

Faculdade de Ciências Agronômicas

UNESP – Câmpus de Botucatu

Extração, síntese, purificação, caracterização e interação droga-receptor in silico de Psilocina e Psilocibina: **Desenvolvimento de metodologia para produção de cogumelos *Psilocybe cubensis* com elevados teores de Psilocibina e Psilocina para estudos medicinais.**

Responsável: Dr. Robinson Luiz de Campos Machado Pitelli

Supervisor: Prof. Dr. Edivaldo Domingues Velini

Botucatu - SP
Janeiro de 2025

Avaliação do Supervisor

O pesquisador desenvolveu os protocolos de multiplicação e produção de biomassa de *Psilocybe cubensis*, fundamental para a extração dos compostos psilocibina e psilocina como originalmente proposto no projeto. Todas as atividades foram desenvolvidas com extrema dedicação e competência. O pesquisador interagiu com vários grupos de pesquisa no Brasil e no exterior para conseguir desenvolver as técnicas pretendidas. Ao final, foi capaz de criar protocolos para isolamento, identificação e multiplicação de *Psilocybe cubensis* altamente eficientes. Como grande estudioso e conhecedor da biologia de fungos, teve um papel muito importante no grupo de pesquisa instruindo os demais pesquisadores sobre as diferentes estruturas, tecidos e particularidades reprodutivas desses organismos. O relatório está bem redigido e demonstra a correção dos métodos utilizados e a relevância dos resultados obtidos devendo, em nossa avaliação, ser aprovado.

Programa de Pós-doutorado em Agricultura – FCA/UNESP

Atividades na produção de micélio e cogumelos dos fungos *Psilocybe cubensis*

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos históricos

Ao longo dos anos, metabólitos secundários de plantas, fungos e bactérias têm constituído um grupo de moléculas particularmente valioso para o desenvolvimento direto de drogas e produtos biotecnológicos. Em muitos casos, estas moléculas serviram também como protótipos e compostos líderes para o *design* de agentes terapêuticos por meio de métodos de modificação e síntese química, que proporcionaram a obtenção de drogas com potência e estabilidade superiores, além de outras propriedades desejadas para agentes farmacológicos.

Uma utilização menos comum para estes tipos de metabólitos está relacionada ao tratamento de doenças do sistema nervoso central. Neste contexto, duas moléculas produzidas por fungos, a psilocibina e seu derivado psilocina, têm recebido muita atenção nos últimos anos por seu potencial para o tratamento de doenças como depressão, ansiedade e dependência química (Nichols, 2020) [1]. Os primeiros registros europeus a respeito dos efeitos farmacológicos da psilocibina e psilocina remontam à época da conquista espanhola, quando o frade espanhol Bernardino de Sahagún viajou à chamada "Nova Espanha" (atual México) e conduziu estudos etnográficos onde são encontradas referências ao Teonanacatl (Carne de Deus), o cogumelo sagrado da Mesoamérica. De modo geral, estes cogumelos somente foram seguramente identificados a partir da década de 1930, sendo, a partir de então, classificados como pertencentes a espécies do gênero *Psilocybe*, *Panacolus*, *Stropharia*, *Panaeolus*, *Conocybe*, *Gymnopilus*, *Pluteus* e *Panaeolina* (Cody, 2008; Derosa & Maffioli, 2014; Tyls *et al.*, 2014) [2-4]. Contudo, a psilocibina somente foi purificada e identificada no final da década de 1950, quando Hofmann *et al.* (1958a) [5] cristalizaram e nomearam esta substância a partir de estudos com amostras desidratadas do cogumelo *Psilocybe mexicana*. Posteriormente, a estrutura da psilocibina foi

determinada por meio de sua síntese química total (Hofmann *et al.*, 1958b) [6]. Assim, foi possível atestar que a psilocibina (O-fosforil-4-hidróxi-N,N-dimetiltriptamina) é solúvel em água e determinar outras características químicas deste composto, como, por exemplo, seu peso molecular (248.248) e temperatura de fusão (224 °C) [6]. Albert Hofmann também identificou a presença de uma psilocibina defosforilada nas amostras por ele estudadas, que foi denominada de psilocina (4-hidróxi-N,N-dimetiltriptamina). Esta molécula, por sua vez, apresenta uma menor solubilidade em água em comparação com a psilocibina, porém é mais resistente à decomposição em temperatura ambiente.

1.2. Propriedades farmacológicas e mecanismo de ação da psilocibina e psilocina

Tanto a psilocibina quanto a psilocina (Figura 1) são alucinógenos, ou seja, substâncias que, mesmo em pequenas doses, são capazes de alterar a percepção da realidade de uma pessoa de maneira dramática e imprevisível, sem, no entanto, causar estimulação psicomotora ou depressão nem alterar o nível de alerta, atenção, memória ou orientação (Cody, 2008) [2]. Embora classificadas como alucinógenas, estes compostos não necessariamente causam "alucinações" no sentido estrito do termo, isto é, percepção de algo inexistente ou sensações oníricas em indivíduos despertos. De maneira geral, estes compostos se distinguem em relação a outras drogas psicoativas por não causarem dependência e, portanto, por não interferirem no mecanismo de recompensa mesolímbico, o que faz com que tais moléculas sejam consideradas drogas fisiologicamente seguras (Nichols, 2004; Katzung *et al.*, 2012) [7-8].

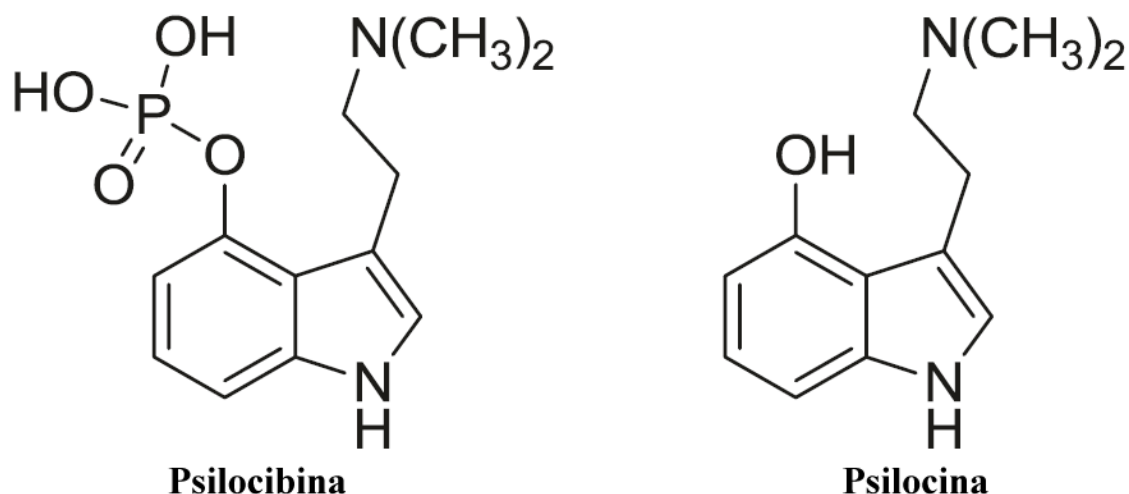


Figura 1 - Estrutura molecular da psilocibina e psilocina.

Entre as drogas alucinógenas, a psilocibina e a psilocina são mais precisamente classificadas como moléculas serotonina-*like* (indolalquilaminas) tendo, portanto, uma ação agonista em relação ao receptor de serotonina 5-HT_{2A}, que é bastante expresso nos dendritos apicais das células piramidais do córtex. Uma vez que a psilocibina possui um grupo fosfato, ela é mais solúvel em água do que a psilocina (Ballesteros *et al.*, 2006) [9]. Portanto, a psilocina é mais prontamente absorvida no trato gastrointestinal de ratos, o que sugere que este composto possui uma biodisponibilidade maior do que a psilocibina (Eivindvik *et al.*, 1989) [10]. Estudos farmacocinéticos em animais demonstraram que apenas 50 % da psilocibina marcada isotopicamente com C¹⁴ é absorvida após administração oral, sendo posteriormente distribuída de forma uniforme pelo corpo, incluindo o cérebro (Hopf & Eckert, 1974) [11]. Contudo, estudos *in vivo* envolvendo ratos mostraram que a psilocibina é rapidamente hidrolisada no estômago e intestino, o que significa que grande parte ou mesmo a totalidade destas moléculas é convertida e absorvida como psilocina (Eivindvik *et al.*, 1989) [10], a qual, por sua vez, possui como uma de suas características a facilidade de transpor a barreira hematoencefálica (Horita & Weber, 1961b; Horita and Weber, 1962; Hasler *et al.*, 1997) [12-14]. Este achado é reforçado pela observação que atesta que quantidades equimolares de psilocibina e psilocina produzem efeitos psicotrópicos qualitativos e quantitativos similares em humanos (Passie *et al.*, 2002) [15]. Desta forma, a psilocibina pode ser considerada uma pró-droga ou pró-fármaco, visto que seus efeitos biológicos decorrem basicamente pela sua conversão em psilocina.

Quanto ao mecanismo de ação, estudos envolvendo técnicas de imageamento cerebral após administração oral de psilocibina mostraram que esta molécula produz um aumento global do metabolismo de açúcar no cérebro, com um significante em determinadas regiões do córtex. Este aumento do metabolismo cerebral foi correlacionado positivamente com um estado psíquico alucinatório caracterizado pela modificação de traços relativos à personalidade, sugerindo, portanto, que a ativação do receptor 5-HT_{2A} leva a uma atividade metabólica hiperfrontal similar àquela associada a episódios psicóticos agudos típicos de esquizofrenia crônica (Vollenweider *et al.*, 1997) [16]. De forma similar, Gouzoulis-Mayfrank *et al.* (1999) [17] demonstrou que a psilocibina aumentou a taxa de metabolismo de glicose em regiões corticais frontotemporais, o que reforça a capacidade desta molécula de ativar o córtex cerebral de forma geral. Outra importante atividade da psilocibina e psilocina está relacionada a seus efeitos em regiões-chave do cérebro que promovem a sinalização e comunicação neuronal. Estes *hubs* cerebrais são localizados em regiões anatômicas centrais conectadas a redes neuronais que participam de uma série de tarefas cognitivas e afetivas relacionadas à comunicação e ao estado destas redes. De fato, vários estudos empíricos e computacionais apoiam a hipótese de que certas regiões cerebrais são cruciais para integrar informações que servem de base para vários aspectos de funções cognitivas complexas (Nichols, 2020) [1]. Assim, ao regular a atividade desses *hubs* cerebrais específicos por meio de ajustes de perfusão, a psilocibina foi capaz, por exemplo, diminuir a atividade e conectividade de regiões cerebrais associadas a estados de depressão (Carhart-Harris *et al.*, 2012a, 2012b) [18,19]. Ademais, a psilocibina e a psilocina, assim como outras substâncias alucinógenas, parecem reduzir de forma geral a estabilidade e a integridade de redes neuronais bem estabelecidas, reduzindo, simultaneamente, o grau de segregação entre elas. Desta ideia decorre que o fato de que estas substâncias promovem um estado cerebral onde há uma maior repertório de conexões conectividade que são estabelecidas e rompidas ao longo do tempo. Portanto, alucinógenos com a psilocibina e a psilocina não apenas levam a uma maior aleatoriedade de estados cerebrais, como também permitem a formação de conexões funcionais mais intensas e topologicamente distantes daquelas encontradas normalmente do cérebro (Petri *et al.*, 2014) [20].

1.3. Estudos clínicos envolvendo a psilocibina e a psilocina

Diversos estudos clínicos têm sido realizados ao longo das últimas décadas envolvendo a psilocibina e seu derivado metabólico psilocina. Inicialmente, após a identificação e síntese da psilocibina em 1960, a empresa *Sandoz Pharmaceuticals* começou a distribuir comprimidos contendo 2 mg de psilocibina sob o nome comercial de Indocibina → como adjuvante de drogas voltadas para psicoterapia. De 1960 a 1980 houve mais de 100 relatos publicados sobre a psilocibina, incluindo desde relatos anedóticos de uso humano até análises e estudos bioquímicos. Depois de um interregno de alguns anos, houve um aumento significativo, em meados da década de 1990, de trabalhos relacionados aos efeitos da psilocibina e psilocina na percepção e emoção humanas, além de diversos estudos sobre psicofarmacologia. Entre eles estão 112 estudos relatados à administração de psilocibina em humanos, incluindo ensaios terapêuticos recentes referentes ao tratamento de depressão, ansiedade e transtornos derivados do uso abusivo de substâncias. Como um dos exemplos mais destacados, é possível citar o trabalho de Moreno *et al.* (2006) [21], que relataram resultados de um estudo envolvendo a psilocibina e nove indivíduos portadores de transtorno obsessivo-compulsivo (TOC). Os autores deste estudo observaram que o uso destas moléculas mostrou-se seguro e foi associado a reduções nos sintomas centrais do TOC em vários indivíduos. Por sua vez, Griffiths *et al.* (2006) [22] administraram psilocibina a 30 voluntários em um estudo randomizado controlado por placebo e relataram que, após dois meses, os voluntários que fizeram uso da psilocibina manifestaram um incremento na sensação de satisfação pessoal e espiritual, que foi atribuída a mudanças nas atitudes e no comportamento atestadas por observadores da comunidade em que estas pessoas viviam. Os participantes também alegaram perceber um aumento do senso de apreciação estética, imaginação e criatividade.

Outro destaque é dado ao trabalho de Grob *et al.* (2011) [23], o primeiro a fornecer reais evidências do efeito terapêutico da psilocibina. Neste estudo foram recrutados doze adultos com câncer em estágio avançado e que apresentavam sintomas severos de ansiedade. O desenho experimental controlado por placebo envolveu a administração oral de uma dose moderada de psilocibina (0,2 mg/kg) e os dados obtidos demonstraram uma redução significativa dos sintomas de ansiedade após um a três meses de tratamento, acompanhada de uma melhora de disposição e humor em seis meses de tratamento. O próximo ensaio terapêutico relatado foi realizado por Johnson *et al.* (2014) [24], que envolveu um estudo piloto onde doses orais de 20 mg/70 kg ou 30

mg/70 kg de psilocibina foram administradas durante o curso de um tratamento antitabagismo. Este trabalho envolveu a participação de 15 pacientes psiquiátricos fumantes saudáveis dependentes de nicotina com média de seis tentativas anteriores de abandono do consumo de cigarros e que fumavam, em média, 19 cigarros por dia durante uma média de 31 anos de consumo. Os dados deste estudo indicaram que a psilocibina pode ser um adjuvante potencialmente eficaz para modelos de tratamento de tabagistas por diminuir de forma significativa os efeitos da abstinência.

Os estudos mais citados envolvendo o emprego de psilocibina foram relatados em dezembro de 2016 e envolveram o tratamento assistido por psilocibina de pacientes com câncer. Um destes trabalhos, conduzido por Griffiths et al. (2016) [25], foi um estudo randomizado, duplo-cego, que tinha como objetivo avaliar os efeitos da psilocibina em 51 pacientes com câncer e sintomas de depressão e/ou ansiedade. Neste caso, uma dose alta de psilocibina (22 ou 30 mg/70 kg) produziu uma diminuição significativa dos sintomas de depressão e ansiedade, além de promover uma melhora na qualidade de vida dos pacientes relacionada a um incremento de sentimentos de otimismo e diminuição de expectativas negativas ligadas à possibilidade de morte. Estas mudanças sustentaram-se durante um período de seis meses, com cerca de 80 % dos participantes continuando a mostrar reduções clinicamente significativas nos sintomas de depressão e ansiedade. Finalmente, resultados similares foram relatados por Ross *et al.* (2016) [26], que realizaram um estudo onde uma dose única de psilocibina (0,3 mg/kg) associada a psicoterapia foi capaz de promover uma rápida, robusta e duradoura ação de medicamentos ansiolíticos e antidepressivos em pacientes com câncer e estresse psicológico. A psilocibina também levou a uma diminuição da desmotivação e desesperança relacionadas ao câncer e proporcionou, de modo geral, um aumento da sensação de bem-estar espiritual e qualidade de vida. Após um período aproximado de seis meses, aproximadamente 60 % a 80 % dos participantes continuaram apresentando reduções clinicamente significativas na depressão ou ansiedade, bem como uma atitude mais positiva em relação à possibilidade de morte.

Assim, com base nos exemplos acima citados, fica claro o potencial da psilocibina e da psilocina para o desenvolvimento de drogas naturais ou sintéticas para o tratamento de uma grande diversidade de doenças psíquicas. Esta possibilidade fica ainda mais clara devido ao fato de que, em 2018, a FDA (*Food and Drug Administration*), a agência reguladora do uso de drogas dos Estados Unidos, concedeu o status de “*breakthrough therapy*” (terapia inovadora) ao tratamento com psilocibina de transtornos de depressão resistente a drogas desenvolvido pela

empresa *Compass Pathways Ltd.* Posteriormente, a FDA também concedeu este mesmo status ao tratamento baseado no uso de psilocibina do Transtorno Depressivo Maior (TDM) oferecido em caráter experimental pelo *Usona Institute* (<https://www.usonainstitute.org/research/>).

1.4. Os fungos produtores

O fungo *Psilocybe cubensis* (e *Psilocybe galindoi*) pertencem à família Strophariaceae, orem Agaricales. Esta família é caracterizada por basidiocarpos que variam de pequenos e delicados a grandes e robustos. O píleo destes cogumelos é bem pigmentado e macio. Os esporos apresentam uma coloração escura, variando do violeta escuro ao ferrugíneo escuro. Seus basidiósporos se tornam marrons quando em contato com hidróxido de potássio (KOH 5%), com paredes espessas e um poro germinativo bem evidente.

Fungos desta família são encontrados em madeiras em decomposição e esterco de gado, especialmente em campos abertos, pastagens, jardins e pântanos. Eles não formam associação micorrízica. O gênero *Psilocybe* tem 144 espécies no mundo, onde 81 são alucinógenas. A espécie *Psilocybe cubensis* é a mais famosa (conhecida).

O fungo *Psilocybe cubensis* produz cogumelos que apresentam efeitos alucinógenos quando ingeridos. Estes efeitos são causados pelos compostos psilocibina (PB) e psilocina (PC). Uma característica destas espécies é a reação azulada (Bluing Reaction) que ocorre quando a estipe do cogumelo é esmagada entre os dedos, ou quando ele é seco. Este fato é devido a hidrolização da psilocibina em psilocina, a qual então oxida em anel quinóide (o qual tem coloração azul).

2. OBJETIVOS DO PROJETO

O presente projeto está sendo desenvolvido em parceria e financiamento da NeoLumina, uma empresa do grupo Emerald. Participam deste projeto diversos pesquisadores da UNESP do Botucatu e Bauru, com as mais diversas especialidades no ramo da química. O objetivo central do projeto é síntese de um análogo do composto Psilocibina, de modo que este possa ser patenteadado e utilizado em programas de tratamento de pacientes com doenças cerebrais, como Parkinson e Alzheimer.

Como objetivos parciais específicos deste programa de pós-doutorado pode-se citar:

- Desenvolvimento de metodologia de produção massiva de cogumelos dos fungos do gênero *Psilocybe*;
- Desenvolvimento de metodologia para maior produção de Psilocibina nestes cogumelos;
- Desenvolvimento de metodologia para maior produção de micélio dos fungos com alta concentração de psilocibina, facilitando sua extração.

O presente relatório pretende descrever as experiências do pós-graduando na produção de micélio e cogumelos do referido fungo, apontando as dificuldades encontradas e os métodos desenvolvidos para sua superação.

1. MATERIAIS E METODOLOGIA

PARTE 01 - Aquisição dos fungos e primeiros testes

A aquisição de exemplares de fungos do gênero *Psilocybe*, principalmente *Psilocybe cubensis*, foi uma tarefa difícil. Poucos pesquisadores de instituições de pesquisa com fungos possuíam exemplares bons, dentre estes podendo citar o Instituto Botânico de São Paulo, o IAC e o Instituto Biológico.

A primeira aquisição ocorreu quando o autor encontrou uma loja virtual denominada de jardim Etnobotânico, localizado na Grande São Paulo. Três representantes foram comprados, sendo duas linhagens de *Psilocybe cubensis* (Cambodian e TKSSS) e uma espécie de *Panaeolus*, o *P. cyanescens*. Os fungos foram entregues no dia 4 de março de 2022. Os fungos *Psilocybe* foram encaminhados na forma de suspensão de esporos (25mL) no interior de uma seringa (Figura 01). O Fungos *Panaeolus* foi entregue na forma de esporos secos envoltos em papel alumínio.

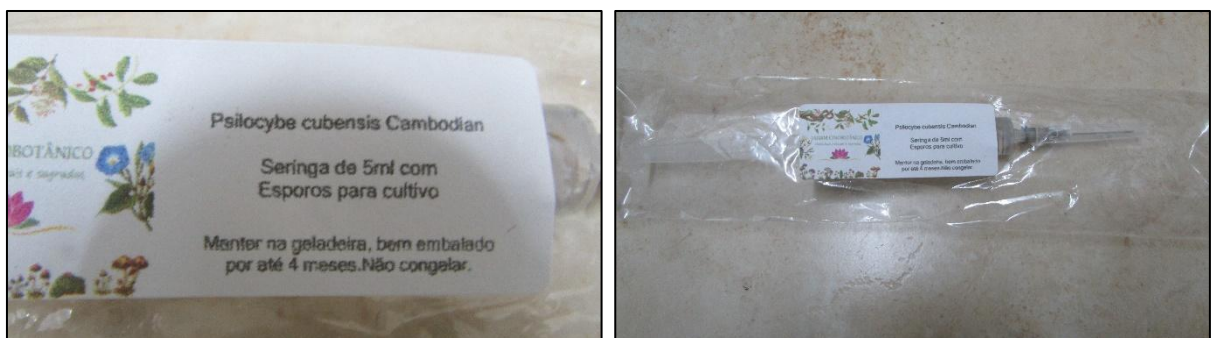


Figura 01 – Suspensão de esporos dos fungos comprados para cultivo de *Psilocybe*.

O gênero *Panaeolus* pertence à família Coprinaceae (Ordem Agaricales) e apresentam membros que são venenosos, causando efeitos alucinógenos (Alexopoulos et al, 1996). Presença de psilocibina tem sido relatada em algumas espécies deste gênero, mas não em outras. Esta é a razão pela qual este espécime foi incluído neste estudo.

Uma vez que a suspensão de esporos havia chegado, o próximo passo foi a transferência e cultivo deste fungo em meios de cultura. Para tal utilizou-se o meio BDA (Batata-dextrose-ágar). Levando em consideração que a Ordem do fungo é formado por decompositores de celulose, escolheu-se realizar o crescimento em meio ágar também contando serragem fina, como fonte primária de celulose.

As fotos abaixo demonstram o estado da serragem utilizada na confecção dos meios de cultura.



Figura 02 – Serragem em diferentes granulometrias para confecção dos meios de cultura.

Os meios foram vertidos em placas de plástico e, após solidificação, uma gota da suspensão foi inserida na parte central da placa. A gota foi então espalhada sobre a superfície da placa utilizando uma alça de Drigalski. Esta transferência foi realizada dia 08/03/2022. As placas foram incubadas em condições de laboratório, no escuro.

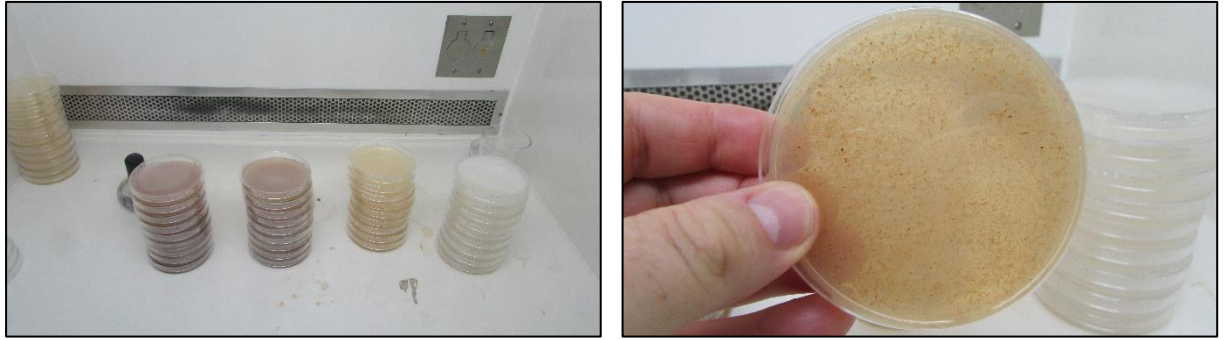


Figura 03 – Meios onde foram transferidas as gotas da suspensão de esporos.



Figura 04 – Inoculação do meio pela deposição de uma pequena gota da suspensão da seringa na parte central.

Resultados preliminares do cultivo

Todas as placas que receberam a gota de suspensão da seringa apresentam forte contaminação por bactérias, aos 7 dias após a inoculação (12 de março) (Figura 05). O vendedor foi comunicado e uma nova leva de microrganismos foi adquirida.

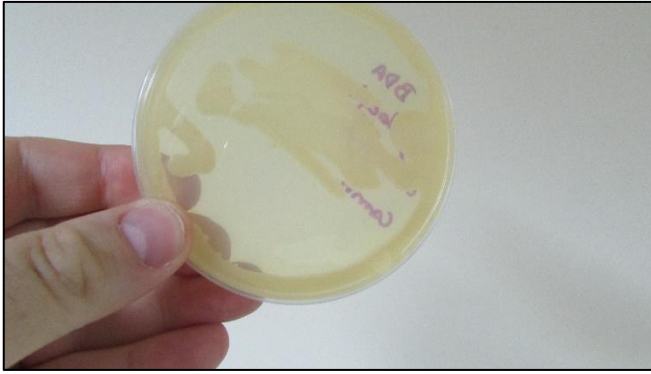


Figura 05 – Contaminação dos meios de cultura por bactérias.

Aquisição dos novos fungos

Uma nova leva contendo *Psilocybe cubensis* TKSSS, *Psilocybe galingoi* e *Panaeolus cyanescens* foi adquirida no dia 17 de março de 2022. A entrega ocorreu em 48 horas após a compra. Além da tentativa de isolar do fungo em meio BDA, diversos substratos foram testados como meio para o cultivo do fungo. Entre os substratos, iniciou-se pelos compostos por serragem, bagaço de cana, casca de arroz, fibra de coco e casca de pinus.

O substrato foi inserido dentro de sacos plásticos (resistentes ao calor), opacos, com 18 x 18 cm de tamanho e fechados com um chumaço de algodão e barbante (Figura 06). Os substratos foram medidos de acordo com sua capacidade de absorção de água: 82,5% para serragem, 102% para casca de arroz, 137% para bagaço de cana, 65,6% para fibra de coco e 23,3% para casca de pinus.

Todos os substratos foram umedecidos com 70% (em relação à absorção total) e autoclavados a 120°C e 1 atm de pressão por 20 minutos.

A inoculação do substrato ocorreu pela transferência do conteúdo das seringas em condições de câmara de fluxo laminar. A agulha foi inserida no saco plástico e o buraco resultante foi fechado com Parafilm (Figura 07). No caso do *Panaeolus cyanescens* a inoculação foi realizada pela transferência de alguns esporos para o interior dos casos plásticos, usando uma alça de platina.



Figura 06 – Sacos plásticos preenchidos com substrato.



Picture 07 – Inoculation of bags containing the substrates for fungi growth under sterilized conditions.



Picture 08 – Incubation of growth bags under total dark and temperature of 27°C (the lights were kept on only for the picture to be taken)

Isolamento dos fungos em BDA e AA

A nova leva de fungos *Psilocybe cubensis* TKSSS, *Psilocybe galindoi* e *Panaeoulus cyanescens* foi também isolado em AA e em BDA. Ambos os meios que receberam o *Psilocybe* apresentaram novamente contaminação por bactérias, o que levanta dúvidas sobre a viabilidade do produto. O meio contando os esporos de *Panaeoulus* apresenta um bom crescimento micelial.

No entanto, pequenas colônias puderam ser isoladas da grande massa bacteriana e transferidas para outras placas contendo meio de cultura. Em pouco tempo, colônias limpas foram sendo obtidas nestes meios e estão prontas para os testes de crescimento.

Preparo do substrato em placas de plástico

Cinco sacos plásticos foram preenchidos com substratos diversos conforme descrito anteriormente. Todos os substratos receberam umidade suficiente para atingir 70% de sua capacidade de absorção. Os sacos foram autoclavados a 120°C e 1 atm de pressão por 20 minutos. Após resfriamento, o conteúdo dos sacos foi vertido para placas de plástico estéreis, havendo pequena adensamento do material no interior das placas (Figuras 9 e 10).

O líquido no interior das seringas foi utilizado para inocular os substratos, inserindo pequenas gotas na superfície do material. O teste foi realizado com o fungo *Psilocybe cubensis* TKSSS e a inoculação ocorreu no dia 22 de março de 2022.



Figura 09 – Placas de plástico com casca de arroz

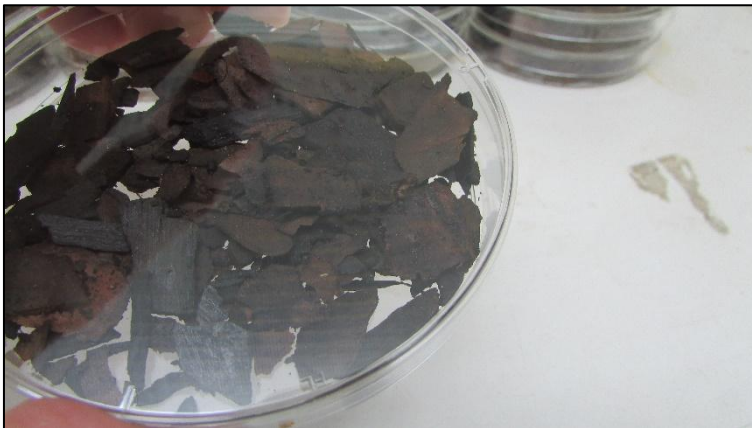


Figura 10 – Placas de plástico com casca de Pinus.



Figura 11 – Placas contendo os diferentes substratos de casca de Pinus, casca de arroz, bagaço de cano, serragem.

Resultados preliminares do cultivo

Não houve crescimento micelial do fungo nos substratos devido a duas razões básicas:

- Primeiro, a umidade estava muito baixa
- Segundo, o substrato utilizado não apresenta uma fonte imediata e disponível de energia (carboidrato) para iniciar o crescimento do fungo.

A conclusão é que uma nova fonte de energia é necessária para o crescimento do fungo, em vez de utilizarmos apenas os substratos à base de celulose. **Todas as placas foram descartadas e o experimento foi finalizado.**

Em 11 de março de 2022 realizamos a inoculação de sacos contendo substratos diferentes. Após certo período de incubação, os sacos foram abertos para induzir a formação dos cogumelos.



Figura 12 – Sacos abertos para exposição à luz.

Não houve crescimento micelial nos substratos à base de celulose e nenhum cogumelo foi produzido. A conclusão deste experimento é que os fungos presentes na seringa não foram capazes de crescer nestes substratos. **Os sacos foram descartados e o experimento finalizado.**

PARTE 02 -

Nesta segunda etapa do projeto, iniciamos os trabalhos com uma reunião que o Dr. Jeremy Baker marcou com a Dra. Christine Smith, da Lambert Spawn, a qual é especializada na produção de Spawn (micélio usado na produção de cogumelos) em Oyster Mushroom e Agaricus. A reunião ocorreu no dia 8 de março (Horário Brasília) e estavam presentes o DR. Edivaldo Velini, Dr. Christiano, Dr. Rafael da Unesp. A Dra Christine propôs que deveríamos utilizar sementes como fontes de carboidrato no cultivo do fungo e levantou a ideia de que a produção de micélio poderia ser mais vantajosa para extração da psilocibina do que a produção dos cogumelos. A Dra Christine também confirmou que a exposição dos fungos ao frio e à luz pode induzir à formação dos cogumelos.

A produção de grandes quantidades de micélio se tornou agora parte dos planos de cultivo de *Psilocybe cubensis*, e ambas as técnicas (basidiocarpo e micélio) serão testadas a partir de agora no projeto.

Os substratos a base de celulose foram autoclavados no interior de sacos plásticos de polietileno de alta densidade com 70% de umidade (70% do poder de embebição) a 120°C e 1 atm de pressão por um período de 20 minutos. Após seu resfriamento, o interior dos sacos plásticos foi transferido para placas de plástico sob condições de câmara de fluxo laminar. A quantidade utilizada por placa não foi padronizada, sendo esta suficiente para cobrir toda a superfície da placa. Sobre o substrato foi depositado um pequeno volume de BDA para umedecer e quase cobrir o substrato.

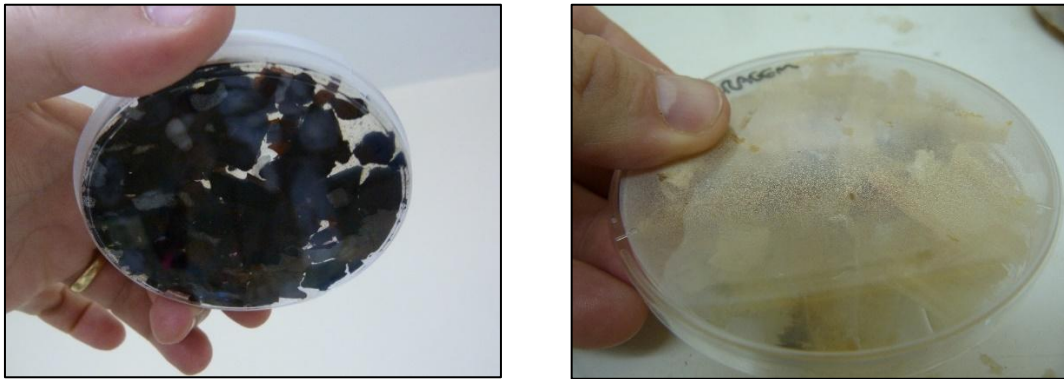


Figura 13 – Mistura de substratos a base de celulose e BDA

O meio foi mantido dentro da câmara de fluxo laminar até sua solidificação e então um pequeno disco de micélio foi transferido para o centro da placa. As placas foram mantidas sob condições de ausência de luz a 25°C para desenvolvimento do fungo.

A mesma metodologia de cultivo foi utilizada para o fungo *Psilocybe cubensis* em um novo recipiente. O novo recipiente é produzido com alumínio, o que permite que seja esterilizada na autoclave.



Figura 14 – Substratos a base de celulose em bandejas de alumínio.

As bandejas de alumínio foram preenchidas com os substratos. Cada placa recebeu um volume de BDA que foi suficiente para cobrir a superfície da placa e o substrato. As bandejas de alumínio foram inseridas em sacos plásticos os quais foram fechados com um plug de algodão e barbante. As bandejas no interior dos sacos plásticos foram autoclavadas a 120°C e 1 atm de pressão por 20 minutos. Após a autoclavagem, as placas foram mantidas em uma superfície limpa por duas horas para resfriamento e solidificação.



Figura 15 – Inserção de BDA nos substratos a base de celulose em bandejas de alumínio.



Figura 16 – Bandejas de plástico envolvida em saco plástico para autoclavagem.

Os sacos plásticos foram abertos dentro da câmara de fluxo laminar e um fragmento de micélio foi transferido para a superfície de cada meio. Os sacos foram então fechados com um plug de algodão novamente e então incubados em condições de escuro a 25°C.

As bandejas de alumínio foram analisadas em 4 de abril para checar se houve algum crescimento micelial. Os pesquisadores observaram um forte crescimento micelial sobre os substratos. Quatro bandejas de alumínio foram então abertas em condições estéreis, o micélio sobre o substrato foi

fragmentado com uma agulha estéril e os fragmentos foram incorporados com o resto do substrato. Os sacos foram então fechados e novamente incubados no escuro a 25°C.

Em 18 de abril de 2022, foi observado que o fungo apresentou um excelente crescimento micelial sobre a mistura de grãos dentro das placas de plástico. O micélio apresentou uma coloração branca e cotonosa (Figura 17).

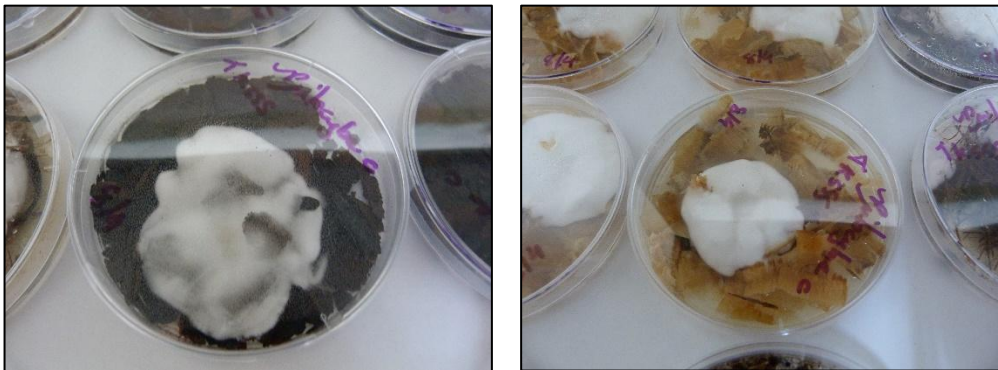


Figura 17 – Aspectos do crescimento micelial do fungo sobre os substratos a base de celulose com BDA.

Algumas placas foram submetidas à condições de refrigerador por 6 horas e então submetidas à temperatura ambiente (25C) e luz constante para induzir a formação dos cogumelos. Outras placas foram submetidas à condições de baixas temperaturas (-2°C) por duas horas e então submetidas às mesmas condições como os outras placas. Todo dia uma borrifada de água foi aplicada sobre as placas para manter a umidade do micélio. **Não houve produção de cogumelos.**

Parte 03

Uma nova metodologia de preparação de meio foi testada usando misturas de grãos e substratos a base de celulose para aumento do seu conteúdo nutricional. Três diferentes misturas foram testadas no interior de sacos autoclavados. Estas misturas foram:

- Mistura 01 – 40 g de sementes de girassol, 40 g de quirela de milho, 10 g de palha de arroz, 10 g de bagacilho de cana, 40 g de esterco bovino;
- Mistura 02 - 40 g de sementes de girassol, 40 g de quirela de milho, 40 g de esterco bovino, 80 g de casca de Pinus;
- Mistura 03 - 40 g de sementes de girassol, 80 g de quirela de milho, 20 g de esterco bovino, 40 g de casca de Pinus;

Todas as misturas foram embebidas em água por um período de 4 horas. O excesso de água foi eliminado e os sacos foram autoclavados a 120°C e 1 atm de pressão por 20 minutos.



Figura 18 – Sacos contendo as misturas para esterilização.



Figura 19 – Misturas contendo sementes de girassol no interior dos sacos.

Após 3 horas de absorção de água, a mistura de substratos liberou uma água escura que estava em excesso. Esta água escura poderia conter nutrientes do esterco que estão sendo perdidos. Talvez, a maneira correta seria inserir o esterco após as sementes estarem prontas (embebidas).

A inoculação dos substratos (misturas) foi realizada pela transferência de um fragmento de micélio cultivado em BDA para os substratos no interior dos sacos plásticos, sob condições estéreis. Após a colonização dos sacos, o substrato foi agitado para incorporar o micélio em meio aos grãos. Este procedimento foi realizado a cada três dias. A inoculação ocorreu em 13 de março de 2022.



Figura 20 – Sacos com as três misturas para cultivo do fungo.

Alguns dias após a inoculação dos sacos plásticos, em 18 de março de 2022, ficou evidente um forte odor de material em degradação. Este odor foi proveniente dos fungos crescendo em meio de sementes. Não foi observado contaminação bacteriana, e o odor pode ser um resultado normal do processo de fermentação ou mesmo um início de contaminação bacteriana devido ao baixo fluxo de oxigênio, o que causaria crescimento bacteriano em alguns pontos do substrato. Este fato poderia causar o cheiro desagradável. Foi observado que dois sacos foram a fonte do odor desagradável e foram descartados.

O resto dos sacos plásticos foram abertos sob condições estéreis e o substrato em seu interior foi misturado para permitir maior fluxo de ar. Os sacos foram novamente fechados e foram dispostos de forma horizontal para permitir melhor aeração do meio.

Após alguns dias os sacos foram abertos e submetidos a condições de luz contínua. Após dois dias ficou clara a presença de um forte odor e uma consistência de encharcamento no material. Ficou evidente que os sacos plásticos criaram condições anaeróbicas em algumas partes do substrato, o que provocou a formação do odor desagradável. Moscas foram também detectadas no interior dos sacos, atraídas pelo odor desagradável, provavelmente.

Os sacos foram descartados e o experimento foi finalizado.

Uma nova metodologia de preparação do Spawn foi testada em placas estéreis de plástico usando uma mistura de grãos como fonte de substrato. A mistura de sementes de aveia, milho e girassol, na proporção 1:1:1 (250 ml cada) foi fervida em água no micro-ondas por um período de 4 minutos. O excesso de água foi descartado, os grãos foram inseridos dentro dos sacos plásticos e autoclavados a 120°C e 1 atm de pressão por 20 minutos. Os grãos foram então transferidos para placas estéreis na quantidade necessária para cobrir sua

superfície. Pequenos pedaços de micélio de *Psilocybe cubensis* TKSSS, *Psilocybes cubensis* Cambodian e *Panaeoulus cyanescens*, cultivados em BDA, foram transferidos para estas placas. As placas foram fechadas com parafilm e incubadas sob escuro constante a 25°C. A transferência foi feita em 13 de março de 2022.



Figura 21 – Mistura de grãos no interior das placas.

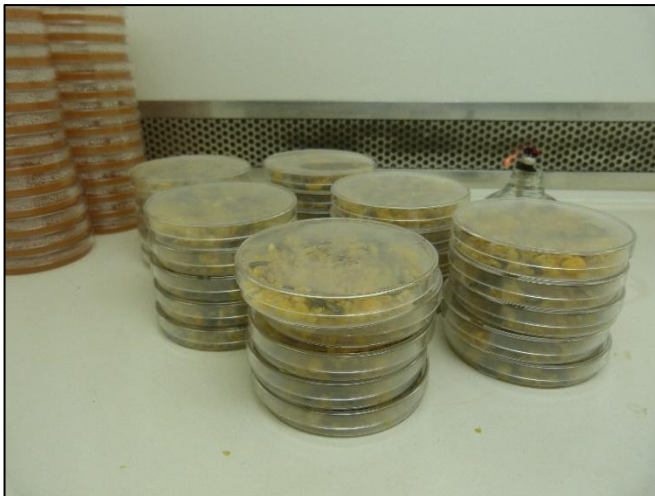


Figura 22 – Diversas placas contendo a mistura de grãos a ser testada.

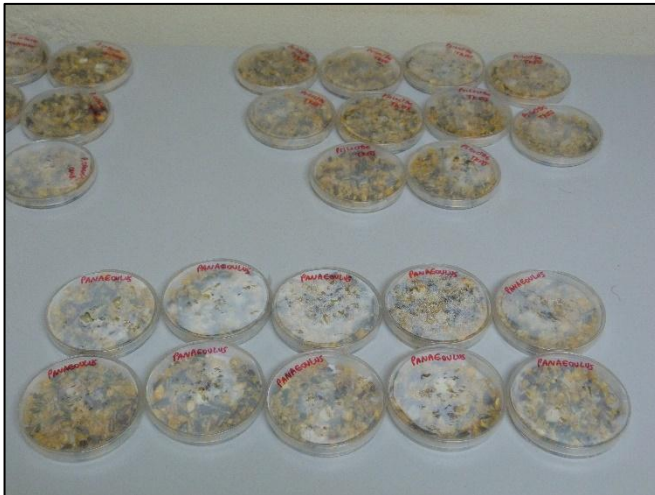


Figura 23 – Placas contendo a mistura de grãos inoculada com o fungo *Psilocybes cubensis* e *Panaeolus cyanescens* incubados no escuro a 25°C.

Um novo meio foi então testado, baseado no conceito de que o fungo *Psilocybe cubensis* (ou outra espécie) cresce e se reproduz em esterco de gado deixado em pastagens. Provavelmente deve haver alguns nutrientes ou substâncias no esterco que são importantes para o crescimento e produção de basidiocarpos do fungo.

Foram utilizadas três novas misturas de material orgânico para testar a produção de micélio e, provavelmente, de cogumelos do *Psilocybe*.

- Mistura A: Esterco (60% = 180g) + Milho (20%= 60g) + Bagaço de cana (20%=60g)
- Mistura B: Esterco (70% = 210g) + Milho (20%= 60g) + Bagaço de cana (10%=30g)
- Mistura C: Esterco (80% = 240g) + Milho (15%= 45g) + Bagaço de cana (5%=15g)

O material permaneceu imerso em água por três horas e então foi filtrado. Desta vez o teor de umidade pareceu muito alto em alguns sacos plásticos. Três sacos de cada mistura foram confeccionados e autoclavados a 120°C e 1 atm de pressão por 30 minutos. A inoculação foi realizada em 19 de abril de 2022, usando o micélio que se desenvolveu nas placas de plástico contendo uma mistura de grãos. Após 2 dias (21 de abril) o substrato no interior dos sacos foi misturado para quebrar o micélio e os sacos mantidos novamente nas mesmas condições de incubação. Os sacos foram incubados no escuro a 25°C por 14 dias.

Um novo ensaio foi conduzido onde o substrato foi incubado no interior de bandejas plásticas. As bandejas foram esterilizadas com solução de hipoclorito de sódio por um período de 24 horas. O substrato composto por esterco bovino, casca de pinus, vermiculita e grãos de milho e girassol, todas na mesma proporção, foi autoclavado em sacos plásticos e transferidos para as bandejas plásticas sob condições de câmara de fluxo laminar (Figura

24). Os substratos foram inoculados com fragmentos de micélio produzidos em meio BDA, os quais foram incorporados no substrato. As bandejas foram incubadas em quarto escuro, e o substrato foi homogeneizado a cada três dias. O principal objetivo destas bandejas foi aumentar a aeração para o crescimento fúngico. No entanto, após alguns dias, foi observado que algumas moscas se encontravam dentro das bandejas e frascos, o que indicava a ausência de condições estéreis no interior dos recipientes.



Figura 24 – Novo método de produção de micélio e cogumelos de *Psilocybe cubensis* and *Panaeoulus cyanescens*.



Figura 25 – Frascos plásticos de produção de micélio de *Psilocybe* e *Panaeolus*.

Pode-se concluir que os sacos plásticos com substrato são a melhor metodologia para produção de micélio do fungo (spawn), e que as bandejas ou frascos plásticos poderiam ser utilizados numa segunda etapa do processo de produção de cogumelos.

Em 2 de maio de 2022, o fungo *Panaeolus* iniciou a produção de cogumelos nos substratos presentes no interior dos recipientes plásticos. Os substratos eram compostos por uma mistura de grãos, vermiculita, esterco e casca de pinus (como cobertura). O *Psilocybe cubensis* iniciou a produção um pouco mais tarde.

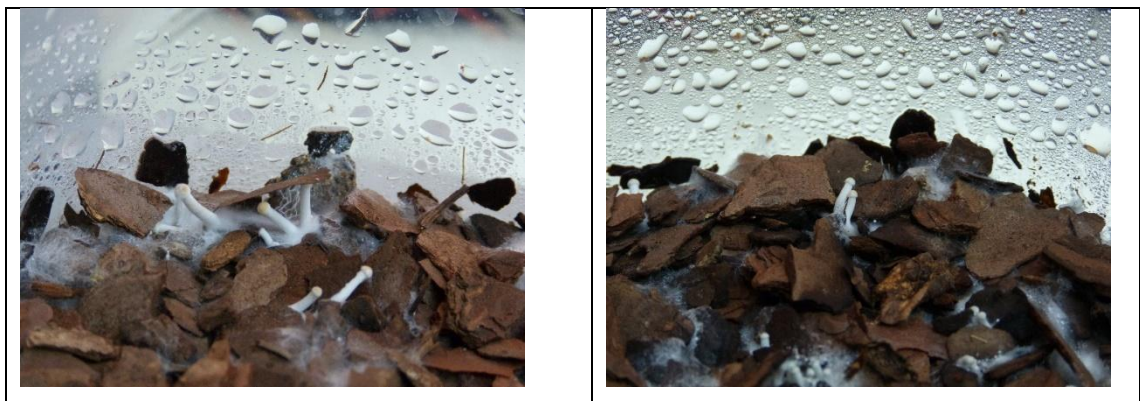


Figura 26a – Produção inicial de cogumelos de *Panaeolus cyanescens* em condições de laboratório em 2 de março de 2022.



Figura 26b – Cogumelos de *Panaeoulus cyanescens* em condições de laboratório em 4 de março de 2022.



Figura 26c – Cogumelos de *Panaeoulus cyanescens* em condições de laboratório em 7 de março de 2022

Os cogumelos foram colhidos e armazenados no interior de tubos Facon sob condições de freezer (-20C). Os cogumelos foram enviados a Botucatu para os testes de extração de compostos. Alguns frascos apresentaram contaminação com larvas de insetos e foram descartados. Provavelmente o material utilizado na segunda fase de produção deveria também ser autoclavado. O que foi observado é que a estipe dos cogumelos estavam alongadas devido, provavelmente, à baixa intensidade luminosa. O crescimento diferencial foi denominado de **estipe epileada** por Kitamoto et al (1974). Neste caso o píleo não se desenvolve bem e a estipe de torna alongada. Não há informações a respeito do efeito desta deformação na concentração de psilocibina.

Nesta nova etapa da pesquisa, os principais objetivos serão aumentar a produção dos cogumelos e desenvolver uma técnica de fácil produção de micélio e seu armazenamento. Isso será importante para a avaliação da psilocibina no micélio dos fungos *Psilocybe* e *Panaeolus*, o qual tem sido controverso com relação ao seu potencial de produção.

Produção de micélio em discos de papel

Discos de papel filtro (7 cm de diâmetros) e frascos Erlenmeyer contendo 250 ml de BD foram autoclavados a 120°C e 1 atm de pressão por 20 minutos. No interior da câmara de fluxo laminar (condições estéreis) os discos de papel foram inseridos no meio de cultura líquido e então depositados em placas de plástico estéreis contendo ágar solidificado. O propósito do ágar foi a manutenção da umidade do papel.

O papel foi inoculado com um fragmento de micélio cultivado em meio BDA. As placas foram incubadas a 26°C e 12 horas de luminosidade diária até que 50% da superfície do papel tenha sido colonizada (Figura 27).

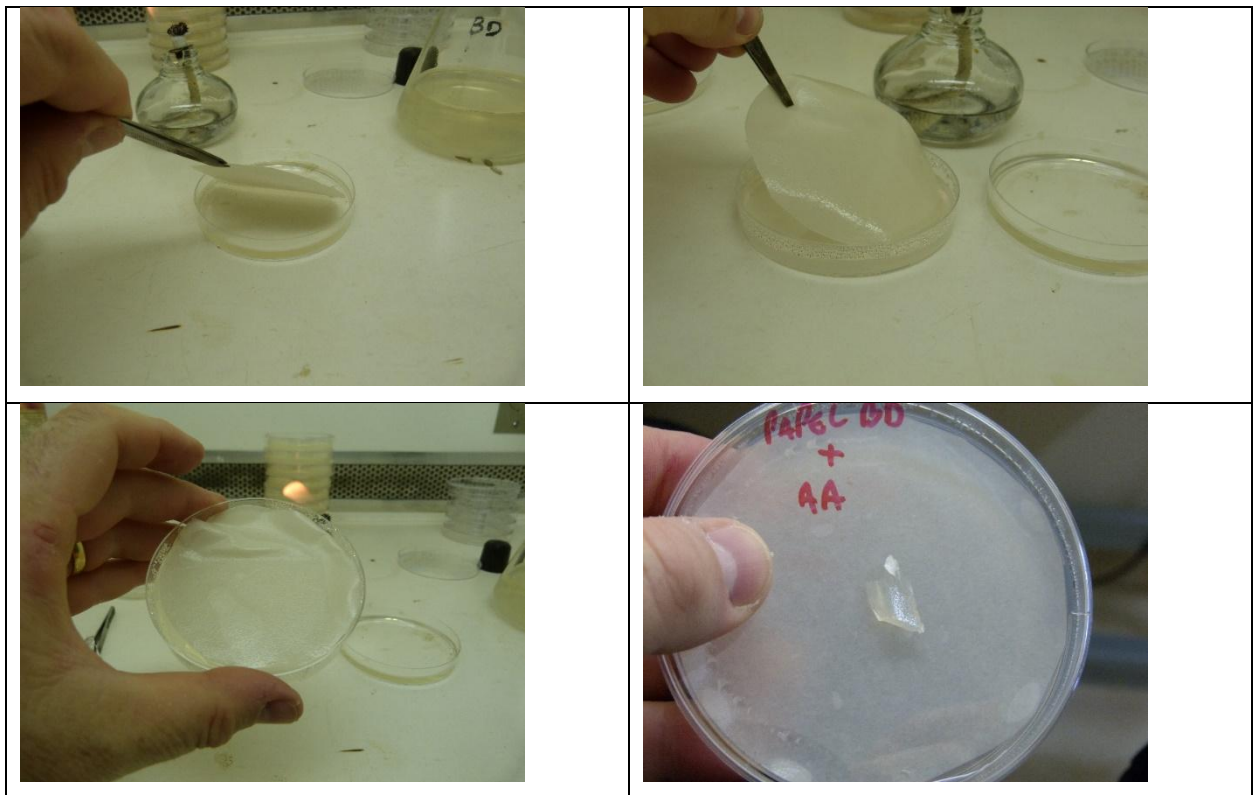


Figura 27 – Metodologia de cultivo de fungos em discos de papel.

Os resultados demonstraram que o micélio cresceu sobre o pedaço de papel. A quantidade de nutrientes presos no papel não foi suficiente para que o micélio crescesse sobre ele, apresentando, portanto, uma grande variabilidade de resultados (Figura 28). O procedimento não apresentou os resultados esperados e não será utilizado para produção de micélio.



Figura 28 – Desenvolvimento micelial (variação) sobre os discos de papel embebidos em meio BD.

Produção de cogumelos (Novo teste)

Uma grande quantidade de Spawn (micélio crescendo em grãos) foi produzida usando uma mistura de grãos no interior de sacos de polietileno fechados com um plug de algodão e barbante. O micélio produzido pertence as duas espécies de fungo estudadas no momento (*Psilocybe cubensis* e *Panaeolus cyanescens*). Os sacos plásticos foram mantidos sob condições de laboratório até que o micélio colonizasse todo o substrato. O micélio colonizado foi depositado no interior de bandejas de alumínio envoltas em sacos plásticos fechados com plug de algodão. Desta forma pretende-se eliminar o problema de contaminação com insetos e micoparasitas.

A mistura do micélio e do substrato foi realizada na proporção de 1:1 (objetivando acelerar a colonização). As figuras abaixo apresentam os materiais utilizados e os recipientes.



Figura 29 – Bandejas de alumínio, substratos e micélio utilizados na metodologia de produção.

Uma vez que o fungo colonizou todo o substrato e formou uma massa de micélio branco sobre este, os sacos foram abertos e o fungo induzido a produzir cogumelos mediante a mistura com novo substrato não esterilizado. As bandejas contendo o micélio foram irrigadas diariamente, depositando água sobre o micélio até que ocorresse a percolação pelos orifícios basais da bandeja.



Figura 30 – Bandejas sem sacos plásticos após mistura com novo substrato.

O fungo *Panaeolus cyanescens* foi o único a iniciar a produção de cogumelos em 4 de julho de 2022 (Figura 31). O desenvolvimento dos cogumelos foi observado durante todo o período até sua maturação (Figuras 32,33 e 34).



Figura 31 – Produção inicial de cogumelos de *Panaeolus* nas bandejas de alumínio em 4 de julho de 2022.



Figura 32 – Maior desenvolvimento dos cogumelos de *Panaeolus* nas bandejas de alumínio em 5 de julho de 2022.

No caso do *Psilocybe cubensis*, o fungo cresceu no substrato por aproximadamente 30 dias, quando então começaram a aparecer os primeiros cogumelos (Figuras 33



Figura 33 – Cogumelos de *silocybe* em início de formação.

Os cogumelos produzidos foram avaliados sob uma lupa, onde fotos das estruturas principais de identificação da espécie foram obtidas (Figura 34), como o annulus e a reação de coloração azulada (*bluing reaction*),



Figura 34 – Cogumelos de *Psilocybe cubensis* em diferentes tamanhos (esquerda); cogumelo de *Psilocybe* com annulus e lamelas unidas a estipe (direita).



Figura 35 – Reação de azulamento (Bluing reaction) em cogumelos de *Psilocybe cubensis* após aplicação de estresse mecânico.

Um fato interessante é a observação de um crescimento micelial diferenciado anteriormente à emissão dos basidiocarpos (cogumelos) (Figura 36). Este crescimento micelial se assemelha a cordões de algodão enrolados e agrupados em 4 a 5 fragmentos.



Figura 36 – Crescimento micelial diferencial de *Psilocybe cubensis* anteriormente à formação dos cogumelos.

A Tabela 01 apresenta as medidas dos cogumelos produzidos em maio e junho de 2022 usando a técnica apresentada neste capítulo.

Tabela 01 – Altura e diâmetro do píleo dos cogumelos de *Psilocybe cubensis* produzidos.

Cogumelo	Altura (cm)	Diâmetro píleo (cm)
1	5,0	1,9
2	3,0	2,3
3	3,5	2,0
4	4,0	1,0*
5	5,5	2,0
6	4,5	1,5
7	4,5	1,5
8	3,0	0,5*

*píleo deformado, formado próximo à parede do frasco.

Problemas observados durante a fase de formação dos cogumelos

O maior problema observado foi a contaminação do substrato por outros fungos, principalmente devido ao aumento da umidade. A Figura abaixo apresenta o crescimento de um mofo verde (provavelmente *Penicillium*) crescendo sobre o substrato com micélio dos fungos.



Figure 37 – Crescimento de mofo verde sobre o substrato colonizado por *Psilocybe cubensis*.

Produção de micélio em novo meio ágar

O propósito deste novo ensaio foi avaliar novos meios para serem inseridos nas técnicas de produção de micélio (spawn), objetivando um crescimento mais rápido e intenso. Ambas as espécies de cogumelos foram cultivadas em meios sólidos (ágar) compostos por farinha de arroz, farinha de aveia ou a mistura de ambas. A concentração de ambos os compostos foi de 60 g por litro de água. Quando foram misturados, cada componente do meio foi utilizado na concentração de 30 g por litro. Após autoclavagem, os meios foram depositados em placas de plástico e um disco de micélio foi depositado no centro da superfície do ágar.

O *Psilocybe cubensis* apresentou um forte e denso crescimento micelial em todos os meios, mas houve grande variância nos resultados. Algumas placas apresentaram um crescimento fraco, o que pode ser devido à variação na concentração das substâncias em cada placa, uma vez que a suspensão não pode ser mantida homogênea durante todo o processo de vertimento do meio (Figura 38).

Os meios de arroz e aveia podem ser bons complementos para os meios de produção de micélio (Spawn) na produção de cogumelos. Estas substâncias, não isoladamente, mas em mistura com grãos, podem promover melhores condições nutricionais para a produção de micélio.



Figura 38 – Crescimento micelial de *Psilocybe cubensis* em meio de aveia e farinha de arroz.

Produção de micélio e cogumelos em copos de poliestireno

Micélio produzido em substrato de grãos (interior de sacos plásticos) foram misturados com esterco de gado e casca de pinus e inseridos em copos de poliestireno. Os copos foram furados na base para escoamento do excesso de umidade. Os copos foram então mantidos sob 12 horas de fotoperíodo diário e irrigados com água de torneira.

Após alguns dias, uma vez que não foi observado micélio ou houve a formação de cogumelos, os copos foram cobertos com saco plástico para aumentar os níveis de umidade (Figura 39). Foi observado que neste tamanho do recipiente, a perda de umidade era muito rápida, promovendo um alto estresse ao crescimento do fungo. Talvez recipientes maiores possam manter mais constante a umidade do substrato, permitindo um melhor desenvolvimento do micélio.



Figura 39 – Copos contendo a mistura de micélio com o substrato.

Não houve produção de cogumelos ou mesmo de micélio em quantidade significativa que justificasse a utilização desta técnica.

Novos Testes

Baseado nos resultados obtidos até o momento, novas técnicas de cultivo dos fungos foram testadas, tendo como principal alteração o recipiente de cultivo. Estes recipientes, confeccionados com alumínio ou plástico, eram menores, mais profundos ou mesmo bem maiores que as bandejas utilizadas até o momento (Figura 40). O objetivo foi determinar se a produção estava de alguma forma relacionada com a forma e tipo do recipiente.



Figura 40 – Recipientes utilizados no cultivo dos fungos *Psilocybe* e *Panaeolus* após mistura do micélio com o substrato para produção de cogumelos.

Neste teste, pela primeira vez, houve obtenção de uma maior quantidade de cogumelos de *Psilocybe cubensis*. Um fato interessante é que, em alguns potes, os cogumelos apresentaram rachaduras na superfície do píleo. Estas rachaduras devem ser consequência da presença da casca de pinus sobre a superfície do micélio.



Figura 41 – Cogumelos de *Psilocybe* produzidos nos potes de alumínio.

O fungo *Panaeolus cyanescens* produziu maiores quantidades de cogumelo do que o *Psilocybe*, e dados puderam ser obtidos pela avaliação numérica e peso dos cogumelos (Figuras 42 e 43).

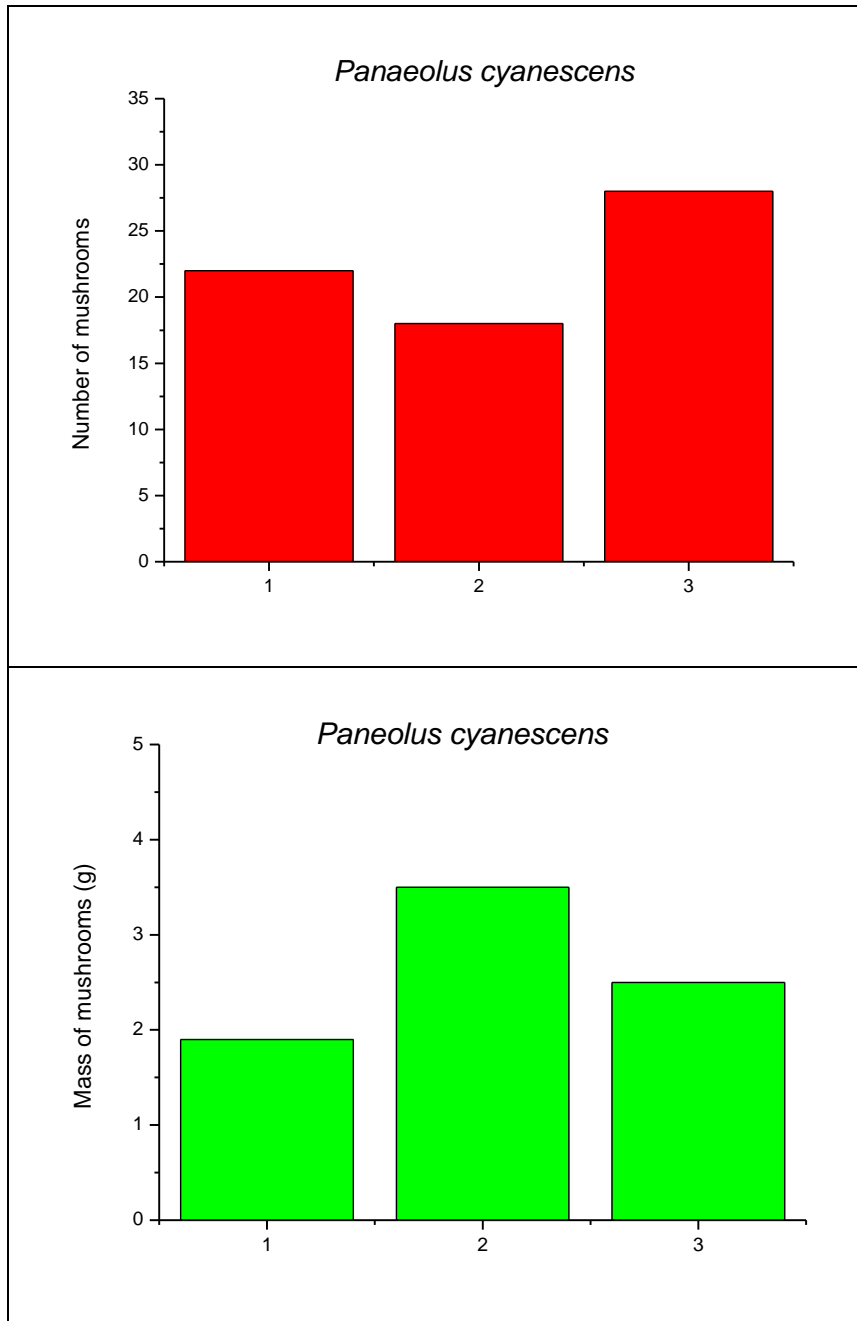


Figura 42 - Produção de cogumelos de *P. cyanescens* no primeiro experimento com os novos recipientes.

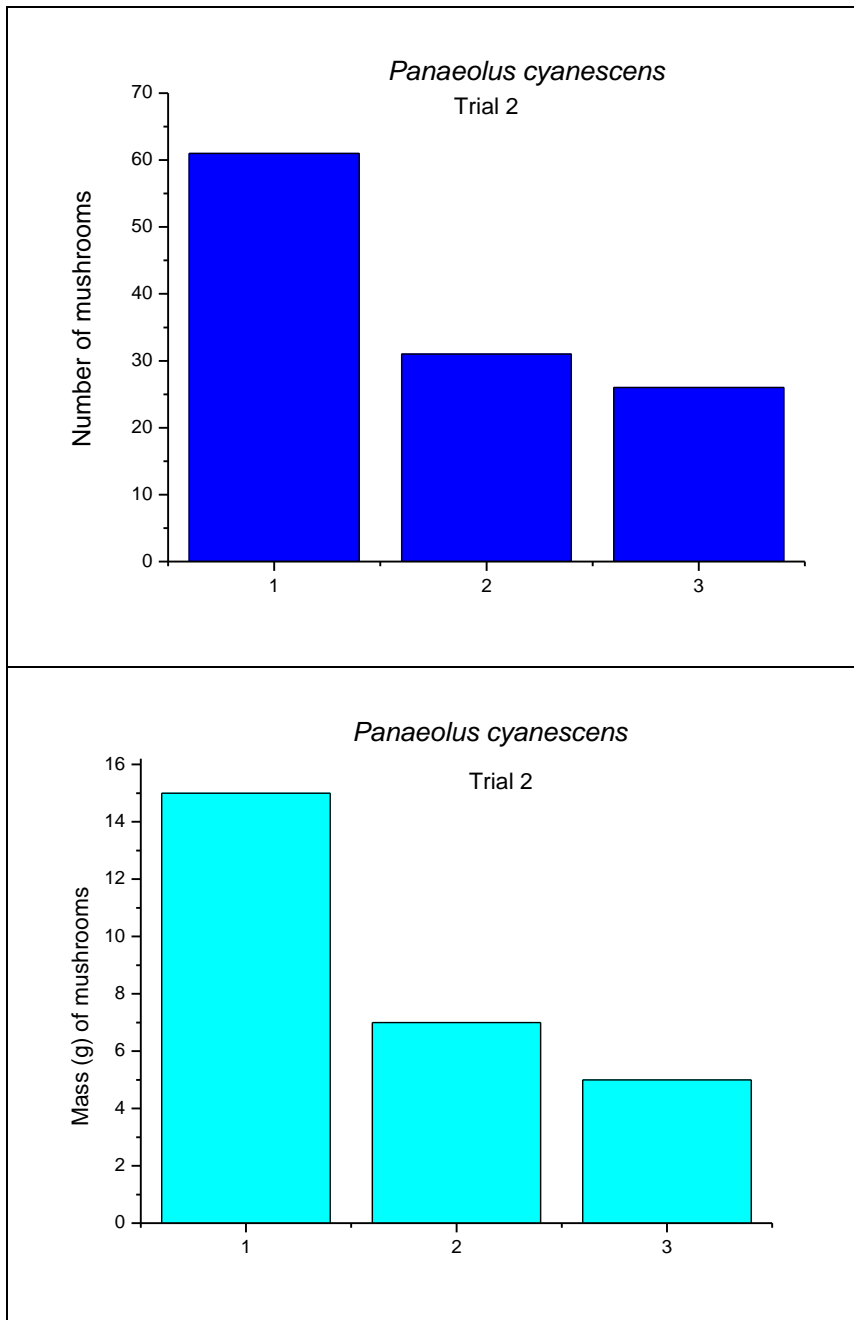


Figura 43 - Produção de cogumelos de *P. cyanescens* no segundo experimento com os novos recipientes.

Apesar de atingir a produção de quase 30 cogumelos em um único recipiente, houve muita variação entre os diferentes recipientes, sendo que em alguns não houve produção de qualquer cogumelo.

Em uma repetição deste experimento, decidiu-se utilizar sacos de formação de mudas de plantas florestais para cultivo dos fungos. Estes recipientes apresentam baixo custo e fácil

aquisição, o que tornaria economicamente mais viável a produção dos fungos. Ambos os fungos foram testados para produção de cogumelos em sacos de mudas. O procedimento é semelhante ao realizado com as bandejas.



Figura 44 – Recipientes utilizados para teste de produção de cogumelos em *Panaeolus* e *Psilocybe*.

Após a deposição do substrato colonizado nos recipientes, os mesmos foram cobertos com fina camada de palha de arroz e vermiculita. Os recipientes foram irrigados diariamente, e deixados sob condições de laboratório a 25°C e 12 horas de fotoperíodo.

O cultivo em sacos plásticos de produção de mudas de plantas florestais, e a cobertura do substrato colonizado com vermiculita apresentou um bom efeito na produção de cogumelos de *Panaeolus cyanescens* (Figura 45). O mesmo não correu com a palha de arroz. Pelo observado, a cobertura com vermiculita permite a passagem da água, evitando sua retenção e também permite uma maior aeração do substrato. Um fato interessante observado foi a formação de cogumelos a partir de orifícios existentes nos sacos para eliminação do excesso de umidade.



Figura 45 – Produção de cogumelos de *Panaeolus cyanescens* em sacos de mudas de plantas florestais com cobertura de vermiculita.

Testes realizados em 2023

Os novos testes em 2023 iniciaram com a produção de Spawn em frascos Erlenmeyer e em sacos plásticos pequenos, fechado com plug de algodão. A produção foi realizada em mistura de grãos de girassol, arroz e quirela de milho (Figura 46) devidamente esterilizados em autoclave.



Figura 46 – Produção Spawn em sacos plásticos e erlenmeyers contendo mistura de grãos de arroz, milho e girassol.

Os grãos, após totalmente colonizados, apresentaram crescimento cotonoso de coloração branca. Estes foram então depositados no interior de sacos plásticos contendo substrato composto por esterco bovino, húmus de minhoca e serragem de eucalipto. Os substratos também receberam uma colher de carbonato de cálcio. A grande variação desta nova metodologia foi que os sacos com substrato, após inoculação com o Spawn, não sofreram homogeneização. Outra variação significativa foi que os casos foram acondicionados dentro de outros sacos de produção de mudas de coloração negra, para evitar entrada de luz e permitir o desenvolvimento do micélio em condições escuras (Figura 47).



Figura 47 – Saco de substrato acondicionado no interior de sacos de mudas para evitar exposição à luz do micélio.

O crescimento do fungo nestes sacos com substrato foi muito bom, com alta produção de micélio de coloração esbranquiçada (Figura 48). Os sacos foram então abertura em sua

parte superior, e um anel de plástico foi posicionado de modo a manter o saco aberto para uma possível emergência dos cogumelos (Figura 49). Os sacos foram acondicionados em ambiente de laboratório a 25°C e 12 horas de luz.



Figura 48 – Crescimento micelial do *Psilocybe cubensis* em sacos de plástico com o substrato em condições de ausência de luz, após 25 dias.



Figura 49 – Sacos com *Psilocybe cubensis* abertos para emergência dos cogumelos.

Apesar do crescimento micelial ter sido muito satisfatório, não houve produção significativa de cogumelos com exceção de poucos cogumelos pequenos de *Panaeolus*. Os sacos plásticos não permitem que a água saia e, portanto, acabam por criar uma condição de anaerobiose no meio. Esta condição permite a proliferação de bactérias e causa a morte do fungo pela ausência do oxigênio (Figura 50).



Figura 50 – Fermentação anaeróbica causada pelo excesso de água nos substratos.

Uma outra hipótese testada foi a possibilidade de produção de cogumelos a partir unicamente do Spawn produzido em grãos. O micélio foi produzido em grãos no interior de pequenos sacos plásticos fechados com plug de algodão. Após completa colonização os sacos foram abertos, aspergidos com água e submetidos a 12 horas diárias de luz fluorescente (Figura 51).



Figura 51 – Sacos com Spawn abertos sob a luz.

Não houve produção de cogumelos ou mesmo maior crescimento de micélio nos sacos abertos. A inconstância da umidade provocou a morte do fungo.

Nova hipótese testada foi o envolvimento do micélio produzido em pano de juta, visando aumentar o fluxo de ar em toda a superfície do micélio. O substrato colonizado foi retirado do saco de cultivo e envolto em pano de juta como uma bala de coco (Figura 51). As extremidades foram amarradas com barbante, conjunto foi irrigado pelo borrifo de água em sua superfície e submetido a 12 horas de luz diariamente.



Figura 52 – Indução da produção de cogumelos pelo envolvimento do micélio de *Psilocybe cubensis* em sacos de juta.

Apesar do crescimento micelial ter ocorrido, não houve produção de cogumelos, mesmo quando submetidos a condições de alta umidade (envoltos em sacos plásticos). Com o tempo, o micélio começou a escurecer e morreu. Provavelmente este procedimento não é condição necessária para induzir à produção de cogumelos.

Aquisição de novos Genótipos

No começo dos trabalhos com os fungos produtores de psilocibina, foram adquiridas duas espécies (3 linhagens): *Psilocybe cubensis* Cambodian, *Psilocybe cubensis* TKSSS e *Panaeolus cyanescens*. Uma vez que a metodologia testada não permitiu a produção de cogumelos, decidiu-se pela aquisição de novas linhagens ou espécies: *Psilocybe cubensis* M2020, *P. cubensis* Ecuador, *P. cubensis* BAPE e *Psilocybe galindoi* em 6 de outubro de 2022.

Os fungos foram repicados em placas de plástico contendo meio BDA. A placa originária da colônia original recebeu a denominação de R1. As recentes repicagens a partir desta receberam as denominações de R2 e R3. Não foram utilizadas repicagens superiores a R3.



Figura 53 – Aquisição de novas linhagens do fungo *Psilocybe*.

A produção de Spawn e micélio destes novos fungos seguiram a mesma metodologia realizada para os isolados TKSSS e para o fungo *Panaeolus cyanescens*. No entanto, agora decidiu-se por manter os sacos de substrato posicionados de forma horizontal, aumentando a área de contato do substrato com o oxigênio presente no saco plástico (Figura 54).



Figura 54 – Novo posicionamento dos sacos para crescimento micelial dos fungos.

Reunião com a Lambert Spawn

Foi realizada reunião entre o pesquisador do projeto da Emerald (Robinson Luiz Pitelli) e a equipe da Lambert Sapwn, representada pela Dra. Christine Smith.

A reunião foi dividida em duas partes. Na primeira parte participaram Jim DeMesa, Rick McIntyre, Leo, Christine Smith, Jeff Cretty, Gaetano Morelo, Jeremy Baker e o pesquisador brasileiro Robinson Luiz Pitelli. Na segunda parte participaram somente a Dra Christine e Robinson para discussão de assuntos técnicos.

Dentre os pontos discutidos destacam-se os seguintes:

- Aumentar a presença de compostos ricos em energia nos substratos, como o melão de cano ou açúcar mascavo;
- Produção de um fluxograma apresentando as etapas e procedimentos realizados no laboratório para produção dos fungos;
- Emissão de um relatório de atividades bi-semanal.

Um novo substrato foi elaborado contendo como constituintes: bagaço de cana, húmus de minhoca, açúcar mascavo e água. A produção de Spawn também sofre alteração em seu substrato, o qual agora contém grãos de arroz, girassol, milho e aveia. A umidade foi mantida a 60% (p/p).

Meios de cultivo líquido também foram confeccionados para avaliar a produção de micélio dos fungos e permitir a análise de sua concentração de psilocibina. Esta metodologia é

essencial, uma vez que fica praticamente impossível avaliar estes compostos em presença de fragmentos de meio ou sementes.

Uma vez que não foi adquirido até o momento um agitador de meio (mesa agitadora) o experimento foi realizado com cultivo em meio líquido sem agitação. Apesar de permitir o crescimento, a falta da correta oxigenação do meio impede um bom desenvolvimento micelial. O crescimento do micélio foi expressivo, mesmo sem a agitação necessária.

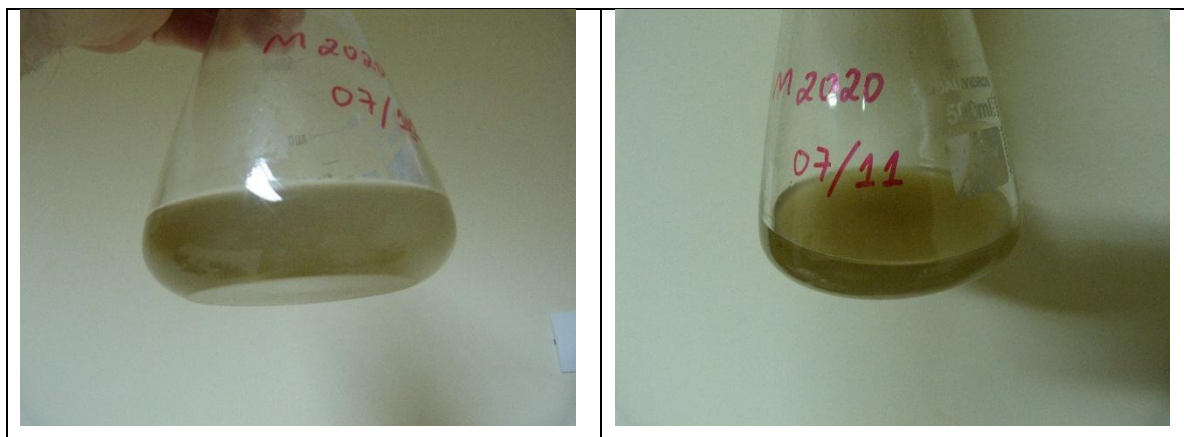


Figura 55 – Meio líquido composto com açúcar mascavo.

O micélio foi coletado em peneiras plásticas descartando-se o excesso de meio. O micélio coletado foi depositado sobre papel filtro para retirar excesso de umidade e posteriormente pesado em balança digital. Os dados de produção para cada 100 mL de meio estão apresentados na tabela abaixo.

Tabela 02 – Peso fresco de micélio de *Psilocybe cubensis* e *P. galindoi* produzidos em meio líquido.

Fungo	Peso fresco do micélio (g) por 100 mL
<i>P. cubensis</i> M2020	8,26
<i>P. cubensis</i> M2020	7,24
<i>P. galindoi</i>	7,69
<i>P. galindoi</i>	3,05
<i>P. cubensis</i> BAPE	5,71
<i>P. cubensis</i> BAPE	6,33
<i>P. cubensis</i> Ecuador	6,55
Fungos	Peso fresco (g) em 700 mL
Total	44,83 g

A produção de micélio em meio líquido também foi testada em condições de placas de plástico. O meio líquido foi vertido nas placas e deixado esfriar dentro da câmara de fluxo laminar. Após resfriado, um disco de micélio de 0,9 cm foi depositado na parte central da superfície do meio. O mesmo foi deixado dentro da câmara de fluxo para crescimento micelial.

O micélio produzido foi retirado com auxílio de uma espátula ou alça de platina e depositado em um papel filtro para retirada do excesso de umidade (Figura 56). O material foi pesado em seguida. Cada placa contém um volume de meio aproximado de 22,7 mL. Os resultados estão apresentados na tabela a seguir.

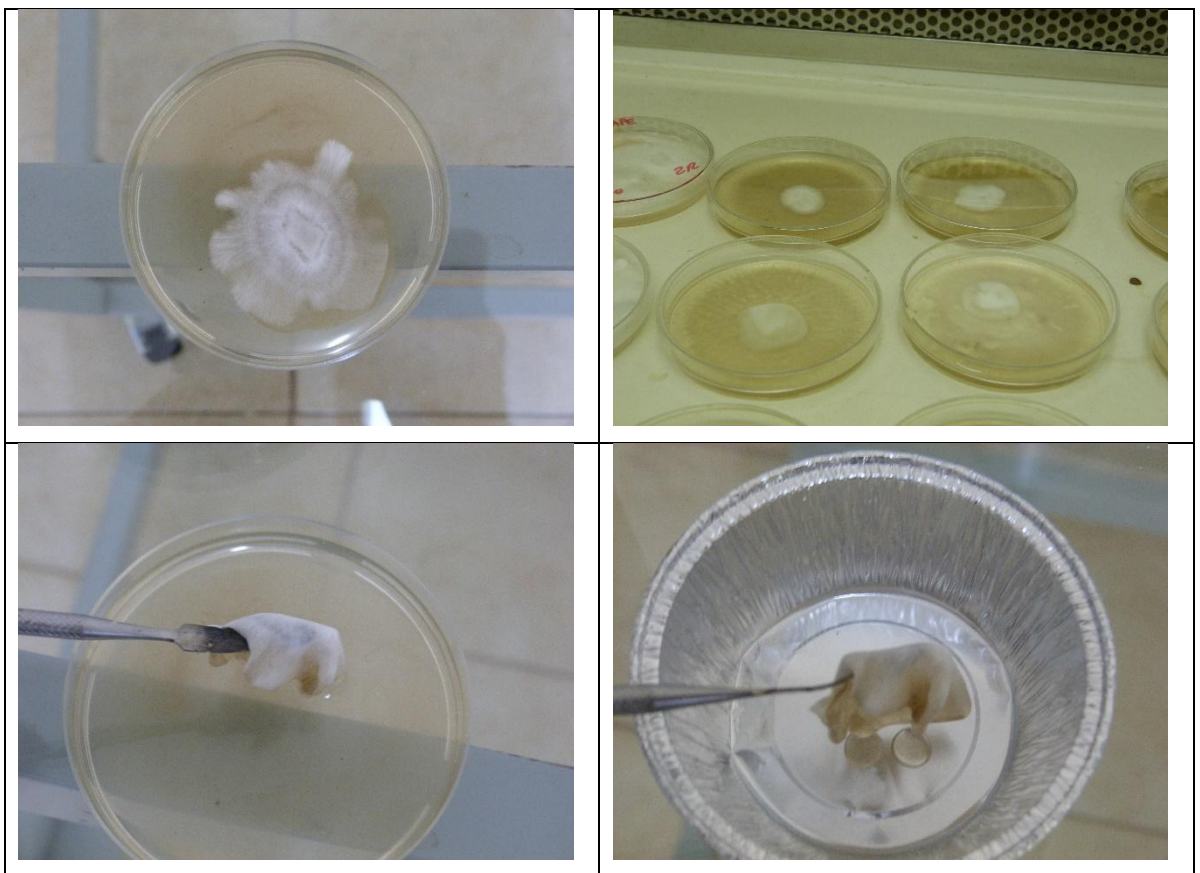


Figura 56 – *Psilocybe cubensis* produzido em placas contendo meio líquido.

Tabela 02 – Peso fresco (g) de micélio produzido em meio líquido no interior de placas de plástico.

Fungo	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 4	Total
<i>P. cubensis</i> BAPE	1,54	1,35	1,37	1,25	5,49
<i>P. cubensis</i> Ecuador	2,22	1,45	1,75	1,62	7,04
<i>P. cubensis</i> Cambodian	1,88	2,15	1,63	-	5,66

Extrapolando para um volume previsto de 1000 mL de meio de cultura, os fungos *P. cubensis* BAPE e fungos *P. cubensis* Ecuador produziram quantidades de micélio equivalentes a 60,4 (até 62,3) g e 77,5 g, respectivamente.

Novos Testes com Cobertura (*Casing*)

Neste caso, os fungos após colonizar o substrato no interior dos sacos plásticos, foram acondicionadas em pratos de alumínio e cobertos com diferentes tipos de substâncias. O termo utilizado para descrever as substâncias que cobrem o micélio é *CASING*. Os materiais utilizados como casing foram: *Sphagnum*, casca de arroz, feno de Coast Cross, fibra de coco e serragem de eucalipto (Figura 57).

A serragem é uma ótima cobertura pois permite a passagem de ar e não forma uma barreira física à emergência do cogumelo. No entanto este material provoca a atração de insetos que podem contaminar o produto.

A serragem é muito fácil de dispor sobre o substrato e não representa barreira física. Pode vir a ser uma barreira luminosa se colocada em maiores quantidades. A fibra de coco apresenta os mesmos problemas discutidos para a serragem, mas sua disposição sobre o substrato é difícil.

O *Sphagnum* forma uma barreira mecânica e luminosa ao crescimento do fungo e emissão de cogumelos. Sua capacidade de absorção de água também provoca dificuldade na passagem do ar, o que ocasiona áreas de anaerobiose, causando a morte do fungo. A casca de arroz, além de apresentar-se como barreira luminosa ao fungo, é relatada como tendo efeitos antifúngicos principalmente quando carbonizada.



Figura 57 – Tipos de “casing” utilizados na cobertura do substrato colonizado por *Psilocybe cubensis*.

As figuras abaixo apresentam os resultados obtidos com o uso das coberturas de feno de capim, fibra de coco e serragem. As coberturas de casca de arroz e *Sphagnum* não promoveram qualquer resultado positivo com relação à emissão de cogumelos.



Figura 58 – Cogumelos de *P. cubensis* Ecuador (esquerda) e BAPE (direita) formados em substratos contendo coberturas de fibra de coco e feno de capim.

No total, os cogumelos produziram uma massa de 19,3 g, os quais foram macerados em nitrogênio líquido, armazenados em freezer a -20°C e, posteriormente, encaminhados ao laboratório do NUPAM em Botucatu (UNESP) para adequação dos métodos de análise dos teores de psilocibina (Figura 59).



Figura 59 – Coleta e maceração em nitrogênio líquido dos cogumelos produzidos.

Nova reunião com a Lambert Spawn

Nova reunião foi marcada com a Dra Christine Smith da Lambert Spawn. O objetivo foi discutir métodos de produção de cogumelos e micélio de *Psilocybe cubensis*.

Dentre os pontos discutidos, destacam-se os seguintes fatos:

- A umidade do ar deve ser aumentada
- A luz não é necessariamente importante para a produção dos cogumelos
- Os testes com meio líquido devem ser continuados apenas quando o agitador for adquirido

- Que o “casing” deve ser colocado sob o substrato colonizado, de modo que o fungo cresce para baixo

Com as novas informações obtidas através da Dra Christine, uma nova série de experimentos de produção foram iniciados no mês de dezembro.

O Spawn para os novos testes foi produzido em frascos erlenmeyers de 500 ml de capacidade volumétrica preenchidos com substrato composto por grãos de arroz e aveia, quirela de milho e sementes de girassol, regulando a umidade para 60% (p/p). Os meios foram incubados no escuro ate que o micélio cobrisse todos os grãos.

Os grãos colonizados foram então transferidos para sacos contendo meio composto por bagacilho de cana e humus de minhoca (proporção 1:1) e farelo de soja (1 colher), regulando a umidade para 60% (p/p). O fungo colonizou o substrato em 15 dias, evidenciando um micélio de coloração branca sobre o substrato, formando uma massa compacta.

Até o momento estes passos já eram realizados nos experimentos anteriores. No momento da indução a formação dos cogumelos foram realizadas algumas mudanças.

As bandejas de alumínio foram furadas na base e na lateral, num total de 12 furos, os quais permitirão a passagem de ar (Figura 60). Um saco de substrato contendo esterco de gado, humus de minhoca foi autoclavado por 20 minutos a 120°C e 1 atm de pressão e foi depositado na base das bandejas (Figura 60). Sobre o substrato foi depositado o micélio produzido nos sacos contendo o substrato, sendo espalhado sobre a superfície do substrato da bandeja. No momento da deposição do Spawn, este foi quebrado em diversos pedaços pequenos e espalhados sobre a superfície do substrato.





Figura 60 – Etapas do processo de indução de formação de cogumelos.

As bandejas receberam mais uma pequena quantidade do substrato puro o qual foi depositado sobre o micélio do fungo. As bandejas receberam água suficiente para manter o composto e o micélio do fungo em uma condição boa de umidade (avaliação visual). As bandejas (já com umidade adequada) foram pesadas e seu peso anotado em plaquetas plásticas colocadas junto ao micélio em crescimento. A irrigação dos fungos era realizada diariamente colocando a bandeja sobre uma balança e completando o peso original com água. Dessa forma evitou-se o excesso de água que causou a morte do micélio no experimento anterior.

As bandejas foram incubadas em laboratório a temperatura média de 25°C e sem incidência direta de luz (Figura 61).



Figura 61 – Bandejas incubadas no escuro para desenvolvimento micelial.

Após o crescimento micelial do fungo nas bandejas, o que pode ser observado pelo desenvolvimento de micélio sobre os aglomerados de material orgânico, uma camada fina de serragem ou chips de coco (pedaços + fibra fragmentada) esterilizada foi colocada sobre a superfície do substrato colonizado (Figura 62). O objetivo desta camada é induzir a formação dos cogumelos. A partir deste momento a irrigação das bandejas é realizada a olho, ou seja, sem o controle da balança. Isso foi necessário devido ao peso diferencial do material de cobertura quando molhado e à diferente absorção de água pelo substrato devido o crescimento micelial (conforme discutido anteriormente). As bandejas são então submetidas a 12 horas de luz diária por meio de duas lâmpadas fluorescentes.





Figura 62 – “Casing” formado por serragem e chips de coco colocados sobre o micélio do fungo e submetidas a 12 horas de luz por dia.

Aos 21 dias após a disposição do substrato colonizado na bandeja (7 dias após o “casing”), foi iniciada a emissão de um único cogumelo na bandeja colonizada pelo isolado *Psilocybe cubensis* M2020 em uma única bandeja. No dia seguinte novo cogumelo da mesma linhagem foi produzido, enquanto que as demais bandejas não produziram qualquer evidência de cogumelos (Figura 63).

Quando um bom stand de cogumelos foi produzido, estes foram enviados ao laboratório do NUPAM (FCA/UNESP) em Botucatu, para análise dos teores de psilocibina e psilocina. Os cogumelos foram enviados ainda no substrato, sendo sua coleta realizada no local da análise.





Figura 63 – Cogumelos do isolado *P. cubensis* M2020 formados nas bandejas com “casing” de chips de coco e serragem.

Conforme pode ser observado na figura acima, os cogumelos foram entregues em diferentes estádios de desenvolvimento, variando do início de sua emissão até seu período de senescência e liberação dos esporos. Este fato deve-se ao caráter intermitente de emissão de cogumelos, requerendo a utilização de uma técnica de conservação para que estes possam sempre ser coletados na melhor época, ou seja, na abertura do píleo.

Os testes realizados foram semelhantes aos realizados em dezembro, com uma única alteração: o substrato colonizado, ao ser depositado nas bandejas contendo substrato novo na base, não foi fragmentado. Isso significa que o substrato colonizado foi depositado em aglomerados grandes sendo, no máximo, dividido em três ou quatro fragmentos grandes. Sobre os aglomerados uma fina camada de substrato foi depositada de forma manter o teor de umidade do micélio. O objetivo desta nova abordagem foi identificar se o micélio não fragmentado coloniza igualmente o substrato e induz mais rapidamente a formação dos

cogumelos. O único inconveniente é que os aglomerados de micélio acabam por saltar na superfície do substrato, o que pode facilitar sua secagem.



Figura 64 – Utilização de aglomerados de micélio dos fungos para mistura com substrato nas bandejas de produção de cogumelos.

O crescimento do fungo, sem a presença da camada de cobertura (“casing”) promove o crescimento de fungos oportunistas, como a *Trichoderma* e *Penicillium*, os quais interferem no desenvolvimento micelial do *Psilocybe*. O ideal é depositar a camada de cobertura logo após o condicionamento do micélio nas bandejas ou vasos. Outro fator que dificulta nesta técnica é que o micélio perde umidade muito rápido, o que impede um bom desenvolvimento micelial. A cobertura passa então a ser indispensável na produção deste cogumelo.

PARTE 03 – Testes com meio líquido

Um equipamento fundamental para as pesquisas foi a mesa agitadora adquirida pela Fepaf junto à empresa Tecnal para o projeto da Emerald (Figura 65). A mesa agitadora tem por objetivo a produção de micélio dos fungos do gênero *Psilocybe*, visando a extração de psilocibina e psilocina.

No primeiro experimento foram utilizados 9 frascos de 500 ml de capacidade volumétrica. Cada frasco receberá uma quantidade de 100 mL de meio líquido, os quais serão autoclavados a 120°C e 1 atm de pressão, por 20 minutos.

No primeiro experimento serão testados três isolados para um mesmo meio de cultura. Inicialmente foi utilizado um meio composto por: açúcar mascavo, esterco de gado e água.

Cinco gramas de açúcar mascavo foram fervidos em 450 ml de água. Após a fervura o líquido foi filtrado e depositado em um béquer (líquido 01). Cinco gramas de esterco bovino seco também foram fervidos em 450 ml de água e coados (líquido 02). Cada Erlenmeyer com capacidade volumétrica de 500 ml recebeu 50 ml do líquido 1 e 50 ml do líquido 2. Os frascos foram autoclavados a 120°C e 1 atm de pressão por 20 minutos.

Os frascos foram inoculados com fragmentos de micélio do fungo produzidos em meio BDA e incubados sob condições de laboratório sem luminosidade por 5 dias, sob agitação constante.



Figura 65 – Frascos em agitação na mesa agitadora.

Devido à forma de inoculação dos meios líquidos (poucos fragmentos grandes de micélio) e à baixa concentração de nutrientes e carboidratos do meio, o crescimento do fungo foi muito baixo após 4 dias.

Desta forma, o fungo foi descartado e novos meios foram produzidos com maiores teores de carboidratos.

Os novos meios produzidos foram:

- Meio 01: 5 g de açúcar mascavo, 50 ml de água de batata (200 g/L) e 50 ml de água de arroz (100 g/L)
- Meio 02: 5 g de açúcar mascavo, 100 ml de água de batata (200 g/L) e 100 ml de água de arroz (100 g/L)
- Meio 03: 5 g de açúcar mascavo, 200 ml de água de arroz (100 g/L)

Os frascos foram autoclavados a 120°C e 1 atm de pressão por 20 minutos.

A inoculação dos meios será realizada mediante a raspagem de placas com água esterilizada e depois vertendo o sobrenadante nos frascos erlenmeyers contendo os meios de cultura.

O crescimento observado em 3 dias ainda foi pequeno, necessitando de mais dias de incubação para proporcionar uma biomassa adequada para análise. Provavelmente a técnica de inoculação dos meios seja responsável pelo crescimento lento, ou seja, a densidade de inóculo inicial foi baixa. No entanto não foi observada contaminação com bactérias ou outros fungos, o que garante uma boa qualidade da técnica de inoculação.

PARTE 04 – Testes com casa-de-vegetação

Uma nova etapa da produção de cogumelos são os testes em casa-de-vegetação. A casa-de-vegetação apresenta um ambiente menos controlado que o laboratório, com maiores alternâncias de luminosidade e temperatura ao longo do dia (período de 24 horas). Estas alterações são essenciais para alguns fungos iniciarem a produção dos primórdios de basidiocarpo, assim como para seu desenvolvimento.

As duas primeiras fases do processo, a produção do Spawn e a colonização do substrato, continuarão a ser realizados em condições de laboratório, com as devidas condições de esterilização. A fase final, quando o substrato colonizado é depositado em recipientes próprios e cobertos com substrato e matéria vegetal morta, é que será realizado em casa-de-vegetação climatizada. Nesta fase deverão ser realizados 3 diferentes tratamentos com os isolados de *Psilocybe* escolhidos:

- Tratamento 1 – micélio sem fragmentação, substrato com humus e bagaço de cana, cobertura com serragem + carvão;
- Tratamento 2 – micélio sem fragmentação, substrato com humus e bagaço de cana, cobertura com turfa + terra
- Tratamento 3 – Micélio sem fragmentação, substrato com humus e bagaço de cana, cobertura com serragem + carvão + calcário calcítico
- Tratamento 4 – Micélio sem fragmentação, substrato com humus e bagaço de cana, cobertura com turfa + terra + calcário calcítico

Os experimentos serão realizados com dois isolados de *Psilocybe cubensis*: Ecuador e BAPE. O delineamento será inteiramente casualizado com cinco repetições, totalizando 40 vasos. Os vasos foram mantidos em condições de casa-de-vegetação por 30 dias.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Nichols, D.E., 2020. Psilocybin: from ancient magic to modern medicine. *J Antibiot* 73, 679–686. <https://doi.org/10.1038/s41429-020-0311-8>.
- [2] Cody, J.T. *Handbook of Analytical Separations* (Bogusz, M.J. ed.), 175-201, Elsevier Science B.V, 2008.
- [3] Derosa, G., Maffioli, P., 2013. Alkaloids in the nature: Pharmacological applications in clinical practice of berberine and mate tea. *CTMC* 14, 200–206. <https://doi.org/10.2174/1568026613666131213155252>.
- [4] Tyls, F., Páleníček, T., Horáček, J., 2014. Psilocybin – Summary of knowledge and new perspectives. *European Neuropsychopharmacology* 24, 342–356. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2013.12.006>.
- [5] Hofmann, A., Frey, A., Ott, H., Petrzilka, T., Troxler, F., 1958a. Konstitutionsaufklärung und Synthese von Psilocybin. *Experientia* 14, 397–399. <https://doi.org/10.1007/BF02160424>.
- [6] Hofmann, A., Heim, R., Brack, A., Kobel, H., 1958b. Psilocybin, ein psychotroper Wirkstoff aus dem mexikanischen Rauschpilz *Psilocybe mexicana* Heim. *Experientia* 14, 107–109. <https://doi.org/10.1007/BF02159243>.
- [7] Nichols, D.E., 2004. Hallucinogens. *Pharmacology & Therapeutics* 101, 131–181. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2003.11.002>
- [8] Katzung, B.G., Masters, S.B., Trevor, A.J. *Basic & Clinical Pharmacology*. McGraw-Hill, New York, 2012.

- [9] Ballesteros, S., Ramón, M.F., Iturralde, M.J., Martínez-Arrieta, R. Natural sources of drugs of abuse: magic mushrooms, in: *New research on street drugs* (Cole SM ed), 167–186, Nova Science Publishers, Inc, New York, 2006.
- [10] Eivindvik, K., Rasmussen, K.E., Sund, R.B. 1989. Handling of psilocybin and psilocin by everted sacs of rat jejunum and colon. *Acta Pharm Nord* 1, 295–302.
- [11] Hopf, A., Eckert, H. 1974. Distribution patterns of 14-C-psilocin in the brains of various animals. *Activitas nervosa superior* 16, 64–66.
- [12] Horita, A., Weber, L.J. 1961. The enzymic dephosphorylation and oxidation of psilocybin and psilocin by mammalian tissue homogenates. *Biochemical pharmacology* 7, 47–54.
- [13] Horita, A., Weber, L.J. 1962. Dephosphorylation of psilocybin in the intact mouse. *Toxicology and applied pharmacology* 4, 730–737.
- [14] Hasler, F., Bourquin, D., Brenneisen, R., Bär, T., Vollenweider, F.X., 1997. Determination of psilocin and 4-hydroxyindole-3-acetic acid in plasma by HPLC-ECD and pharmacokinetic profiles of oral and intravenous psilocybin in man. *Pharmaceutica Acta Helvetiae* 72, 175–184. [https://doi.org/10.1016/S0031-6865\(97\)00014-9](https://doi.org/10.1016/S0031-6865(97)00014-9).
- [15] Passie, T., Seifert, J., Schneider, U., Emrich, H.M., 2002. The pharmacology of psilocybin. *Addiction Biology* 7, 357–364. <https://doi.org/10.1080/1355621021000005937>.
- [16] Vollenweider, F., 1997. Positron Emission Tomography and Fluorodeoxyglucose Studies of Metabolic Hyperfrontality and Psychopathology in the Psilocybin Model of Psychosis. *Neuropsychopharmacology* 16, 357–372. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(96\)00246-1](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(96)00246-1).
- [17] Gouzoulis-Mayfrank, E., Schreckenberger, M., Sabri, O., Arning, C., Thelen, B., Spitzer, M., Kovar, K.A., Hermle, L., Büll, U., Sass, H. 1999. Neurometabolic Effects of Psilocybin, 3,4-Methylenedioxyethylamphetamine (MDE) and d-Methamphetamine in Healthy Volunteers A Double-Blind, Placebo-Controlled PET Study with [18F]FDG. *Neuropsychopharmacology* 20, 565–581. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(98\)00089-X](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(98)00089-X).
- [18] Carhart-Harris, R.L., Erritzoe, D., Williams, T., Stone, J.M., Reed, L.J., Colasanti, A., Tyacke, R.J., Leech, R., Malizia, A.L., Murphy, K., Hobden, P., Evans, J., Feilding, A., Wise, R.G., Nutt,

D.J., 2012a. Neural correlates of the psychedelic state as determined by fMRI studies with psilocybin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 2138–2143. <https://doi.org/10.1073/pnas.1119598109>.

[19] Carhart-Harris, R.L., Leech, R., Williams, T.M., Erritzoe, D., Abbasi, N., Bargiotas, T., Hobden, P., Sharp, D.J., Evans, J., Feilding, A., Wise, R.G., Nutt, D.J., 2012b. Implications for psychedelic-assisted psychotherapy: functional magnetic resonance imaging study with psilocybin. *Br J Psychiatry* 200, 238–244. <https://doi.org/10.1192/bjp.bp.111.103309>.

[20] Petri, G., Expert, P., Turkheimer, F., Carhart-Harris, R., Nutt, D., Hellyer, P.J., Vaccarino, F., 2014. Homological scaffolds of brain functional networks. *J. R. Soc. Interface.* 11, 20140873. <https://doi.org/10.1098/rsif.2014.0873>.

[21] Moreno, F.A., Wiegand, C.B., Taitano, E.K., Delgado, P.L., 2006. Safety, Tolerability, and Efficacy of Psilocybin in 9 Patients With Obsessive-Compulsive Disorder. *J. Clin. Psychiatry* 67, 1735–1740. <https://doi.org/10.4088/JCP.v67n1110>.

[22] Griffiths, R.R., Richards, W.A., McCann, U., Jesse, R., 2006. Psilocybin can occasion mystical-type experiences having substantial and sustained personal meaning and spiritual significance. *Psychopharmacology* 187, 268–283. <https://doi.org/10.1007/s00213-006-0457-5>.

[23] Grob, C.S., Danforth, A.L., Chopra, G.S., Hagerty, M., McKay, C.R., Halberstadt, A.L., Greer, G.R., 2011. Pilot Study of Psilocybin Treatment for Anxiety in Patients With Advanced-Stage Cancer. *Arch Gen Psychiatry* 68, 71. <https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2010.116>.

[24] Johnson, M.W., Garcia-Romeu, A., Cosimano, M.P., Griffiths, R.R., 2014. Pilot study of the 5-HT_{2A} R agonist psilocybin in the treatment of tobacco addiction. *J Psychopharmacol* 28, 983–992. <https://doi.org/10.1177/0269881114548296>.

[25] Griffiths, R.R., Johnson, M.W., Carducci, M.A., Umbricht, A., Richards, W.A., Richards, B.D., Cosimano, M.P., Klinedinst, M.A., 2016. Psilocybin produces substantial and sustained decreases in depression and anxiety in patients with life-threatening cancer: A randomized double-blind trial. *J Psychopharmacol* 30, 1181–1197. <https://doi.org/10.1177/0269881116675513>.

[26] Ross, S., Bossis, A., Guss, J., Agin-Liebes, G., Malone, T., Cohen, B., Mennenga, S.E., Belser, A., Kalliontzi, K., Babb, J., Su, Z., Corby, P., Schmidt, B.L., 2016. Rapid and sustained symptom

reduction following psilocybin treatment for anxiety and depression in patients with life-threatening cancer: a randomized controlled trial. *J Psychopharmacol* 30, 1165–1180.
<https://doi.org/10.1177/0269881116675512>.