63.** Análisis EEG después de la administración del hongo completo y la extracción acuosa en ratones.





## 8. CONCLUSIONES

---

- † Las modificaciones morfológicas en los hongos silvestres y la reducción de su fructificación en la zona de recolecta son consecuencia de factores físicos, químicos y sobre todo de manipulación humana.
- † El mejor método de extracción empleado en el proyecto, con relación a los rendimientos y que logra obtener gran cantidad de compuestos, es con MeOH grado HPLC por ultrasonido.
- † Aunque la extracción con la solución de CH<sub>3</sub>COOH al 5% muestra mayor rendimiento que por ultrasonido, es selectivo para obtención de sacáridos.
- † En el hongo silvestre se determinaron 3 compuestos mayoritarios, de los cuales dos fueron identificados (peróxido de ergosterol y  $\alpha,\alpha$ -trehalosa) y uno se aisló (psilocibina).
- † En el hongo proveniente de cultivo se identificaron 5 compuestos (psilocibina,  $\alpha,\alpha$ -trehalosa, peróxido de ergosterol, ergosterol y  $\alpha$ - y  $\beta$ -D-glucopiranosas), de los cuales dos se aislaron ( $\alpha,\alpha$ -trehalosa y ergosterol).
- † El precipitado blanco de aspecto ceroso es la  $\alpha,\alpha$ -trehalosa, tuvo presencia en las extracciones con MeOH por ultrasonido y reflujo.
- † De acuerdo a la comparación de los perfiles cromatográficos UHPLC del extracto total metanólico por reflujo y su fase acuosa, se determina que hay una mejor extracción de los alcaloides en la fase acuosa.
- † En relación a la presencia y altura de las señales, en el hongo silvestre se observa más presencia del peróxido de ergosterol que en el hongo de cultivo. Hay que tomar en cuenta que el ergosterol se fotooxida fácilmente y genera su peróxido, por tal motivo, hay más presencia de ergosterol en el hongo de cultivo que en el hongo silvestre y viceversa.

- † La temperatura es una variable importante a tomar en cuenta al momento del análisis por RMN, debido a que las variaciones alteran los desplazamientos químicos de las señales. Tal es el caso de la psilocibina, en el hongo de cultivo (22°C) no hay traslape del protón 2, mientras que en el hongo silvestre (30 °C) hay cambio en el desplazamiento y el protón 2 se traslapa con las señales del protón 6.
- † No se observa la presencia de  $\alpha$ -D-glucopiranososa en el hongo. El uso de una solución de CH<sub>3</sub>COOH al 5% para extracción conduce a la ruptura de los enlaces glicosídicos presentes en el  $\alpha,\alpha$ -trehalosa, este proceso resulta en la división de la molécula, generando  $\alpha$ -D-glucopiranososa como producto.
- † El estudio químico de hongos cultivados se erige como una estrategia clave para aprovechar los beneficios de estos organismos de manera responsable y duradera.
- † De acuerdo con los estudios biológicos, la concentración en la que se administra el hongo es fundamental para el efecto esperado (ansiolítico o antidepresivo) y se exhibe como una alternativa eficaz en comparación con la Fluoxetina.
- † Son necesarias investigaciones posteriores que identifiquen el efecto del consumo de hongos del género *Psilocybe* en cada uno de los procesos psicológicos básicos y su nexa con la inteligencia emocional para evaluar el potencial terapéutico.

## 9. REFERENCIAS

---

- † Alban-J., G., Terán, M. del C., Robles-U., M., Quinde, F., & Niveiro, N. (2021). *Psilocybe cubensis* (Agaricales, Basidiomycota) en Ecuador. Lilloa, 86–94. <https://doi.org/10.30550/j.lil/2021.58.1/2021.09.30>
- † Andersson, C., Kristinsson, J., & Gry, J. (2009). Occurrence and use of hallucinogenic mushrooms containing psilocybin alkaloids. Nordic Council of Ministers. <https://doi.org/10.6027/tn2008-606>
- † Blei, F., Dörner, S., Fricke, J., Baldeweg, F., Trottmann, F., Komor, A., Meyer, F., Hertweck, C., & Hoffmeister, D. (2020). Simultaneous Production of Psilocybin and a Cocktail of  $\beta$ -Carboline Monoamine Oxidase Inhibitors in “Magic” Mushrooms. Chemistry – A European Journal, 26(3), 729–734. <https://doi.org/10.1002/chem.201904363>
- † Cooper, R., & Nicola, G. (2015). Natural Products Chemistry. Sources, separations, and structures. (CRC Press). Taylor & Francis Group.
- † Cortez-Gallardo, V., Macedo-Ceja, J. P., Hernández-Arroyo, M., Arteaga-Aureoles, G., Espinosa-Galván, D., & Rodríguez-Landa, J. F. (2004). Farmacognosia: breve historia de sus orígenes y su relación con las ciencias médicas. Revista Biomédica, 15(2), 123–136. <https://doi.org/10.32776/revbiomed.v15i2.381>
- † Delgado Fuentes, A. (1989). Glosario ilustrado de los terminos morfodescriptivos de los caracteres macroscopicos en el orden Agaricales (Basidiomycetes). [Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México]. <https://repositorio.unam.mx/contenidos/188120>
- † Echeverría, N., Lavista, M., Estrada, Á., & Henestrosa, A. (1979). María Sabina: Mujer Espíritu. Instituto Mexicano de Cinematografía. <https://www.imcine.gob.mx/Pagina/Noticia?op=d2c6da0d-c2cc-44e3-909c-82407f73af00>
- † Estrada, Á. (1979). Vida de María Sabina, la Sabia de Los Hongos. (2da ed.). Siglo veintiuno editores, S.A.
- † García, S. (2016). Síndrome alucinógeno, indoles alucinógenos. Revista Catalana de Micología. Revista Catalana de Micología, 37, 75–85.

- † Gaynes, R. (2017). The Discovery of Penicillin - New Insights After More Than 75 Years of Clinical Use. *Emerging Infectious Diseases*, 23(5), 849–853. <https://doi.org/10.3201/eid2305.161556>
- † González-Trujano, M. E., Navarrete, A., Reyes, B., & Hong, E. (1998). Some pharmacological effects of the ethanol extract of leaves of *Annona diversifolia* on the central nervous system in mice. *Phytotherapy Research*, 12(8), 600–602. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1573\(199812\)12:8<600::AID-PTR363>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1573(199812)12:8<600::AID-PTR363>3.0.CO;2-N)
- † González-Trujano, M. E., Urbina-Trejo, E., Santos-Valencia, F., Villasana-Salazar, B., Carmona-Aparicio, L., & Martínez-Vargas, D. (2021). Pharmacological and toxicological effects of *Ruta chalepensis* L. on experimentally induced seizures and electroencephalographic spectral power in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 271, 113866. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.113866>
- † Guzmán, G. (2003). Traditional Uses and Abuses of Hallucinogenic Fungi: Problems and Solutions. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 5(1), 4. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushr.v5.i1.80>
- † Guzman, G. (2005). Species Diversity of the Genus *Psilocybe* (Basidiomycotina, Agaricales, Strophariaceae) in the World Mycobiota, with Special Attention to Hallucinogenic Properties. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 7(1–2), 305–332. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushr.v7.i12.280>
- † Hakami, A. A., Nguyen, T. Q. T., Jacobsen, L., & Khandelia, H. (2023). The molecular basis of the antidepressant action of the magic mushroom extract, psilocin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1871(4). <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2023.140914>
- † Hernandez-Leon, A., González-Trujano, M. E., & Fernández-Guasti, A. (2017). The anxiolytic-like effect of rutin in rats involves GABAA receptors in the basolateral amygdala. *Behavioural Pharmacology*, 28(4), 303–312. <https://doi.org/10.1097/FBP.0000000000000290>
- † Hofmann, A. (2018). LSD: Cómo descubrí el ácido y qué pasó después en el mundo. Arpa.

- ↑ 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. <https://doi.org/10.1007/BF02159243>
- ↑ Hofmann, A., Heim, R., Brack, A., Kobel, H., Frey, A., Ott, H., Petrzilka, Th., & Troxler, F. (1959). Psilocybin und Psilocin, zwei psychotrope Wirkstoffe aus mexikanischen Rauschpilzen. *Helvetica Chimica Acta*, 42(5), 1557–1572. <https://doi.org/10.1002/hlca.19590420518>
- ↑ IAPA. (2023, July 5). Plan sectorial de salud mental y adicciones. Instituto Para La Atención y Prevención de Las Adicciones En La CDMX. <https://www.iapa.cdmx.gob.mx/comunicacion/nota/plan-sectorial-de-salud-mental-y-adicciones>
- ↑ Index Fungorum. (2023). An international project to index all formal names in the Fungi kingdom. CABI. <https://www.speciesfungorum.org/Names/NamesRecord.asp?RecordID=290107>
- ↑ INEGI. (2010). Compendio de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Xochicoatlán, Hidalgo. [https://www.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos\\_geograficos/13/13079.pdf](https://www.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos_geograficos/13/13079.pdf)
- ↑ INEGI. (2023). Día mundial para la prevención del suicidio. Datos naciones. [https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2023/EAP\\_Suicidio23.pdf](https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2023/EAP_Suicidio23.pdf)
- ↑ Instituto de Salud Pública de Chile. Ministerio de Salud. (2023, March 8). Plantas y Hongos con Actividad Psicoactiva. *Psilocybe cubensis*. Instituto de Salud Pública de Chile. Ministerio de Salud. <https://www.ispch.cl/wp-content/uploads/2023/03/Psilocybe-cubensis-22022023A.pdf>
- ↑ Koike, Y., Wada, K., Kusano, G., Nozoe, S., & Yokoyama, K. (1981). Isolation of Psilocybin From *Psilocybe argentipes* and Its Determination in Specimens of Some Mushrooms. *Journal of Natural Products*, 44(3), 362–365. <https://doi.org/10.1021/np50015a023>
- ↑ Largent, D., Johnson, D., & Watling, R. (1977). How to Identify Mushrooms to Genus III: Microscopic Features. Mad River Press. <https://doi.org/0916422097>

- † Lenz, C., Wick, J., & Hoffmeister, D. (2017). Identification of  $\omega$ -N-Methyl-4-hydroxytryptamine (Norpsilocin) as a *Psilocybe* Natural Product. *Journal of Natural Products*, 80(10), 2835–2838. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00407>
- † Leung, A. Y., & Paul, A. G. (1968). Baeocystin and Norbaeocystin: New Analogs of Psilocybin from *Psilocybe baeocystis*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 57(10), 1667–1671. <https://doi.org/10.1002/jps.2600571007>
- † Mayorga-Saucedo, R., Luna-Vega, I., & Alcántara-Ayala, O. (1998). Florística del bosque mesófilo de montaña de Molocotlán, Molango-Xochicoatlán, Hidalgo, México. *Botanical Sciences*, 63, 101–119. <https://doi.org/10.17129/botsci.1571>
- † McKenna, T. (1992). *El manjar de los dioses. La búsqueda del árbol de la ciencia del bien y del mal. Una historia de las plantas, las drogas y la evolución humana.* (Titivillus). Ediciones Paidós Ibérica, S.A.
- † Mestre, J. M., & Palmero, F. (2004). *Procesos psicológicos básicos. Una guía académica para los estudios en Psicopedagogía, Psicología y Pedagogía.* McGraw-Hill.
- † Moreno, G., Manjón, J. y Álvarez, J. Sin fecha. Los hongos y el cambio climático. 129-135. [http://www.socmicolmadrid.org/docs/cap6-loshongosyelcambioclimatico\\_tcm7-403982.pdf](http://www.socmicolmadrid.org/docs/cap6-loshongosyelcambioclimatico_tcm7-403982.pdf).
- † OMS. (2023, March 31). *Depresión.* Organización Mundial de La Salud. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/depression>
- † Palma Ramírez, G., Pérez Sánchez, D. L., Hernández Hernández, M., & Rodríguez Ramírez, R. (2020). Revisión histórica de los hongos psilocibios. *Educación y Salud Boletín Científico Instituto de Ciencias de La Salud Universidad Autónoma Del Estado de Hidalgo*, 8(16), 174–186. <https://doi.org/10.29057/icsa.v8i16.4790>
- † Pérez-Rincón, H. (2008). Encuentros franco-mexicanos en torno a los psicodislépticos. Un capítulo un poco olvidado de las relaciones científicas entre los dos países. In Sergio Javier Villaseñor Bayardo (Ed.), *Psiquiatría, naturaleza y cultura. De lo singular a lo universal* (pp. 409–412). Grupo Latino Americano de Estudios Transculturales, A.C.
- † Porsolt, R. D., Bertin, A., & Jalfre, M. (1977). Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie*, 229(2), 327–336.

- † Prut, L., & Belzung, C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology*, 463(1–3), 3–33. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(03\)01272-X](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01272-X)
- † Puebla, D. K. (2020). Salud mental y adicciones después de la pandemia por COVID-19. *Gaceta Facultad de Medicina*, 8(199), 4. [http://www.facmed.unam.mx/\\_gaceta/gaceta/ago032k20/g\\_ago032k20.pdf#page=4](http://www.facmed.unam.mx/_gaceta/gaceta/ago032k20/g_ago032k20.pdf#page=4)
- † Ramos, D., Montoya, L., Bandala, V., & Ramos, A. (2022, May 18). Hongos: materia prima para la medicina. Instituto de Ecología, A.C. <https://www.inecol.mx/inecol/index.php/es/ct-menu-item-25/ct-menu-item-27/17-ciencia-hoy/1706-hongos-materia-prima-para-la-medicina>
- † Roslund, M. U., Tähtinen, P., Niemitz, M., & Sjöholm, R. (2008). Complete assignments of the <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C chemical shifts and J<sub>H,H</sub> coupling constants in NMR spectra of d-glucopyranose and all d-glucopyranosyl-d-glucopyranosides. *Carbohydrate Research*, 343(1), 101–112. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2007.10.008>
- † Sahagún, F. B. de. (1530). *Historia General De Las Cosas De La Nueva España*. (3rd ed.). Editorial Porrúa México. [http://cdigital.dgb.uanl.mx/la/1080012524\\_C/1080012524\\_T1/1080012524\\_MA.PDF](http://cdigital.dgb.uanl.mx/la/1080012524_C/1080012524_T1/1080012524_MA.PDF)
- † Samorini, G. (2001). Funghi allucinogeni. *Studi etnomicologici*. Telesterion.
- † Seo, H. W., Hung, T. M., Na, M., Jung, H. J., Kim, J. C., Choi, J. S., Kim, J. H., Lee, H.-K., Lee, I., Bae, K., Hattori, M., & Min, B. S. (2009). Steroids and triterpenes from the fruit bodies of *Ganoderma lucidum* and their anti-complement activity. *Archives of Pharmacal Research*, 32(11), 1573–1579. <https://doi.org/10.1007/s12272-009-2109-x>
- † Serrano, D. (2009). Psilocybin: Historical and pharmacological perspective and current authorized research. *Cultura y Droga*, 14(16), 165–188.
- † Shirota, O., Hakamata, W., & Goda, Y. (2003). Concise Large-Scale Synthesis of Psilocin and Psilocybin, Principal Hallucinogenic Constituents of “Magic Mushroom.” *Journal of Natural Products*, 66(6), 885–887. <https://doi.org/10.1021/np030059u>
- † Stamets, P. (1996). *Psilocybin Mushrooms of the World. An identification guide*. Ten Speed Press.

- † Suárez Rodríguez, R., Raya Pérez, J. C., & Iturriaga de la Fuente, G. (2015). La trehalosa: un azúcar osmoprotector con capacidad de señalización. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria de México*, 3(1).
- † Talapatra, S. K., & Talapatra, B. (2015). *Chemistry of Plant Natural Products*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-45410-3>
- † Teixidó, A. (2018). Nuevos enfoques en el tratamiento de la depresión mayor resistente: Propuesta de estudio piloto de tratamiento con psilocibina. [Trabajo de final de Grado en Medicina]. Universidad Autónoma de Barcelona.
- † Valdés-Sustaita, B., López-Rubalcava, C., González-Trujano, M., García-Viguera, C., & Estrada-Camarena, E. (2017). Aqueous Extract of Pomegranate Alone or in Combination with Citalopram Produces Antidepressant-Like Effects in an Animal Model of Menopause: Participation of Estrogen Receptors. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(12), 2643. <https://doi.org/10.3390/ijms18122643>
- † Vopson, M. M. (2022). Experimental protocol for testing the mass–energy–information equivalence principle. *AIP Advances*, 12(3). <https://doi.org/10.1063/5.0087175>



## 10. ÁREAS DE OPORTUNIDAD

---

- † Analizar químicamente el sustrato silvestre y controlado donde crece el hongo.
- † Llevar a cabo una extracción por reflujo con MeOH y con CH<sub>3</sub>COOH al 5% en el hongo silvestre como parte del proceso para reforzar la reproducibilidad de los experimentos.
- † Realizar la extracción con MeOH por reflujo con el hongo silvestre para la obtención de cristales de  $\alpha,\alpha$ -trehalosa.
- † Purificar por CC con sílice C18 el extracto del hongo de cultivo para lograr el aislamiento de la psilocibina y obtener sus datos espectroscópicos completos.
- † Repetir el experimento con mayor cantidad de material fúngico silvestre para poder determinar más datos espectroscópicos, como el punto de fusión, la rotación óptica, espectros de IR, entre otros, además de la repetición del análisis por RMN a temperatura constante.



## 11. INFORMACIÓN DE SOPORTE

---

### 11.1 Resonancia Magnética Nuclear

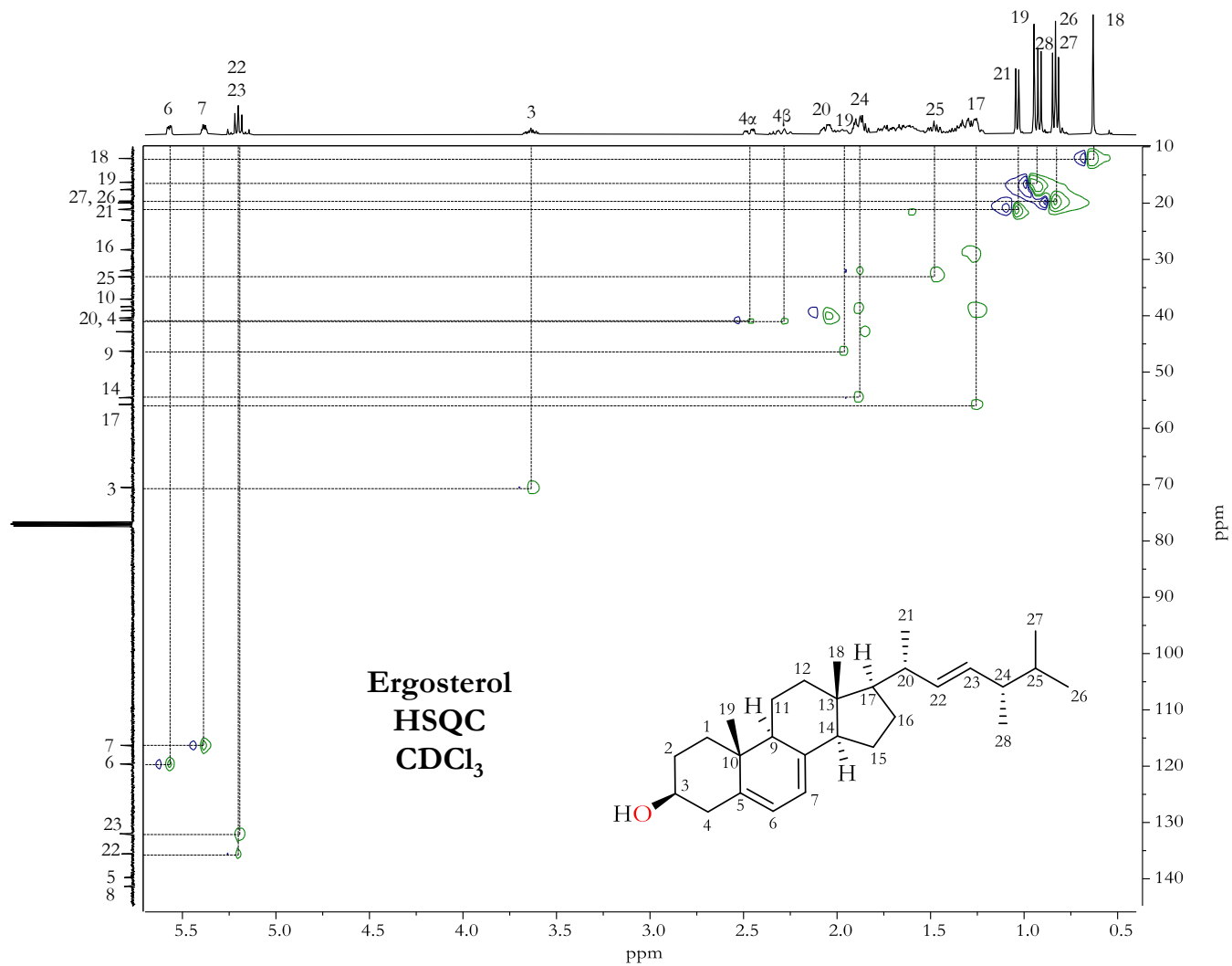


Figura 64. Espectro HSQC del ergosterol aislado del hongo de cultivo.

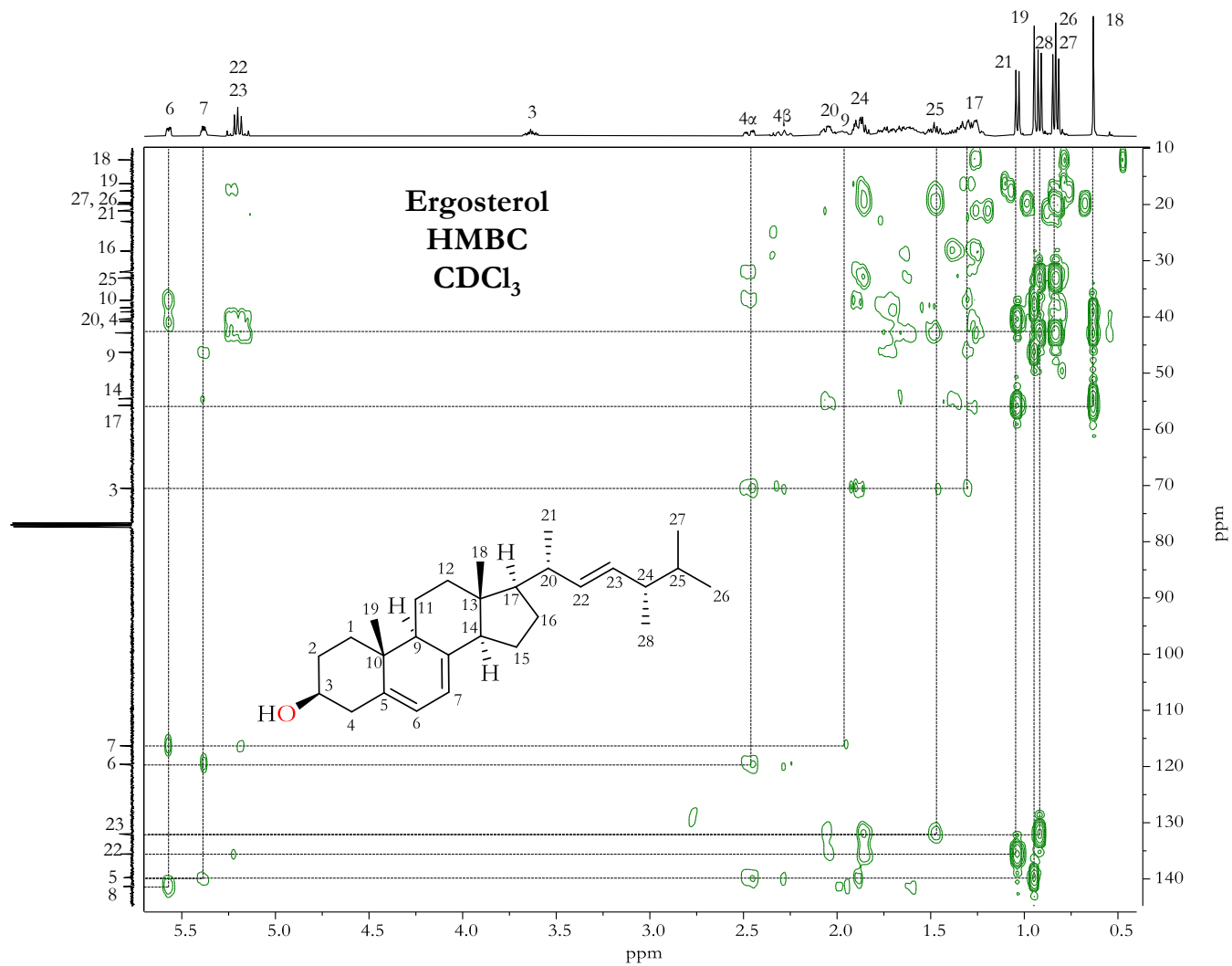


Figura 65. Espectro HMBC del ergosterol aislado del hongo de cultivo.

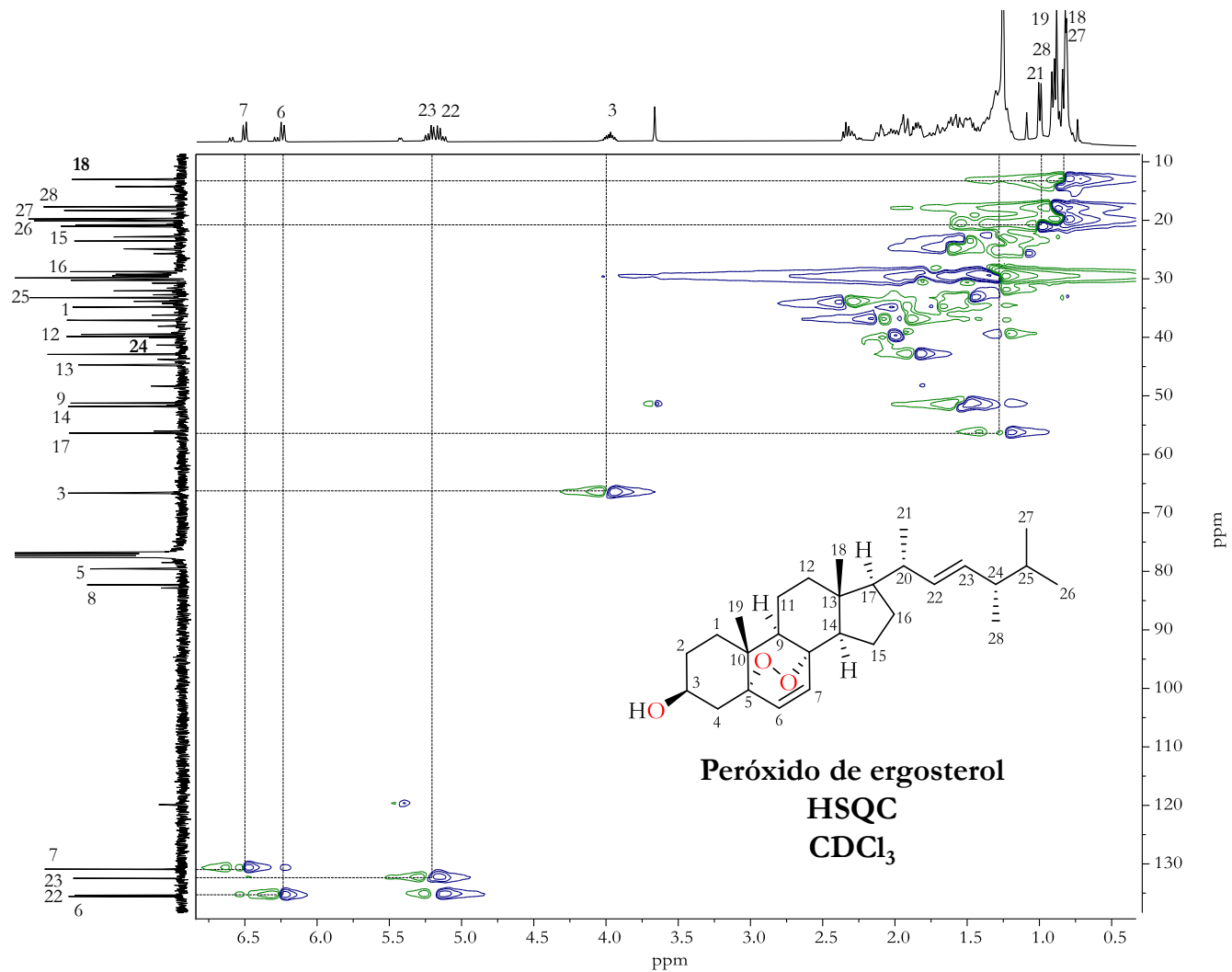


Figura 66. Espectro HSQC del peróxido de ergosterol identificado del hongo silvestre.

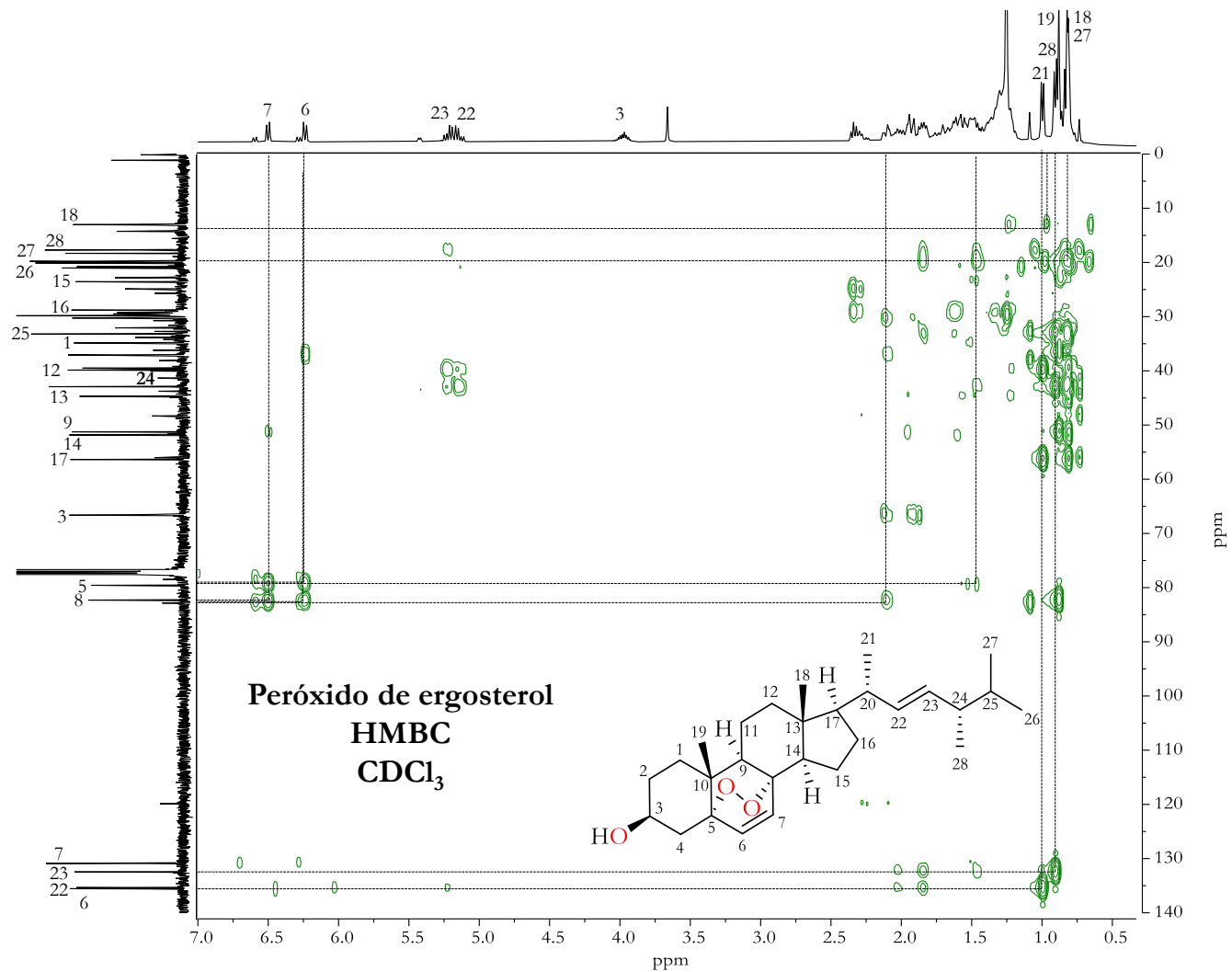
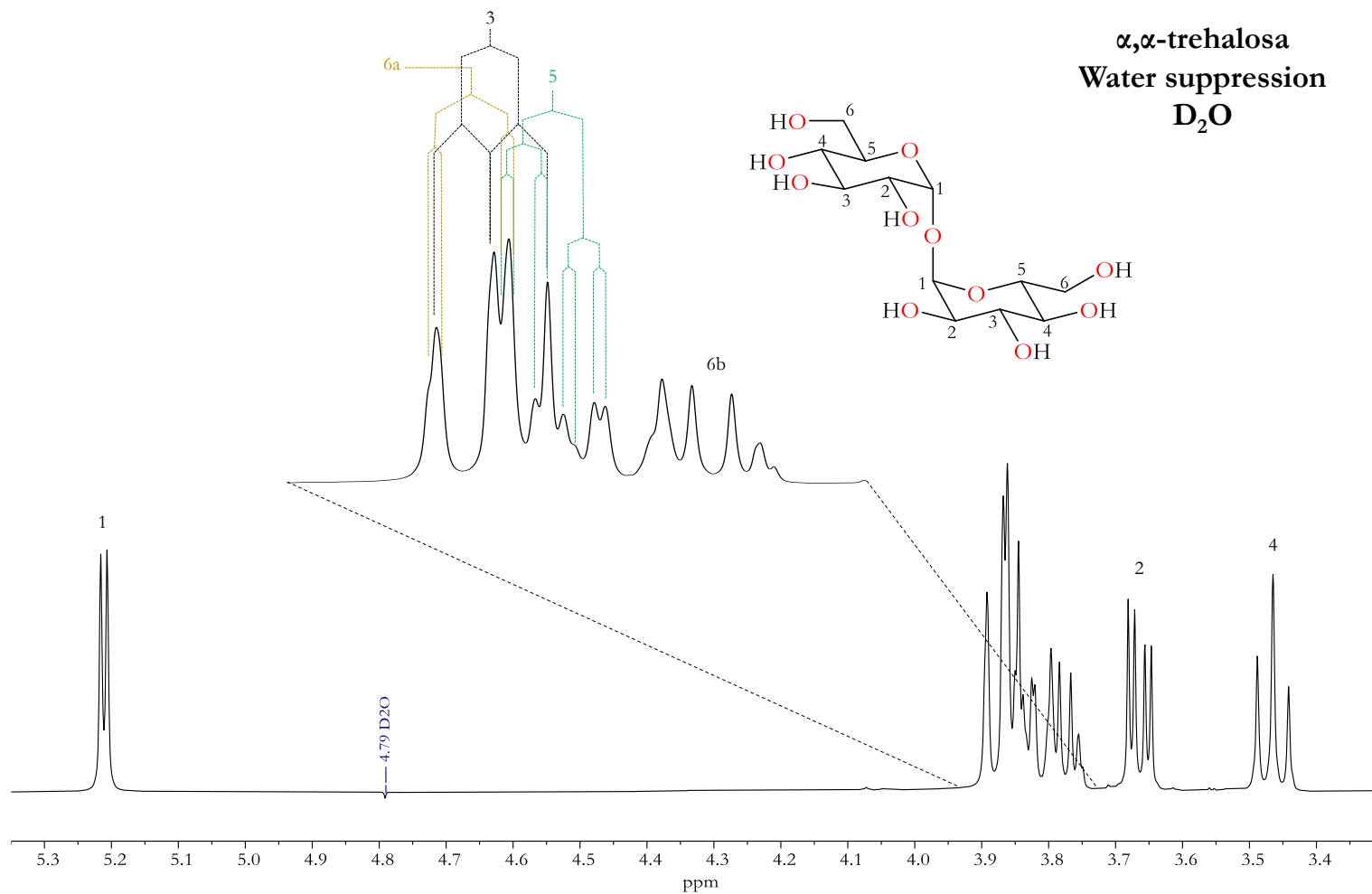


Figura 67. Espectro HMBC del peróxido de ergosterol identificado del hongo silvestre.



**Figura 68.** Espectro de RMN de  $^1H$  (400 MHz) con experimento Water suppression de la  $\alpha,\alpha$ -trehalosa aislada del hongo de cultivo.



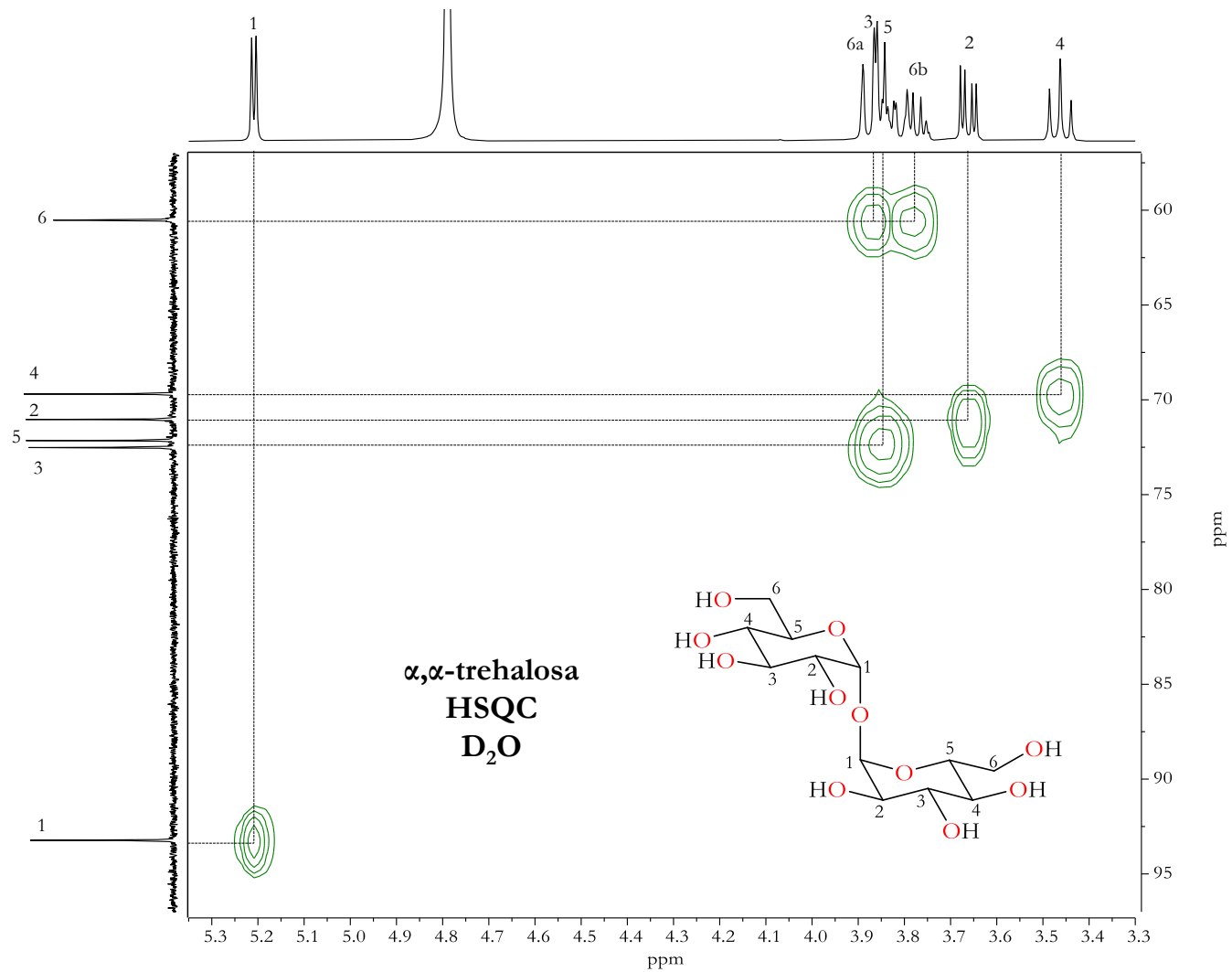


Figura 69. Espectro HSQC del  $\alpha,\alpha$ -trehalosa aislada del hongo de cultivo.

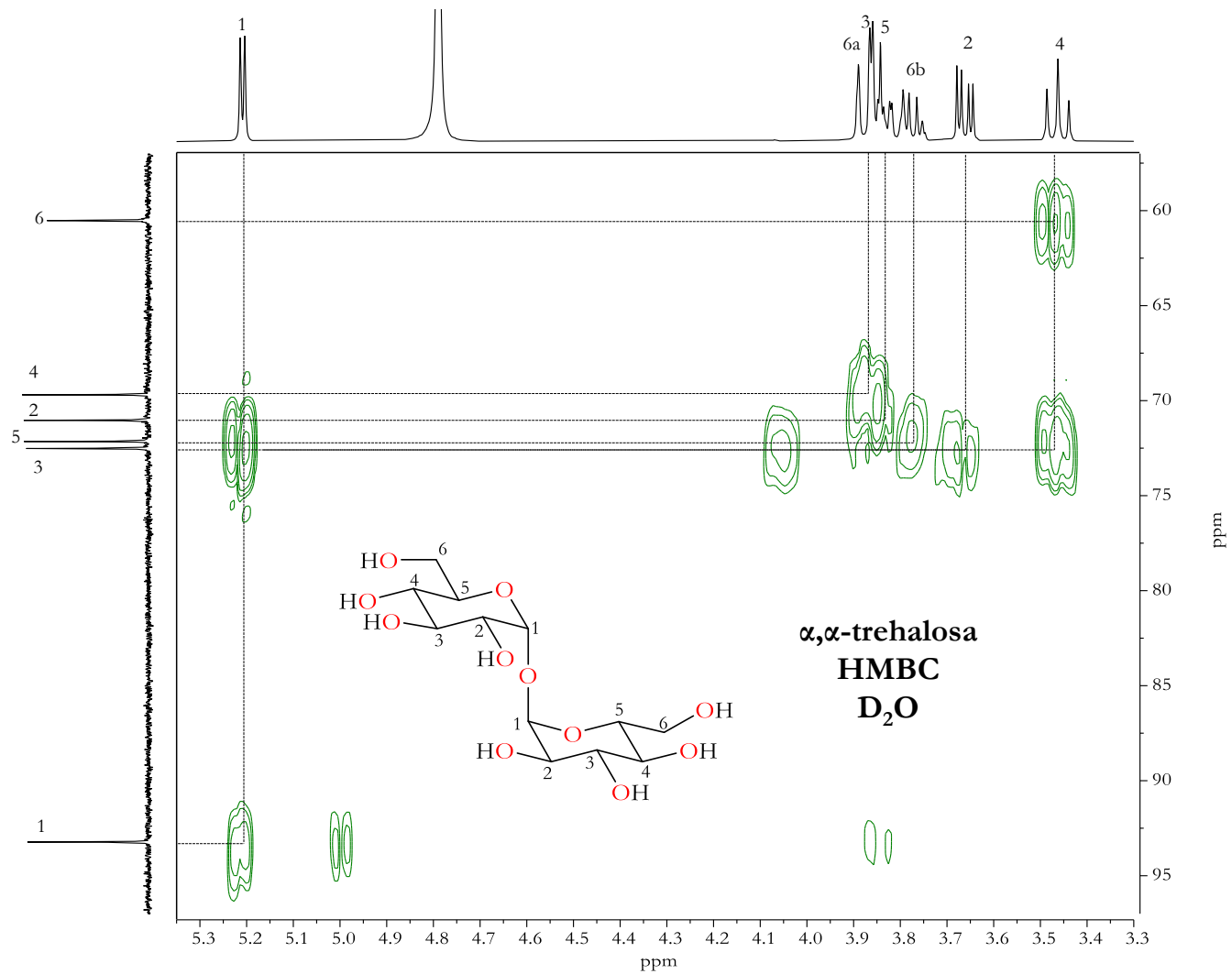
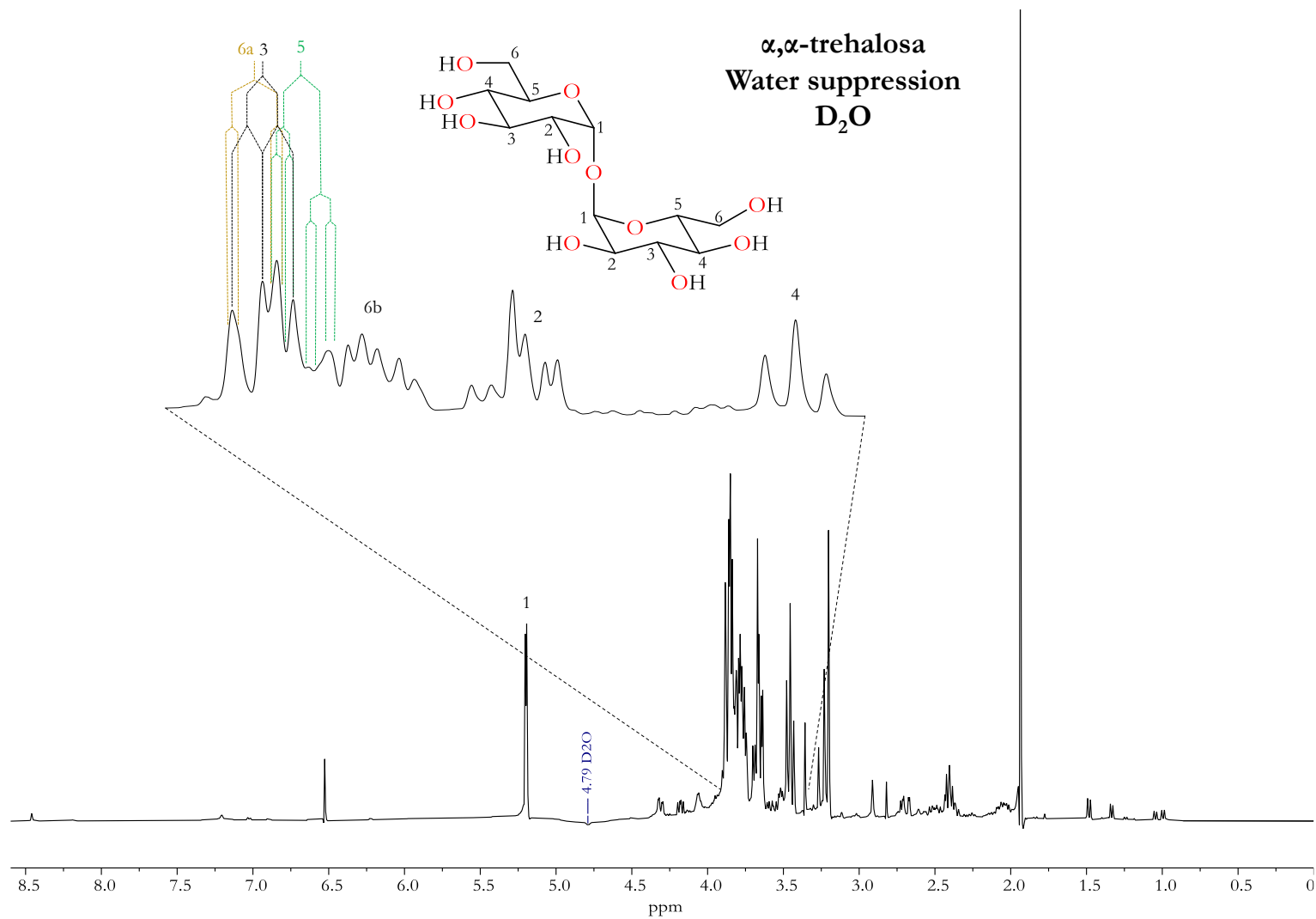


Figura 70. Espectro HMBC del  $\alpha,\alpha$ -trehalosa aislada del hongo de cultivo.



**Figura 71.** Espectro de RMN de  $^1H$  (400 MHz) con experimento Water suppression de la  $\alpha,\alpha$ -trehalosa identificada del hongo silvestre.

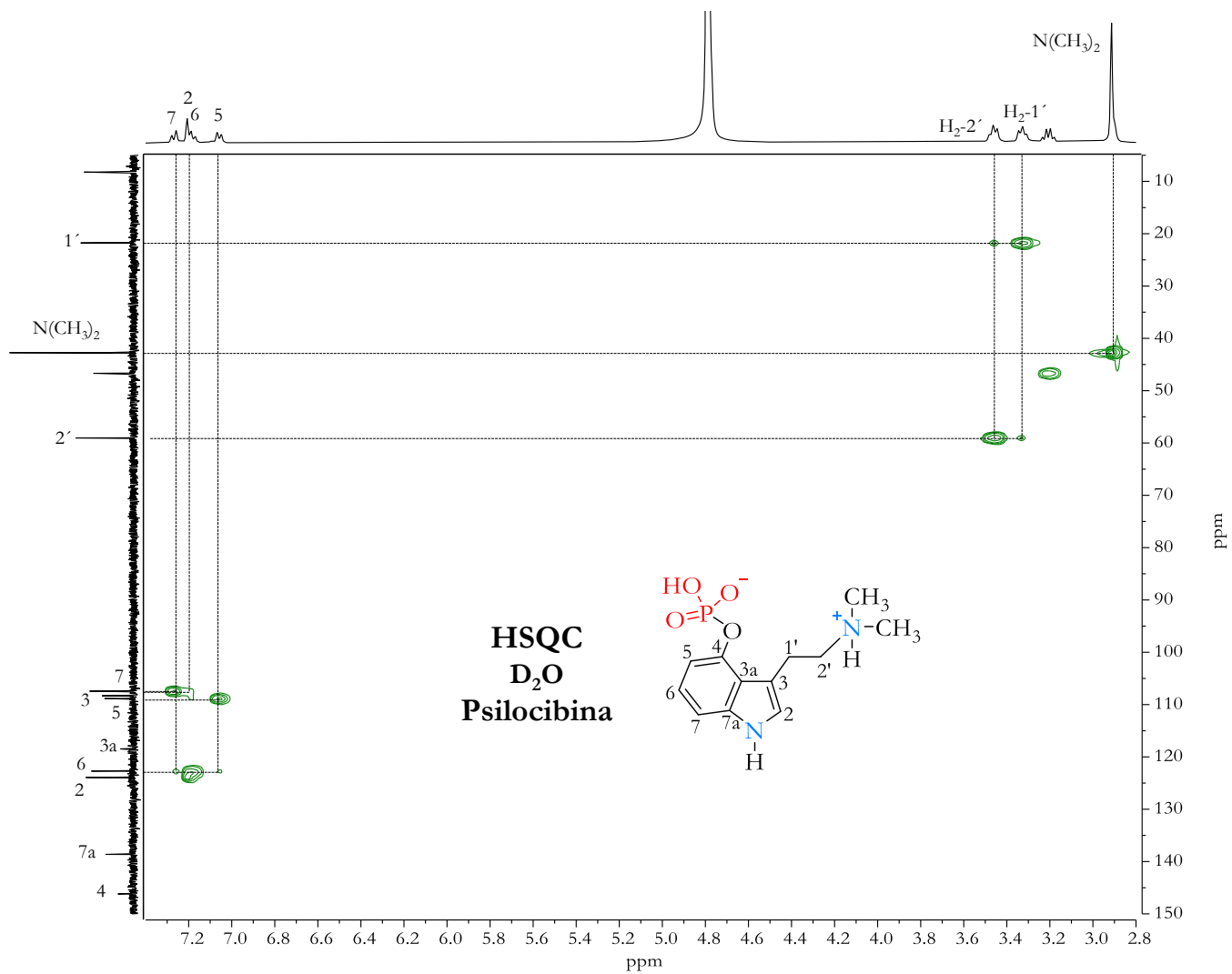


Figura 72. Espectro HSQC de la psilocibina aislada del hongo silvestre.

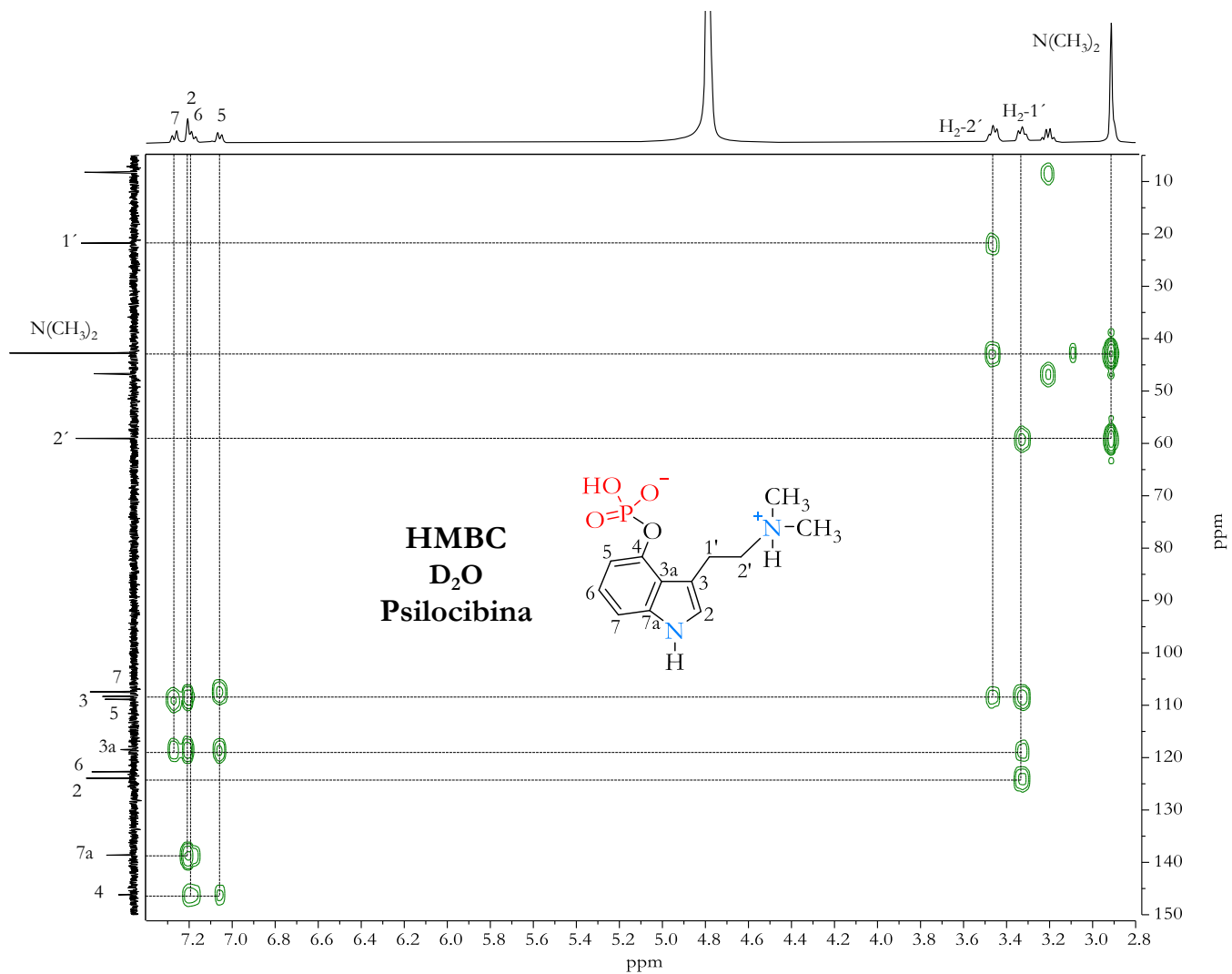
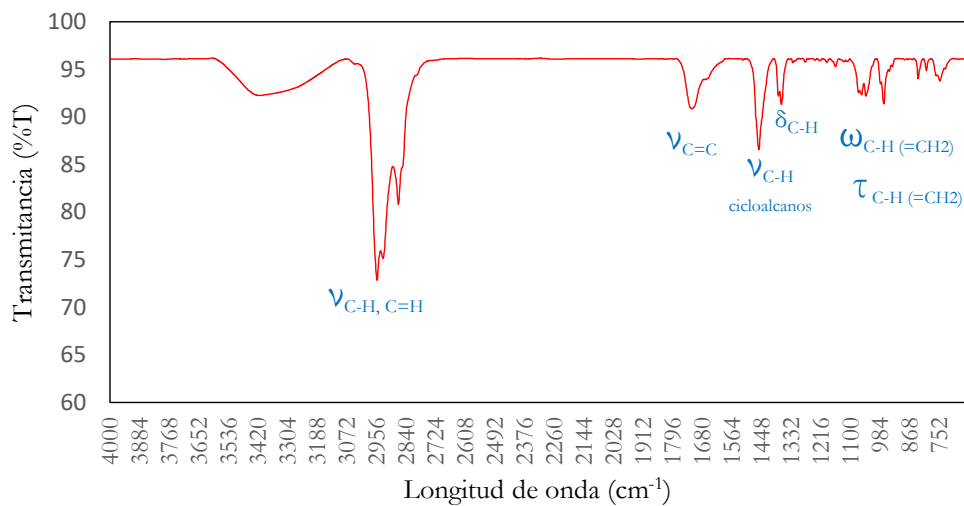


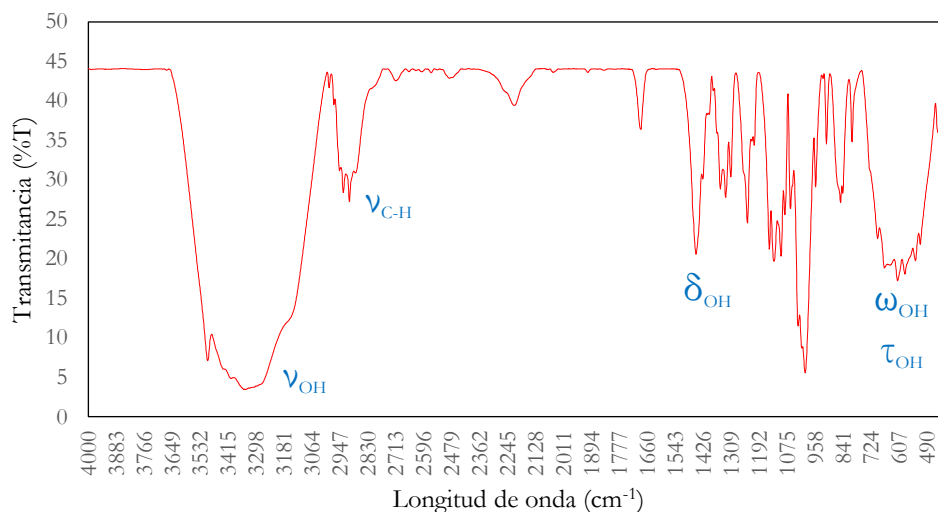
Figura 73. Espectro HMBC de la psilocibina aislada del hongo silvestre.

## 11.2 Espectroscopía de infrarrojo (IR)

Espectros de IR de los compuestos aislados del hongo de cultivo: el ergosterol y la  $\alpha,\alpha$ -trehalosa.



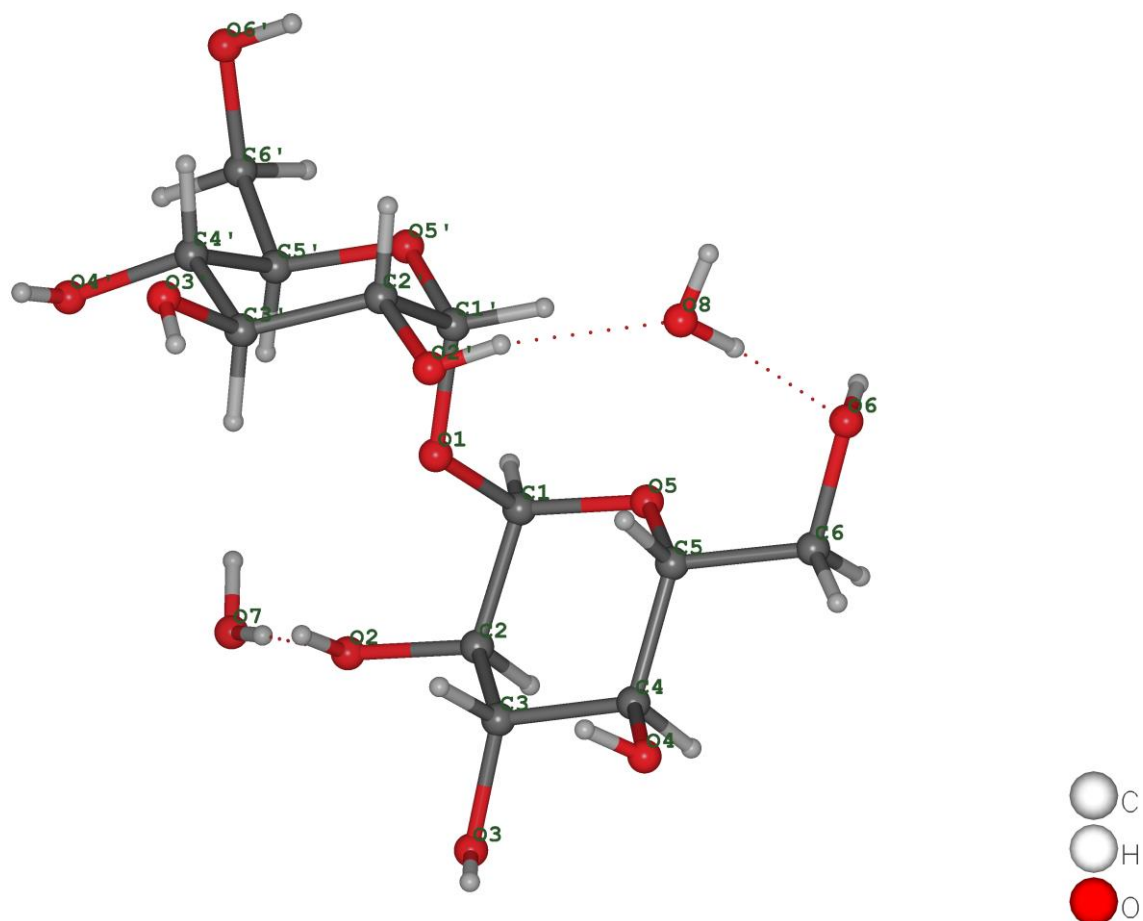
**Figura 74.** Espectro IR del ergosterol aislado del hongo de cultivo.



**Figura 75.** Espectro IR del  $\alpha,\alpha$ -trehalosa aislada del hongo de cultivo.

### 11.3 Difracción de Rayos-X

Análisis de los cristales formados en el extracto con MeOH grado HPLC por reflujo del hongo de cultivo:



**Figura 76.** Estructura de rayos-X del  $\alpha,\alpha$ -trehalosa aislada del hongo de cultivo.

**Tabla 8.** Datos cristalográficos de la estructura de rayos-X del  $\alpha,\alpha$ -trehalosa aislada del hongo de cultivo.

Formula empírica	$C_{12}H_{26}O_{13}$
Peso de la fórmula	378.33
Temperatura/K	293(2)
Sistema cristalino	Ortorrómbico
Grupo espacial	$P2_12_12_1$
a/Å	7.5847(2)
b/Å	12.2168(3)
c/Å	17.8625(4)
$\alpha/^\circ$	90
$\beta/^\circ$	90
$\gamma/^\circ$	90
Volumen/Å <sup>3</sup>	1655.15(7)
Z	4
Densidad (calculada) g/cm <sup>3</sup>	1.518
Coefficiente de absorción $\mu/\text{mm}^{-1}$	0.139
F(000)	808
Radiación	Mo K $\alpha$ ( $\lambda = 0.71073$ )
Intervalo de $\Theta$ para los datos recolectados ( $^\circ$ )	6.322 to 54.18
Intervalos de índice	$-9 \leq h \leq 9, -15 \leq k \leq 15, -22 \leq l \leq 22$
Reflecciones colectadas	56580
Reflexiones independientes	3644 [ $R_{\text{int}} = 0.0720, R_{\text{sigma}} = 0.0193$ ]
Datos/Restricciones/Parámetros	3644/0/274
Bondad de ajuste en $F^2$	1.064
Índice final de R [ $I \geq 2\sigma(I)$ ]	$R_1 = 0.0292, wR_2 = 0.0779$
Índice final de R [para todos los datos]	$R_1 = 0.0307, wR_2 = 0.0798$
Máxima diferencia de densidad electrónica Å <sup>-3</sup>	0.21/-0.15
Parámetro de Flack	-0.6(3)



### Longitudes de enlace

Átomo	Átomo	Longitud (Å)
O1	C1	1.418(2)
O1	C1'	1.413(2)
O2	C2	1.419(2)
O2'	C2'	1.421(2)
O3	C3	1.426(2)
O3'	C3'	1.421(2)
O4	C4	1.430(2)
O4'	C4'	1.420(2)
O5	C1	1.402(2)
O5	C5	1.433(2)
O5'	C1'	1.419(2)
O5'	C5'	1.435(2)
O6	C6	1.418(2)
O6'	C6'	1.418(2)
C1	C2	1.529(3)
C1'	C2'	1.517(3)
C2	C3	1.517(2)
C2'	C3'	1.522(3)
C3	C4	1.516(2)
C3'	C4'	1.523(3)
C4	C5	1.524(2)
C4'	C5'	1.526(2)
C5	C6	1.510(3)
C5'	C6'	1.519(3)

### Ángulos de enlace

Átomo	Átomo	Átomo	Ángulo (°)
C1'	O1	C1	115.91(14)
C1	O5	C5	114.09(13)
C1'	O5'	C5'	113.95(13)
O1	C1	C2	105.92(14)
O5	C1	O1	111.86(15)
O5	C1	C2	111.19(14)
O1	C1'	O5'	112.06(15)
O1	C1'	C2'	106.54(14)
O5'	C1'	C2'	109.92(14)
O2	C2	C1	110.98(15)
O2	C2	C3	111.26(15)
C3	C2	C1	109.89(14)
O2'	C2'	C1'	111.54(15)
O2'	C2'	C3'	109.73(16)
C1'	C2'	C3'	108.47(15)
O3	C3	C2	109.02(15)
O3	C3	C4	110.56(15)
C4	C3	C2	111.21(15)
O3'	C3'	C2'	112.49(16)
O3'	C3'	C4'	106.56(15)
C2'	C3'	C4'	108.89(15)
O4	C4	C3	109.57(14)
O4	C4	C5	109.46(15)
C3	C4	C5	111.71(14)
O4'	C4'	C3'	111.54(15)
O4'	C4'	C5'	105.48(15)
C3'	C4'	C5'	112.87(15)
O5	C5	C4	111.37(15)
O5	C5	C6	106.55(15)

<b>C6</b>	C5	C4	111.44(15)
<b>O5'</b>	C5'	C4'	111.54(14)
<b>O5'</b>	C5'	C6'	106.77(14)
<b>C6'</b>	C5'	C4'	112.17(15)
<b>O6</b>	C6	C5	112.06(16)
<b>O6'</b>	C6'	C5'	113.39(16)

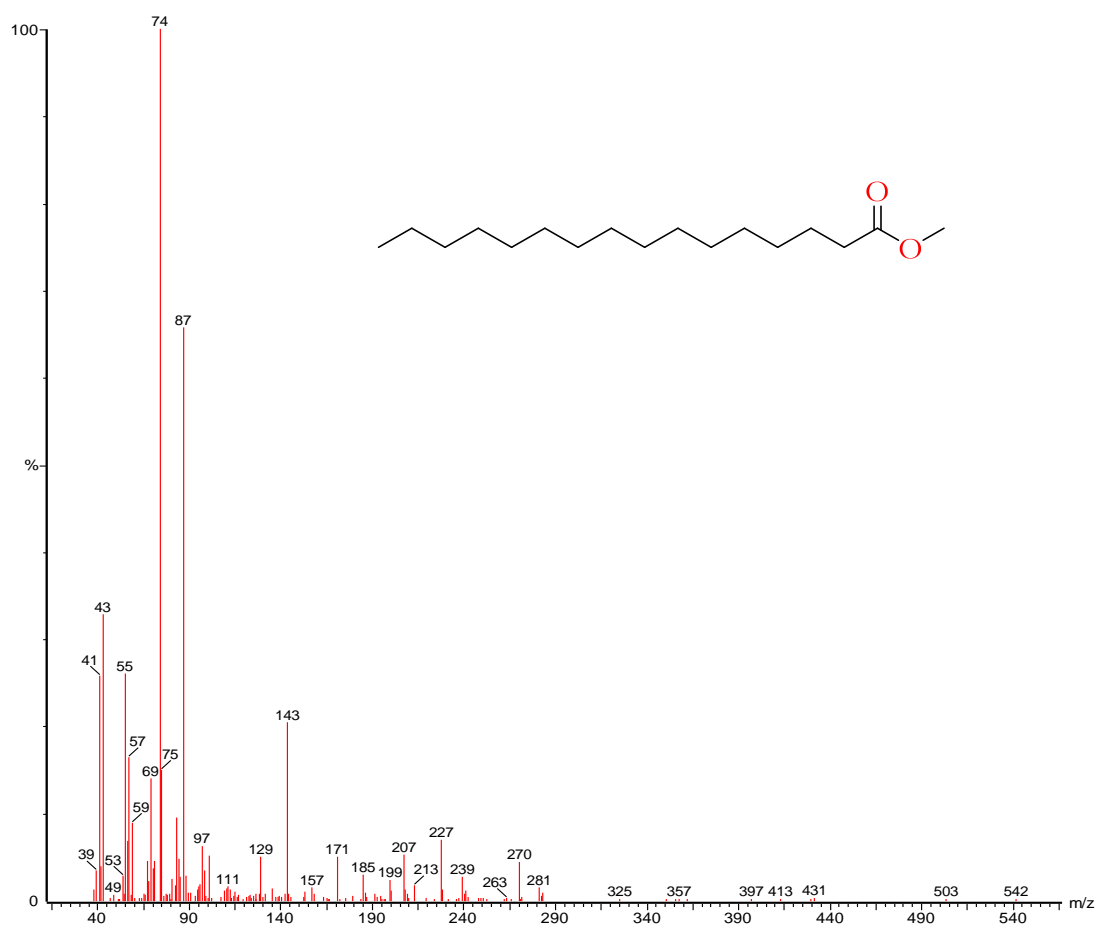
### Ángulos de torsión

<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>Ángulo (°)</b>
O1	C1	C2	O2	58.12(18)
O1	C1	C2	C3	-65.36(18)
O1	C1'	C2'	O2'	61.96(18)
O1	C1'	C2'	C3'	-59.01(18)
O2	C2	C3	O3	62.8(2)
O2	C2	C3	C4	-175.05(15)
O2'	C2'	C3'	O3'	62.83(19)
O2'	C2'	C3'	C4'	-179.28(14)
O3	C3	C4	O4	-67.4(2)
O3	C3	C4	C5	171.09(16)
O3'	C3'	C4'	O4'	-68.66(19)
O3'	C3'	C4'	C5'	172.79(15)
O4	C4	C5	O5	-172.46(14)
O4	C4	C5	C6	68.7(2)
O4'	C4'	C5'	O5'	-170.47(14)
O4'	C4'	C5'	C6'	69.82(18)
O5	C1	C2	O2	179.84(14)
O5	C1	C2	C3	56.37(18)
O5	C5	C6	O6	69.8(2)
O5'	C1'	C2'	O2'	-176.43(15)

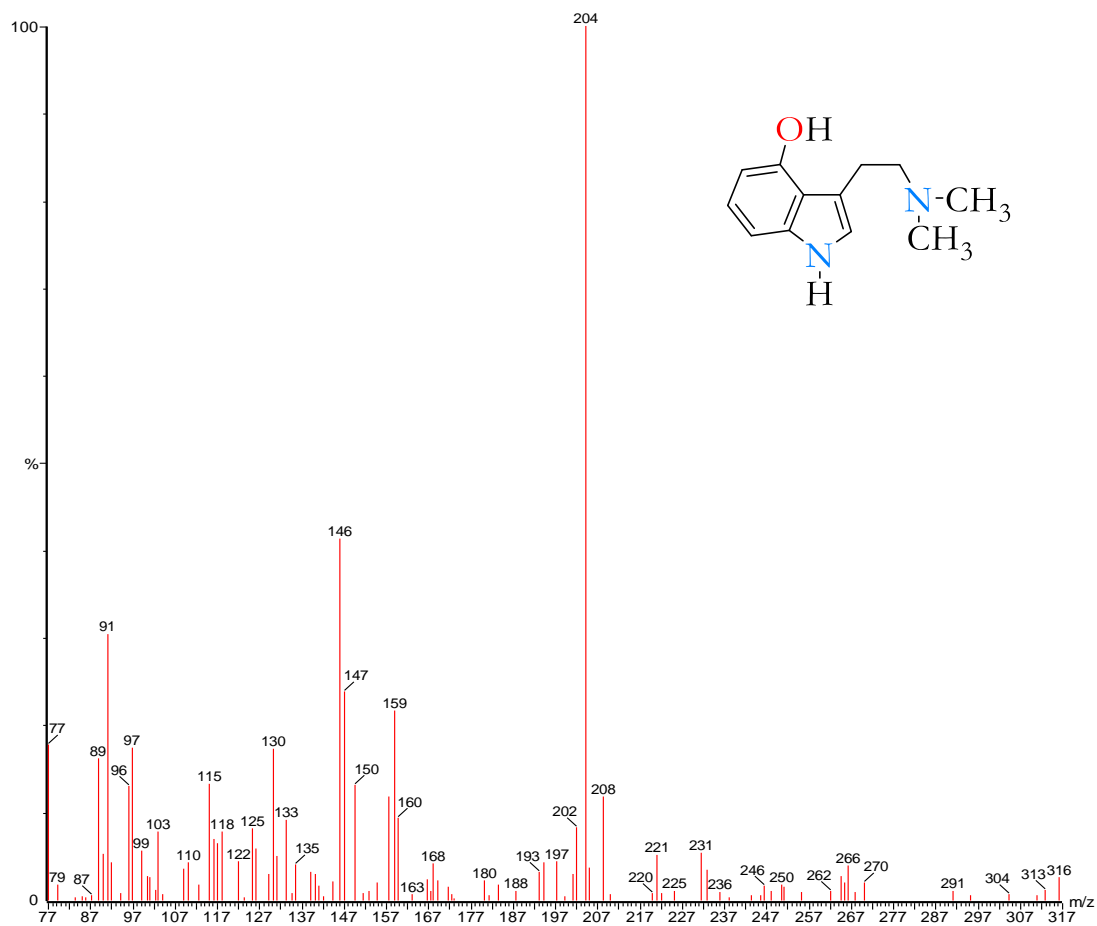
O5'	C1'	C2'	C3'	62.61(18)
O5'	C5'	C6'	O6'	-75.57(19)
C1	O1	C1'	O5'	74.56(18)
C1	O1	C1'	C2'	-165.19(14)
C1	O5	C5	C4	57.04(19)
C1	O5	C5	C6	178.76(15)
C1	C2	C3	O3	-173.89(15)
C1	C2	C3	C4	-51.74(19)
C1'	O1	C1	O5	61.68(19)
C1'	O1	C1	C2	-177.02(14)
C1'	O5'	C5'	C4'	53.76(19)
C1'	O5'	C5'	C6'	176.62(15)
C1'	C2'	C3'	O3'	-175.10(15)
C1'	C2'	C3'	C4'	-57.21(18)
C2	C3	C4	O4	171.32(15)
C2	C3	C4	C5	49.8(2)
C2'	C3'	C4'	O4'	169.77(15)
C2'	C3'	C4'	C5'	51.22(19)
C3	C4	C5	O5	-50.9(2)
C3	C4	C5	C6	-169.75(16)
C3'	C4'	C5'	O5'	-48.44(19)
C3'	C4'	C5'	C6'	-168.16(15)
C4	C5	C6	O6	-168.53(16)
C4'	C5'	C6'	O6'	46.9(2)
C5	O5	C1	O1	58.18(19)
C5	O5	C1	C2	-60.02(19)
C5'	O5'	C1'	O1	56.64(19)
C5'	O5'	C1'	C2'	-61.62(19)

## 11.4 Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GS-MS)

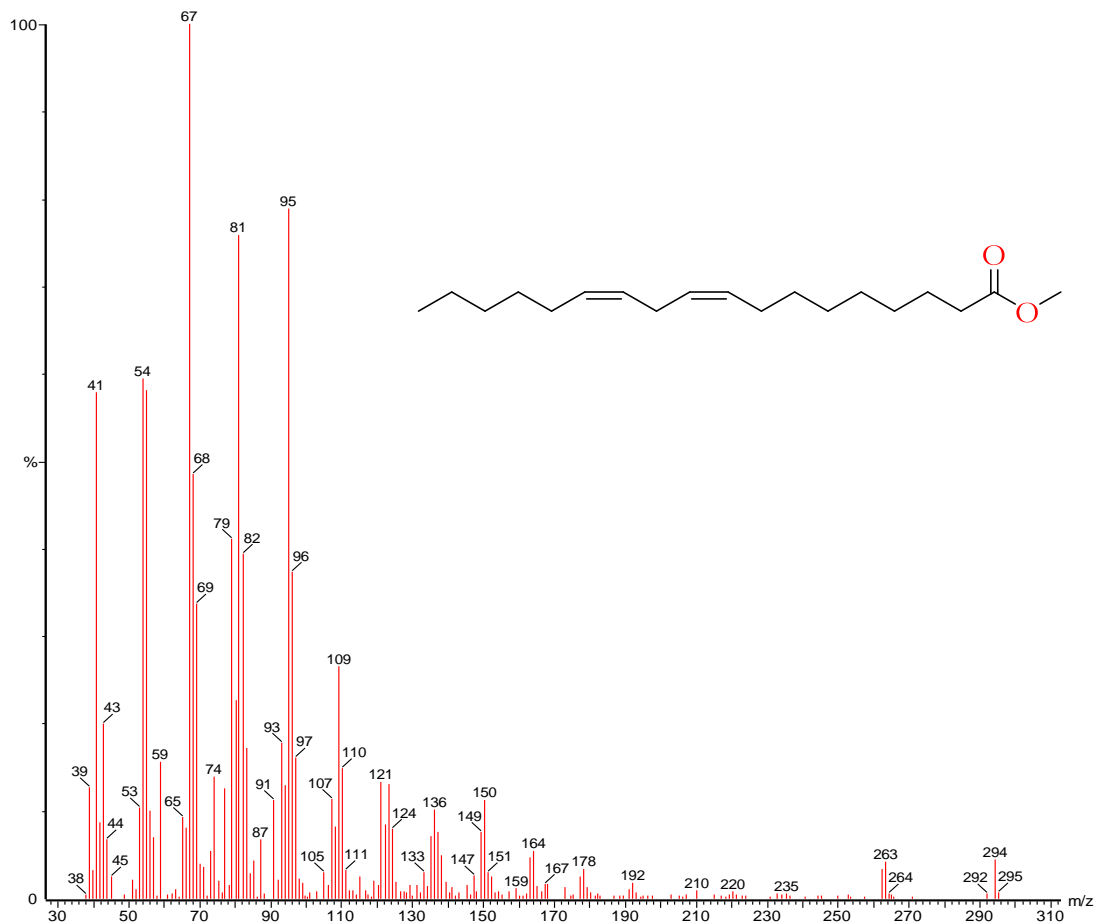
Espectrometría de masas del extracto hexánico por reflujo secuencial del hongo de cultivo.



**Figura 77.** Éster metílico del ácido palmítico o éster metílico del ácido hexadecanoico ( $C_{17}H_{34}O_2$ ), PM = 270 g/mol.



**Figura 78.** Psilocina o 4-hidroxi-*N,N*-dimetil-triptamina ( $C_{12}H_{16}N_2O$ ), PM = 204 g/mol.



**Figura 79.** Éster metílico del ácido linoleico o éster metílico del ácido (9Z,12Z)-9,12-octadecadienoico ( $C_{19}H_{34}O_2$ ), PM = 294 g/mol.

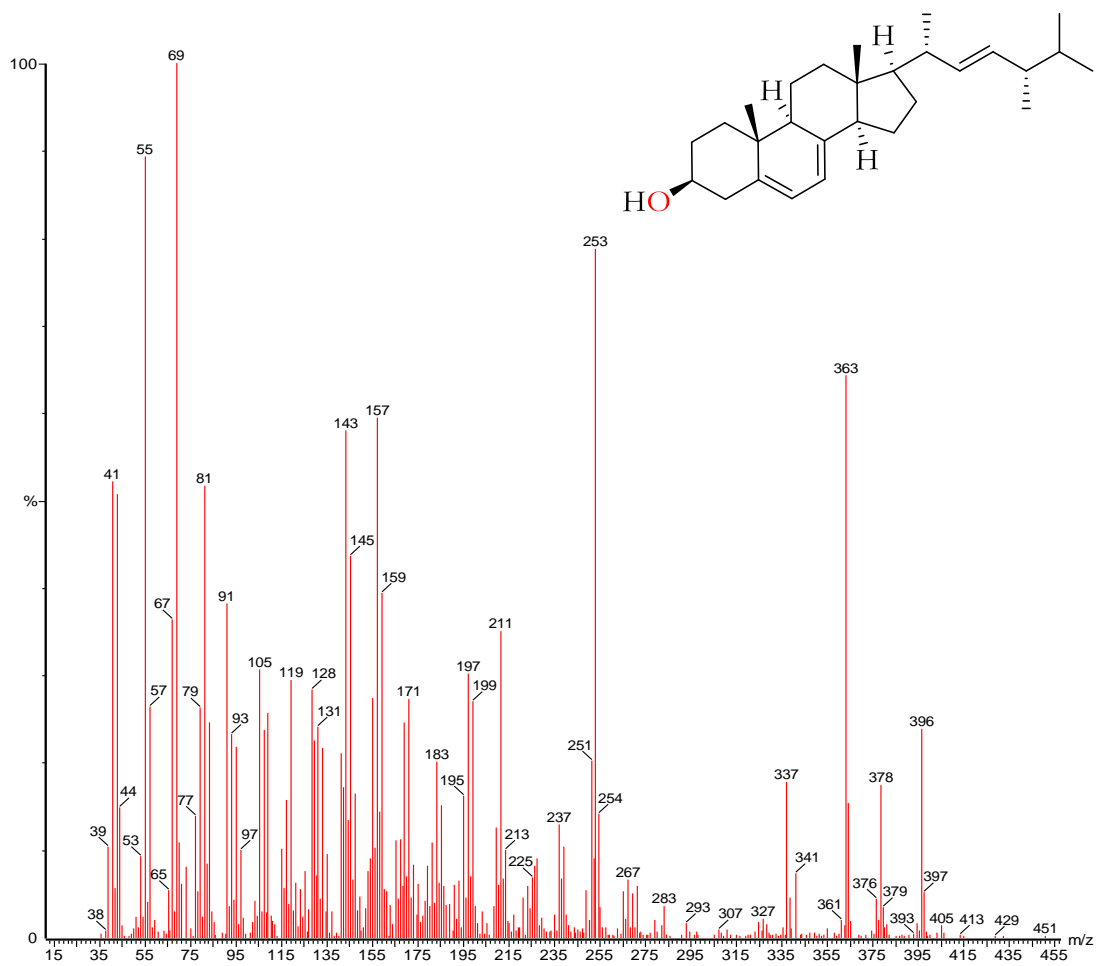


Figura 80. Ergosterol ( $C_{28}H_{44}O$ ), PM = 396 g/mol.