

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
DISCIPLINA DE ESTÁGIO CURRICULAR EM FARMÁCIA

AVALIAÇÃO QUIMIOTAXONÔMICA DE COGUMELOS DA
ESPÉCIE *PSILOCYBE WRIGHTII*

Luciana Grazziotin Rossato

Porto Alegre, junho de 2008.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
DISCIPLINA DE ESTÁGIO CURRICULAR EM FARMÁCIA

AVALIAÇÃO QUIMIOTAXONÔMICA DE COGUMELOS DA ESPÉCIE
PSILOCYBE WRIGHTII

Luciana Grazziotin Rossato

Trabalho de Conclusão

da disciplina de Estágio Curricular em Farmácia

Prof. Dra. Renata Pereira Limberger

Orientadora

Doutorando Vagner Gularte Cortez

Co-orientador

Porto Alegre, junho de 2008.

RESUMO:

A psilocibina e a psilocina são alcalóides com estrutura análoga a da serotonina e reconhecida ação alucinógena, produzindo efeitos profundos em humanos, como alucinações visuais e distúrbios sensoriais. Considerando que não há relatos de estudos químicos sobre a espécie *Psilocybe wrightii*, o presente trabalho objetivou avaliar o seu conteúdo alucinógeno. Os espécimes analisados foram coletados na região de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. No local da coleta, o material foi fotografado, e posteriormente analisado segundo suas características macro e microscópicas, a fim de proceder-se a identificação dos mesmos. A extração das psilocinas foi feita por decocção com metanol a 70°C por 30 min. As amostras foram submetidas à triagem por Cromatografia em Camada Delgada (CCD; Metanol:NH₄OH 10:0,25; Iodo platinato de potássio). A confirmação da presença destas substâncias foi feita através de cromatografia em fase gasosa com detector de massas (CG/EM). Uma vez que a quantidade média extraída foi de 500mg, a psilocibina e psilocina foram detectadas numa proporção média de 1,06% (10,6mg/g) e 5,32% (53,2mg/g), respectivamente, em cogumelos secos. Este teor confirma o potencial alucinógeno associado a esta espécie.

Palavras-chave: *Psilocybe wrightii*, psilocibina, psilocina.

AGRADECIMENTOS:

À professora Renata, não só pela orientação nesse trabalho, mas pela confiança, por todas as oportunidades, pelo incentivo e pela amizade. Enfim, por motivar-me a buscar sempre mais e permitir-me este contato tão rico com a toxicologia, ciência que amo.

Ao professor Vagner Gularte Cortez, co-orientador que viabilizou a execução deste trabalho pela disponibilidade e entusiasmo constantes.

Aos meus colegas do Laboratório de Toxicologia Carol, Dani, Débora, Elô, Gabi, Kris, Marcelo, Mari, Paula e também Dona Beatriz e Vivi. A eles agradeço por serem pessoas tão especiais e por todos os bons momentos vividos.

Nesse momento de conclusão de curso, não poderia deixar de mencionar duas pessoas: Etiene e Luciana Mohr. Sou-lhes grata pela amizade sólida que construímos e por tornarem esses quatro anos e meio muito melhores! À Eliká, amiga de longa data, agradeço por estar presente nas minhas melhores lembranças de infância e adolescência e por continuar cultivando a nossa amizade. À Munique agradeço por me entender como ninguém, por todas as nossas conversas e momentos descontraídos. Meninas, nossa amizade transcende elementos como tempo e a distância!

Ao Alexandre pelo amor, companhia, amizade e carinho. Obrigada por ser essa pessoa maravilhosa e por tudo que vivemos.

Agradeço também, todos os dias, a minha família, sempre tão presente. Obrigada pelo apoio, por torcerem por mim e vibrarem comigo a cada conquista. Vocês são os responsáveis pelos melhores finais de semana dos últimos tempos: quando eu volto para casa. Ao meu Pai pelo forte exemplo de caráter, força e determinação; à minha Mãe pelo amor incondicional e por ser esta pessoa que tanto me orgulha, e à minha Irmã pelo companheirismo e amizade.

Por último, registro o meu agradecimento à Universidade Federal do Rio Grande do Sul e à Faculdade de Farmácia pela qualidade de ensino proporcionado e por superar as minhas expectativas quanto a essa Instituição.

Sumário:

Resumo	3
Introdução	6
Objetivos	11
Materiais e Métodos	11
Amostras	11
Identificação	12
Extração	12
Análise Preliminar	12
Análise Confirmatória	13
Resultados	13
Descrição Fúngica	13
Análise Química	15
Discussão e Conclusão	18
Referências	20
ANEXOS.....	26
Artigo.....	28
Instruções para publicação Revista Mycotaxon.....	34

INTRODUÇÃO:

Os cogumelos alucinógenos eram utilizados milenarmente em locais como México, Guatemala e Amazônia, em rituais religiosos e por curandeiros. Em 1957, estes fungos foram descritos cientificamente pela primeira vez por Wasson (1957), e na década de 80 houve uma popularização do uso recreacional entre universitários (Stamets, 1996).

De acordo com a literatura atual, existem cerca de 10000 espécies de cogumelos, sendo que mais de 200 são conhecidas por seu potencial alucinógeno (Guzmán *et. al*, 2000). No Brasil são comumente encontradas espécies de cogumelos alucinógenos pertencentes aos gêneros *Psilocybe*, *Panaeolus* e *Pluteus* caracterizados pela presença de alcalóides indólicos derivados do aminoácido triptofano, especialmente a psilocibina e a psilocina (Figura 1).

A psilocibina (4 – fosforiloxi-N,N-dimetiltriptamina) e seu metabólito psicoativo psilocina (4-hidroxi-N,N-dimetiltriptamina) são alcalóides indolamínicos que possuem reconhecida ação alucinógena. Possuem estrutura análoga a da serotonina (5-hidroxitriptamina), neurotransmissor envolvido na modulação de manifestações comportamentais como a agressividade, a atividade motora, o sono e o apetite. Sendo assim, estes agonistas serotoninérgicos produzem efeitos profundos em humanos, incluindo alucinações visuais e distúrbios sensoriais semelhantes aos sintomas observados em pacientes com síndromes neuropsiquiátricas como a esquizofrenia (Nichols *et al.*, 2002).

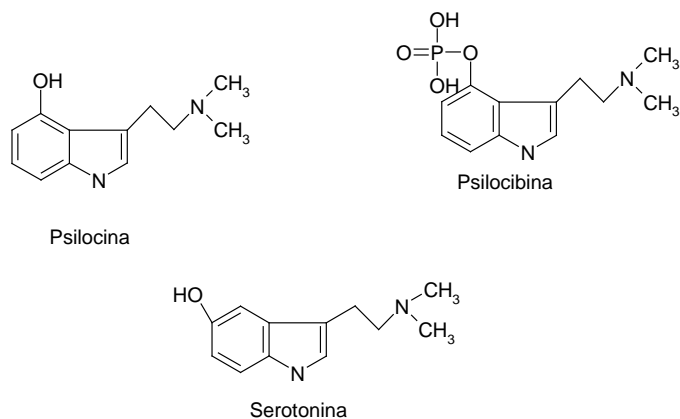


Figura 1: Estruturas químicas da Psilocina, Psilocibina e Serotonina.

Em geral, muitos cogumelos alucinógenos são fungos coprófagos, podendo ser comumente localizados sobre fezes de animais. A época do ano onde são encontrados mais facilmente é no outono, devido à umidade e temperatura amena observadas nesta estação. Algumas espécies, quando manuseadas, apresentam uma mancha roxo-azulada em locais injuriados. Esta coloração é atribuída a uma oxidação enzimática de substratos indólicos como triptofano, serotonina ou psilocibina e é utilizada empiricamente como indicadora da sua atividade alucinógena, embora esta reação também possa ser observada em espécies que não possuem efeitos psicotrópicos.

Do ponto de vista toxicodinâmico, a psilocibina e a psilocina são agonistas serotoninérgicos com atividade predominante sobre os receptores 5-HT₂ (McKenna e Saavedra, 1987). Estes receptores se encontram distribuídos em ampla escala pelo sistema nervoso central, sendo observada alta densidade dos mesmos nos córtices pré-frontal, parietal e somatossensorial (Sanders-Bush e Mayer, 2006). Um experimento realizado por Hasler e colaboradores (2004) demonstrou que a psilocibina aumenta os níveis de dopamina estriatal, produzindo euforia. Apesar de ativar sistemas dopaminérgicos, tais substâncias não produzem dependência. É possível que, em resposta a administração dos alucinógenos, apenas as áreas corticais recebam um acréscimo dopaminérgico, enquanto áreas como o núcleo *acumbens*, envolvido no mecanismo de reforço, não sejam ativadas (Nichols, 2004).

In vivo, a psilocibina é rapidamente desfosforilada em psilocina por fosfatases alcalinas e esterases inespecíficas presentes na mucosa intestinal (Hasler *et al.*, 2002). Dessa forma, alguns autores consideram a psilocibina como um pró-fármaco e a psilocina o verdadeiro agente farmacológico. Esta, por sua vez, é desmetilada e posteriormente oxidada a 4-hidroxi-indol-acetaldeído (4-HIA) por enzimas como as monoamino-oxidases e a aldeído desidrogenase, presentes no fígado (Hasler *et al.*, 1996). O 4-HIA é o intermediário metabólico do ácido 4-hidroxi-indol-3-acético (HIAA). A excreção acontece predominantemente na forma de psilocina-O-glicuronídeo, conforme ilustrado na figura 2 (Passie *et al.*, 2002).

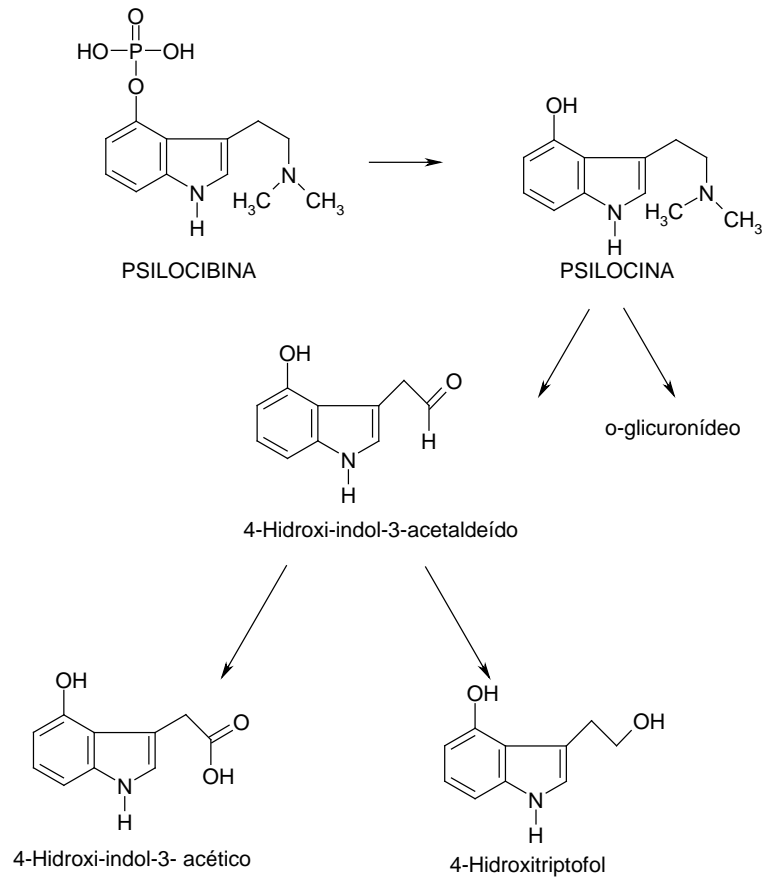


Figura 2: Metabolismo da Psilocibina.

Os sintomas da intoxicação por cogumelos psilocibínicos começam após 20 a 30 minutos da ingestão via oral (Berger e Guss, 2005), atingindo o seu pico em duas horas e decaindo nas três a quatro horas subsequentes (Halpern, 2004). Os efeitos persistem até oito horas depois, quando a maioria dos metabólitos é excretada. Pequenas quantidades dos produtos do seu metabolismo podem ser detectadas após uma semana do uso.

Do ponto de vista legal, a psilocibina e a psilocina fazem parte da Lista de Substâncias Psicotrópicas de uso proscrito no Brasil, assim definidas pela Portaria 344/98 da ANVISA (ANVISA). Porém, o controle destas substâncias é prejudicado pela grande disponibilidade das mesmas, favorecendo o seu uso abusivo. Além disso, o acesso a estas substâncias é facilitado em relação a outros compostos psicotrópicos uma vez que os cogumelos se desenvolvem espontaneamente no solo.

A maior parte das intoxicações por espécies psilocibínicas não são letais. Possuem efeitos similares aos conseguidos com a administração de LSD, porém,

duzentas vezes com menor intensidade. Os sintomas característicos são: alucinações visuais (especialmente com alteração das cores), sinestesia, confusão, desorientação, comportamento inapropriado, labilidade emocional, relaxamento muscular, midríase, taquicardia e respiração rápida (Berger e Guss, 2005). Em crianças, pode haver surgimento de febre e até epilepsia.

O tratamento para intoxicações com triptaminas é similar ao administrado aos pacientes intoxicados por agonistas simpatomiméticos. Benzodiazepínicos são utilizados para tratar a agitação, hipertensão e alucinações (Babu *et al.*, 2005). Fenotiazinas, como tioridazina e clorpromazina, têm sido usadas no manejo de possíveis surtos psicóticos. (Berger e Guss, 2005). No caso de feniletilamina estar presente nos cogumelos contendo psilocibina, pode ocorrer teste de urina falso-positivo para anfetaminas (Berger e Guss, 2005).

Os chamados “cogumelos mágicos” podem ser ingeridos frescos ou secos. Há relatos do uso dos mesmos na forma de chás, sopas, misturadas à carne cozida, ao leite, em mel e em omeletes. A camuflagem destes fungos em chocolate ou mel já foi descrita como uma forma de transportá-los e exportá-los. O mel preserva a potência dos cogumelos de maneira mais eficaz do que quando eles são secos ou congelados, especialmente se colocados em contato com o mel logo após terem sido picados (Musshoff *et al.*, 2000). Contudo, a quantificação da psilocina e psilocibina nestas amostras é prejudicada devido à dificuldade em isolar tais componentes (Bogusz *et al.*, 1998).

A ocorrência de *flashbacks* – distúrbios de percepção, como formas geométricas, imagens coloridas, macropsia, micropsia, cores intensificadas e alucinações anos depois da utilização de alucinógenos – ainda não está totalmente esclarecida, mas é frequentemente relatada. Espiard e colaboradores (2005), em um estudo de caso, observaram que estes fenômenos podem ser episódicos, induzidos por stress ou outras substâncias, consideradas “gatilho” e podem aparecer por cinco anos ou mais, após a interrupção do uso. Porém, ainda permanece obscuro o mecanismo que os ocasiona. Muitos estudos observaram que o uso concomitante de outras drogas, como a maconha, pode disparar tais efeitos em determinados indivíduos, funcionando como “co-fatores” (Halpern e Pope, 2003).

Apesar das implicações éticas, alguns autores defendem a exploração do potencial terapêutico das substâncias alucinógenas. McKenna, em publicação na revista *Behavioural Brain Research*, advoga que compostos alucinógenos podem ser alternativas eficazes para atenuar as causas e os sintomas de distúrbios psicológicos (McKenna, 1996). Como um exemplo de possível alvo terapêutico, cita-se o Transtorno Obsessivo Compulsivo (TOC), uma vez que o sistema serotoninérgico tem um importante papel neste transtorno. Dessa forma, substâncias como a psilocibina poderiam ser encaradas como substratos para o seu tratamento (Nichols, 2004). Moreno e colaboradores (2006), em um estudo clínico com nove voluntários com este distúrbio, concluíram ser a psilocibina uma alternativa segura no manejo terapêutico. Os alucinógenos também parecem ter alguma utilidade como agentes para o tratamento de dependentes de drogas como a heroína, mas o seu papel como tal ainda não foi elucidado (Halpern, 2003). Porém, estudos criteriosos são necessários antes que se aprove o uso medicinal de substâncias que, como estas, possuem potencial abusivo e podem ocasionar *flashbacks*.

Etnologicamente, o gênero *Psilocybe* tem grande importância, pois muitas de suas espécies são alucinógenas. Existem atualmente cerca de 150 espécies neurotrópicas desse gênero, distribuídas em todos os continentes, tanto em zonas temperadas quanto tropicais (Guzmán, 2005), das quais cerca de 21 são conhecidas no Brasil (Guzmán e Cortez, 2004). Essas espécies caracterizam-se pela tonalidade azulada do basidioma, além de gosto e odor farináceos (Guzmán, 1983). A espécie *Psilocybe wrightii* Guzmán foi descrita pela primeira vez em 1978 por Guzmán em coleta na Argentina (Guzmán, 1978) e em 2004 sua ocorrência foi registrada no Rio Grande do Sul por Guzmán e Cortez (2004). Posteriormente, foi encontrada em diferentes regiões do estado, mostrando-se uma espécie relativamente comum (Silva *et. al*, 2006, Silva 2008). Embora se suspeite tratar de uma espécie alucinógena, até o presente momento, não há relatos de análise química comprovando a presença de componentes psicoativos. Em função disso, este estudo visa investigar a presença/ausência de psilocibina e psilocina, bem como estabelecer as quantidades relativas destes alcalóides nos espécimes analisados.

OBJETIVOS:

Cogumelos de diferentes espécies – algumas reconhecidamente neurotrópicas - são constantemente confundidos porque possuem estruturas morfológicas semelhantes. Uma vez que, atualmente, discute-se uma possível separação do gênero *Psilocybe* utilizando como critério a presença de psilocibina e psilocina, (Redhead *et al.* 2007) o presente trabalho visa contribuir com a elucidação química de uma espécie ainda não avaliada. Além disso, como estes alcalóides indólicos são substâncias de uso proscrito no Brasil, o seu controle é prejudicado pela dificuldade de identificação dos cogumelos, constituindo-se num problema forense.

Considerando a disponibilidade, a facilidade de aquisição, o potencial abusivo dos cogumelos alucinógenos e a carência de estudos para determinadas espécies, este trabalho objetivou caracterizar, através de identificação morfológica macro e microscópica e avaliação química, cogumelos da espécie *P. wrightii*.

MATERIAIS E MÉTODOS:

Amostras:

As amostras de *P. wrightii* foram coletadas no município de Santa Maria, região central do Rio Grande do Sul (n=4). Os espécimes cresciam entre gramíneas na borda de uma pequena mata ciliar e foram fotografados no local.

Identificação:

Após a coleta, os espécimes foram analisados seguindo características macro e microscópicas pelo botânico Vagner Gularte Cortez (Guzmán 1983, Stamets 1996). Para a análise microscópica, foram tomadas 25 medidas para cada microestrutura (hifas, basídios, cistídios e basidiósporos), as quais foram ilustradas em câmara-clara acoplada ao microscópio óptico. A identificação dos espécimes foi realizada com o auxílio de literatura especializada (Guzmán 1983) e comparação de material de herbário. As amostras testemunhas do material analisado serão preservadas no herbário do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICN).

Extração:

A extração dos compostos alucinógenos foi realizada através de decocção utilizando-se os cogumelos previamente secos e metanol, em banho-maria (70°C), por 30 minutos.

Análise preliminar:

Após re-suspensão com metanol, as amostras foram submetidas à Cromatografia em Camada Delgada (CCD) para triagem da psilocibina e psilocina empregando placa de sílica gel GF₂₅₄, Metanol:NH₄OH (10:0,25) como fase móvel e Iodo platinato de potássio como agente cromogênico.

Análise Confirmatória:

Para confirmar a presença de psilocinas as amostras foram derivatizadas com N,O-Bis-Trimetilsilil-trifluoracetamida (BSTFA) e submetidas à cromatografia em fase gasosa acoplada a detector de massas (CG/EM), seguindo metodologia adaptada de Keller e colaboradores (1999).

A reação de derivatização foi realizada utilizando-se 50uL do agente silanizador a 140°C por 30 minutos em amostras previamente secas com nitrogênio, segundo metodologia adaptada de Repke e colaboradores (1977).

O equipamento utilizado para estas análises foi um cromatógrafo à gás CG-17A GC/MS – QP5000 (Shimadzu, Tóquio, Japão), equipado com quadrupolo cilíndrico, operando com energia de ionização de 70eV e com injetor com divisor de fluxo (*splitter*), com partição da amostra de 1:50. Hélio foi utilizado como gás de arraste a uma pressão de 80Kpa e velocidade linear de 1mL por minuto. Para a separação dos constituintes foram utilizadas colunas Durabond-DB5 (John Wiley & Sons Scientific, U.S.A), com 30m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno, preenchida com polidimetildifenilsiloxano contendo 5% de grupamentos fenila em filme de 0,25 µm de espessura, e coluna LM-120 (L&M, São Carlos, SP), com as mesmas especificações.

RESULTADOS:

1) Descrição fúngica:

Psilocybe wrightii é freqüentemente encontrada nas margens de pequenos riachos e córregos, sempre próximos à borda de matas ciliares. Os relatos de sua distribuição mundial abrangem coletas na zona subtropical da América do Sul: Argentina (Guzmán, 1983) e Rio Grande do Sul (Guzmán e Cortez, 2004; Silva *et. al*, 2006; Silva, 2008). Uma descrição detalhada dos espécimes coletados é apresentado a seguir:



Figura 3: Cogumelos da espécie *P. wrightii*.(Foto:Vagner G. Cortez)

Píleo 28-49 mm diâm., convexo a aplanado, umbonado, de cor marrom alaranjada a marrom amarelado no centro, alaranjado ou amarelado em direção à margem, que também pode apresentar tons esverdeados, superfície seca, lisa e higrófana, margem estriada e com vestígios azulados de véu apendiculados, contexto esbranquiçado, odor fortemente farináceo. **Lamelas** marrom amareladas a violáceas na maturidade, com a margem esbranquiçada, adnexas, membranosas, próximas. **Estípite** 52-74 x 3-6 mm, central, cilíndrico, com a base ligeiramente alargada, amarelado a marrom avermelhado em sua extensão, exceto na base onde possui cor branca, com tons esverdeados em basidiomas mais velhos e/ou injuriados, superfície esquamulosa, oco. **Véu** formando apêndices membranosos na margem do píleo, de cor azulada ou esverdeada, mas não formando anel no estípite. **Esporada** violácea.

Basidiósporos 7,5-9 x 5,5-6,5 x 5-6 μm , subrombóides em vista frontal, ovóides a subelipsóides em vista lateral, cor marrom amarelado em KOH, de parede espessa e com poro germinativo truncado. **Basídios** 17-23,5 x 6-8,5 μm , ventricosos a subclavados, formando quatro basidiósporos. **Pleurocistídios** 12,5-18,5 x 6-9 μm , fusóides a ventricosos, hialinos, mas com a porção apical ligeiramente escurecida e podendo apresentar conteúdo amarelado em seu interior, parede fina e lisa, pouco abundantes. **Queilocistídios** (13,5-) 19-23,5 (-28) x 3,5-7,5 μm , lageniformes a ventricosos, hialinos, mas com ápice pigmentado, em alguns casos bifurcados, muito numerosos. **Superfície do píleo** formada por hifas filamentosas, ligeiramente gelatinizadas, 2-4 μm diâm., de parede fina, hialinas. **Contexto** subcelular formado por hifas subglobosas, 8,5-31 μm diâm., de parede ligeiramente engrossada e de cor amarelada em KOH. **Trama da lamela** subregular, composta por hifas ligeiramente amareladas, 5-15 μm diâm., de parede fina. **Fibulas** presentes na maioria dos septos.

Material examinado: BRASIL. Rio Grande do Sul. Santa Maria, Três Barras, 14.03.2008, V.G. Cortez 064/08 (ICN).

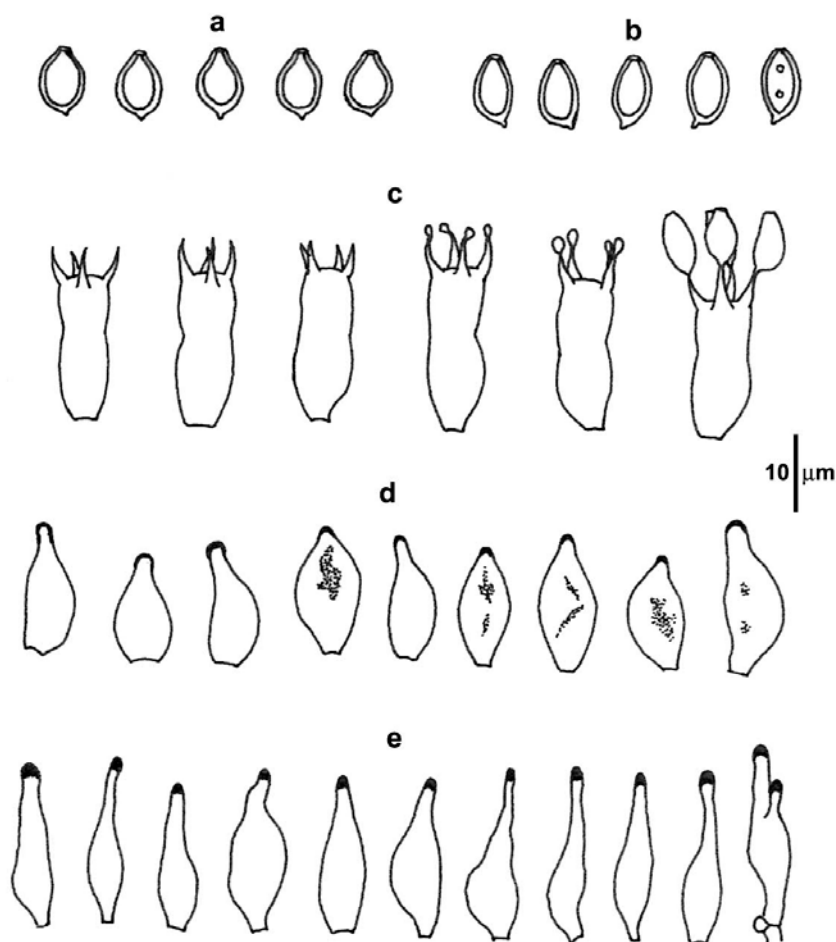


Fig. 4. Microestruturas de *P. wrightii*. a. Basidiósporos em vista frontal. b. Basidiósporos em vista lateral. c. Basídios. d. Pleurocistídios. e. Queilocistídios.

2) Análise química:

Minutos após a coleta, os espécimes apresentaram coloração azulada à esverdeada, própria da reação de oxidação e um indicativo da presença dos substratos alucinógenos alvo desse estudo. Após a extração, todas as amostras avaliadas

demonstraram intensa reação característica com o agente cromogênico na cromatografia em camada delgada.

O cromatograma dos compostos de interesse é mostrado na figura 5, onde é possível visualizar a psilocina e a psilocibina não derivatizadas nos tempos de retenção 10,408 (pico 5) e 10,750 min (pico 6) respectivamente. A identidade destas substâncias pode ser confirmada através do espectro de massas que apresenta suas fragmentações características com os picos m/z 58, 146 e 204 para psilocina e m/z 58, 96 e 284 para psilocibina.

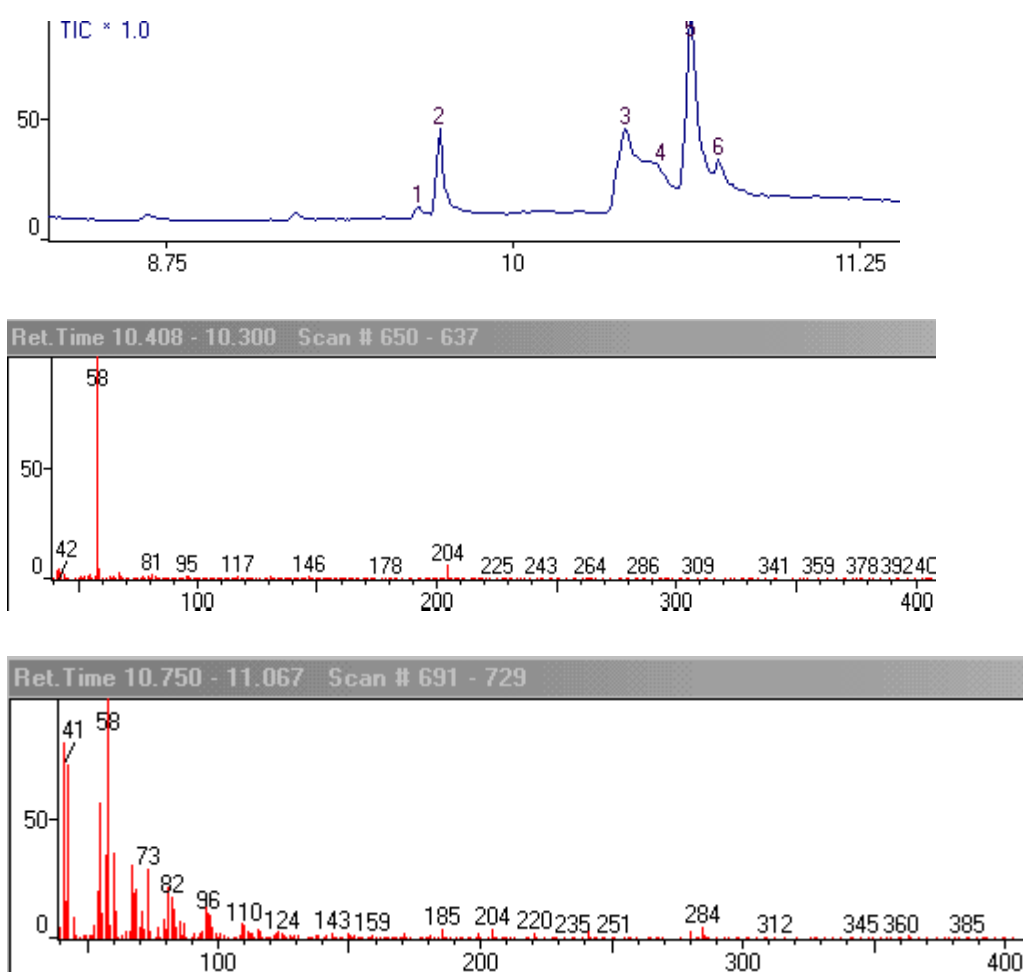


Figura 5: Cromatograma e espectro de massas de amostra de *P. wrightii*.

Um artifício para aumentar a sensibilidade do detector é a derivatização. O reagente utilizado para esta reação foi o BSTFA, um composto que produz derivados através da substituição dos prótons lábeis em compostos polares pelo grupo trimetilsilil (Lanças,

1993). No caso da psilocina e da psilocibina, este grupamento se liga à hidroxila presente na posição 4 e ao hidrogênio ligado ao nitrogênio do anel indólico. Na figura 6, o cromatograma da amostra derivatizada é mostrado. Os tempos de retenção da Bis-trimetilsilil-psilocina e da bis-trimetilsilil-psilocibina são 10,592 (26) e 10,683 (27), respectivamente, e sua identidade é confirmada pelos fragmentos m/z 58, 290 e 348 para Bis-trimetilsilil-psilocina e m/z 58, 189 e 261 para bis-trimetilsilil-psilocibina no espectro de massas.

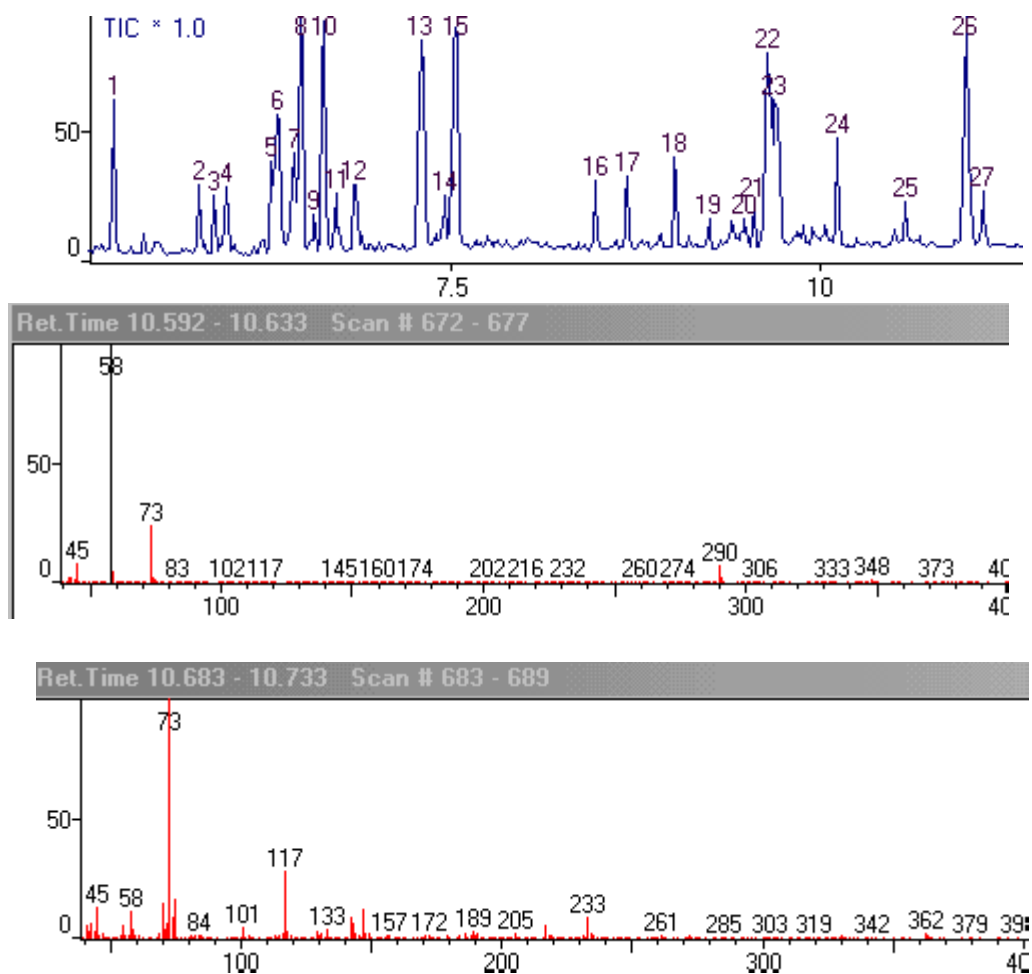


Figura 6: Cromatograma e espectro de massas de amostra derivatizada de *P. wrightii*.

A avaliação da proporção dos compostos alucinógenos foi obtida por normalização e posterior análise gravimétrica. Considerando que a quantidade média extraída dos cogumelos foi de 500mg, a análise gravimétrica demonstrou que a psilocibina e psilocina encontram-se numa proporção média de 1,06% (10,6mg/g) e 5,32% (53,2mg/g) em cogumelos secos da espécie *P. wrightii* (TABELA I).

TABELA I: Proporção de psilocinas em amostras de *P. wrightii* por CG/MS.

Amostra	Quantidade extraída (mg)	Psilocibina (mg/g)	Psilocina (mg/g)
1	390	13,6	38,2
2	510	10,0	49,2
3	700	8,75	59,7
4	400	10,3	65,6

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO:

Através da cromatografia em fase gasosa foi possível detectar a presença de psilocibina e psilocina, confirmadas através da fragmentação característica obtida pelo detector de massas.

A comparação dos espectros da amostra derivatizada com BSTFA e não derivatizada demonstra que esta reação não é fundamental para a determinação destes compostos por esta técnica. Nas análises em que a derivatização é realizada, porém, várias substâncias que não foram eluídas sem esta etapa podem ser observadas, resultando em um cromatograma com picos adicionais em relação ao obtido na figura 5. Segundo Keller e colaboradores (1999) o uso de MSTFA, outro reagente silanizador também utilizado para derivatização, reduz o ruído de fundo, ao contrário do BSTFA. A partir deste dado disponível na literatura, é possível inferir que com o MSTFA o método é otimizado, sendo o reagente de primeira escolha quando ambos estão disponíveis.

Cogumelos são ricos em proteínas e aminoácidos essenciais e tendem a ser livres de gorduras e colesterol, possuindo um baixo índice calórico (Berger e Guss, 2005). Elementos de caráter básico inerentes à sua composição química foram carregados junto com as substâncias de interesse durante o processo extrativo, fornecendo um cromatograma com picos referentes a estes compostos.

No cogumelo *in natura*, a psilocibina está normalmente presente em maior quantidade do que a psilocina em razão do efeito protetor exercido pela fosforilação na posição 4 (Sticht e Käferstein, 2000). Contudo, quando as amostras são submetidas à

cromatografia em fase gasosa, ocorre uma desfosforilação térmica, fazendo com que grande parte da psilocibina seja detectada como psilocina (Keller, *et. al*, 1999).

Diferenças no conteúdo dos alcalóides alucinógenos em cogumelos de mesma espécie são devido a diferenças das condições climáticas a que foram submetidas, da disponibilidade de nitrogênio e fósforo solúveis no solo, bem como do estágio de desenvolvimento do fungo (Tsujikawa *et. al*, 2003).

Esta espécie geralmente apresenta coloração azul a esverdeada, característica da oxidação dos alcalóides alucinógenos, mesmo quando ilesas e *in loco*. Apesar desta reação também ocorrer devido à presença de precursores de serotonina desprovidos de atividade psicotrópica, como o aminoácido triptofano, a frequência e intensidade com que incide nesta espécie pode ser encarada como um indicativo da alta concentração de psilocibina e psilocina.

O método da normalização possui duas limitações críticas: assume que todos os compostos injetados na coluna foram eluídos (o que nem sempre ocorre) e que o detector apresenta a mesma resposta para todos os picos, o que usualmente não é verdadeiro (Lanças, 1993). Os resultados obtidos por gravimetria demonstram que a quantidade de psilocibina e psilocina é superior ao relatado para as demais espécies deste gênero, sugerindo, mais uma vez, o alto potencial psicotrópico que pode estar associado a este espécime. (TABELA II) Contudo, para superar as limitações da avaliação gravimétrica, determinações quantitativas devem ser realizadas utilizando-se padrão externo afim de dimensionar precisamente a concentração de tais substâncias em espécies de *P. wrightii*. Considerando a dificuldade de aquisição do padrão isolado, na primeira etapa deste estudo não foi possível realizar o doseamento dos compostos alucinógenos. Afim de quantificar tais substâncias, pretende-se cultivar os fungos em laboratório para isolamento e concentração das psilocinas.

TABELA II: Teor alucinógeno de demais espécies já avaliadas.

Referência	Espécie analisada	Metodologia	Teor médio psilocibina (mg/g)	Teor médio de psilocina (mg/g)
Keller <i>et al.</i> , 1999	<i>Psilocybe subcubensis</i>	CG/MS	16,6	0,5
Musshoff <i>et al.</i> , 2000	<i>Psilocybe tampanensis</i>	HPLC	0,575	0,225
	<i>Psilocybe cubensis</i>	HPLC	2,55	0,94
	<i>Psilocybe semilanceata</i>	HPLC	3,94	2,25

Considerando que de 4 a 10mg de psilocina é suficiente para causar alucinações (Berger e Guss, 2005), um único cogumelo de *P. wrightii* pode ser suficiente para causar efeitos psicotrópicos.

Recentemente, Redhead *et al.* (2007) propuseram a divisão das espécies de *Psilocybe* em dois gêneros: *Psilocybe*, contendo as espécies psicoativas, e *Deconica* contemplando as demais. Tendo em vista que estudos moleculares nas espécies do gênero *Psilocybe* demonstraram que espécies alucinógenas e não alucinógenas encontram-se em clados distintos (Moncalvo *et al.* 2002), estudos químicos que definam o potencial psicotrópico de espécies ainda não avaliadas, como no caso de *P. wrightii*, são fundamentais para estabelecer sua situação genérica. Considerando, ainda, que os limites do gênero, assim como sua classificação infragenérica permanecem confusos, abordagens não somente morfológicas são necessárias, principalmente em relação às espécies alucinógenas.

REFERÊNCIAS:

BRASIL. Portaria 344, de 12 de maio de 1998. *Aprova o regulamento técnico sobre substâncias e medicamentos sujeitos a controle especial.* Disponível em <<http://e-legis.anvisa.gov.br>>. Acesso em 28 de maio de 2008.

BABU, K.; BOYER, EW.; HERNON, C.; BRUSH, E; Emerging Drugs of Abuse. *Clinical Pediatric Emergency Medicine*, 6:81-84, 2005.

BERGER, KJ.; GUSS, DA.; Micotoxins revisited: part I. *The Journal of Emergency Medicine*, 1:53-62, 2005.

BERGER, KJ.; GUSS, DA.; Micotoxins revisited: part II. *The Journal of Emergency Medicine*, 2:175-183, 2005.

BOGUSZ, MJ.; MAIER, RD.; SCHÄFER, AT.; ERKENS, M.; Honey with *Psilocybe* mushrooms: a revival of a very old preparation on the drug market? *International Journal of Legal Medicine*, 111:147-150, 1998.

ESPIARD, ML.; LECARDEUR, L.; ABADIE, P.; HALBECQ, I., DOLLFUS, S. Hallucinogen persisting perception disorder after psilocybin consumption: a case study. *European Psychiatry*, 20:458-460, 2005

GUZMÁN, G. The species of *Psilocybe* known from Central and South America. *Mycotaxon*, 7:225-255, 1978.

GUZMÁN, G. The genus *Psilocybe*. A systematic revision of the known species including the history, distribution and chemistry of the hallucinogenic species. *Beiheft zur Nova Hedwigia* 439p. 1983.

GUZMÁN, G., ALLEN, J.W.; GARTZ, J.; A worldwide geographical distribution of the neurotropic fungi, an analysis and discussion. *Ann. Mus. Civ. Rovereto, Sc. Nat.* 14: 189-280, 2000.

GUZMÁN, G. Species Diversity of the Genus *Psilocybe* (*Basidiomycotina, Agaricales, Strophariaceae*) in the World Mycobiota, with Special Attention to Hallucinogenic Properties. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 7:305-331, 2005.

GUZMÁN, G.; CORTEZ, V.G.; The Neurotropic *Psilocybe* (Fr.) Kumm. (*Agaricales, Strophariaceae*) in Brazil: a revision of the known species, the First Record of *P.*

wrightii, and the Synonymy of *P. caeruleoannulata*. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 6:383-388, 2004.

HALPERN, JH.; Hallucinogens and dissociative agents naturally growing in the United States. *Pharmacology & Therapeutics*, 102:131-138, 2004.

HALPERN, JH.; POPE, HGJ.; Hallucinogen persisting perception disorder: what do we know after fifty years? *Drug and Alcohol Dependence*, 69:109-119, 2003.

HASLER, F.; BOURQUIN, D.; BRENNEISEN, R.; BÄR, T.; VOLLENWEIDER, FX.; 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, 1996.

HASLER, F.; BOURQUIN, D.; BRENNEISEN, R.; VOLLENWEIDER, FX.; Renal excretion profiles of psilocin following oral administration of psilocybin: a controlled study in man. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis*, 30:331-339, 2002.

HASLER, F.; GRIMBERG, U.; BENZ, MA.; HUBER, T.; VOLLENWEIDER, FX.; Acute psychological and physiological effects of psilocybin in healthy humans: a double blind, placebo-controlled dose-effect study. *Psychopharmacology*, 172:145-156, 2004.

KELLER, T.; SCHNEIDER, A.; REGENSCHEIT, P.; DIRNHOFER, R.; RÜCKER, T.; JASPERS, J.; KISSER, W.; Analysis of psilocybin and psilocin in *Psilocybe subcubensis* GUZMÁN by ion mobility spectrometry and gas chromatography-mass spectrometry. *Forensic Science International*, 99:93-105, 1999.

LANÇAS, FM.; Derivatização. In: LANÇAS, FM. *Cromatografia em Fase Gasosa*, 1 ed. São Carlos:Acta, 1993. p. 185-206

MCKENNA, DJ.; SAAVEDRA, JM.; Autoradiography of LSD and 2,5-dimethoxyphenylisopropylamine psychotomimetics demonstrates regional, specific cross-displacement in the brain. *European Journal of Pharmacology*, 142:347-358, 1987.

MCKENNA, DJ.; Plant hallucinogens: springboards for psychotherapeutic drug discovery. *Behavioural Brain Research*, 73:109-115, 1996.

MONCALVO, J.M., VILGALYS, R., REDHEAD S.A., JOHNSON, J.E., JAMES, T.Y., AIME, M.C., HOFFSTETTER, V., VERDUIN, S.J.W., LARSSON, E., BARONI, T.J., THORN, R.G., JACOBSSON, S., CLÉMENCON, H.; MILLER Jr.. One hundred and seventeen clades of euagarics. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 23: 357-400, 2002.

MORENO, FA.; WIEGAND, CB.; TAITANO, EK.; DELGADO, PL. Safety, tolerability and efficacy of psilocybin in nine patients with obsessive-compulsive disorder. *Journal of Clinical Psychiatry*, 67:1735-1740, 2006.

MUSSHOFF, F.; MADEA, B.; BEIKE, J.; Hallucinogenic mushrooms on the German market – simple instructions for examination and identification. *Forensic Science International*, 113:389-395, 2000.

NICHOLS, CD.; RONESI, J.; PRATT, W.; SANDERS-BUSH, E.; Hallucinogens and *Drosophila*: Linking serotonin receptor activation to behavior. *Neuroscience*, 115:979-984, 2002.

NICHOLS, DE.; Hallucinogens. *Pharmacology and Therapeutics*, 101:131-181, 2004.

PASSIE, T.; SEIFERT, J.; SCHNEIDER, U.; EMERICK, HM. The Pharmacology of psilocybin. *Addiction Biology*, 7:357-364, 2002.

REDHEAD, S.A.; MONCALVO, J.M.; VILGALYS, R.; MATHENY, P.B.; GUZMÁN-DÁVALOS, L. ; GUZMÁN, G. Proposal to conserve the name *Psilocybe* (*Basidiomycota*) with a conserved type. *Taxon* 56: 255-257, 2007.

REPKE, DB.; LESLIE, DT.; MANDELL, NG.; NISH, NG.; GLC-mass spectral analysis of psilocin and psilocybin. *Journal of Pharmaceutical Science*, 66:743-744, 1977.

SANDERS-BUSH, E.; MAYER, SE.; Agonistas e Antagonistas dos receptors de 5-Hidroxitriptamina (serotonina). In: BRUNTON, LL.; LAZO, JS.; PARKER, KL. (Ed). *Goodman e Gilman – As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 11.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2006. p.266-303.

SILVA , P. S.; CORTEZ, V.G.; SILVEIRA, R.M.B.; The mycobiota of Itapuã Park, Rio Grande do Sul, Brazil. I. Species of *Strophariaceae* (*Agaricales*). *Mycotaxon*, 97:219-229, 2006.

SILVA, P.S.; *Espécies de Strophariaceae na Floresta Nacional de São Francisco de Paula, RS, Brasil*. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Dissertação de Mestrado. 111p, 2008.

STAMETS, P.; *Psilocybin mushrooms of the world*. Berkeley: Ten Speed Press. 1996. 245p.

STICHT, G.; KÄFERSTEIN, H.; Detection of psilocin in body fluids. *Forensic Science International*, 113:403-407, 2000.

TSUJIKAWA, K.; KANAMORI, T.; IWATA, Y.; OHMAE, Y.; SUGITA, R.; INOUE, H.; KISHI, T.; Morphological and chemical analysis of magic mushrooms in Japan. *Forensic Science International*, 138:85-90, 2003.

WASSON, RG.; Seeking the magic mushrooms among Mexican Indians. *Life Magazine*, p.100-109, 1957.

ANEXOS

Esta monografia resultou no artigo “Taxonomy and chemistry of the neurotropic mushroom *Psilocybe wrightii* from Brazil” (Anexo I), que será submetido à Revista Mycotaxon (Anexo II).

ANEXO I: Artigo a ser submetido para a Revista Mycotaxon:

Taxonomy and chemical aspects of the hallucinogenic *Psilocybe wrightii* from southern Brazil

LUCIANA G. ROSSATO, VAGNER G. CORTEZ, RENATA P. LIMBERGER

luciana@gratto.com.br, cortezvg@yahoo.com.br, rlrenata@yahoo.com

*Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia
Av. Ipiranga, 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil*

Abstract — *Psilocybe wrightii*, a subtropical species from southern Brazil and northeastern Argentina is confirmed to contain psilocybin and psilocyn. Detailed description of southern Brazilian specimens, chemical analysis using gas chromatography of the basidiomes and discussion of its taxonomy are presented.

Key words — *Agaricales, Psilocybe* sect. *Cordispora*, screening, *Strophariaceae*

Introduction

Species of *Psilocybe* (Fr.) P. Kumm. are the most important hallucinogenic mushrooms in the world (Guzmán 1983, Stamets 1995), comprising about 150 neurotropic species, among 227 taxa worldwide (Guzmán 2005). Most of the so called hallucinogenic species are included in *Psilocybe* sections *Aztecorum* Guzmán, *Brunneocystidiata* Guzmán, *Cordispora* Guzmán, *Cubensis* Guzmán, *Mexicana* Guzmán, *Semilanceata* Guzmán, *Stuntzii* Guzmán, and *Zapotecorum* Guzmán, following infrageneric classification of Guzmán (1995). Many of these species, however, were not chemically studied although they are considered to be neurotropic only due to the bluing feature of the basidiomes when injured or touched. The bluing color is the oxidative reaction of the main toxins involved, the psilocybin and the psilocin (Benedict & Tyler 1967). Studies of molecular systematics has showed that psilocybinic taxa of *Psilocybe* (clade 'Psichedelia' of Moncalvo *et al.* 2002) should be separated from the non-bluing species (Matheny *et al.* 2006), and must to be assigned to *Deconica* W.G. Sm. (Redhead *et al.* 2007).

The *Psilocybe* from Brazilian mycobiota were summarized by Guzmán & Cortez (2004), who reported 29 species, including 21 neurotropic taxa. In the same paper, the authors reported *P. wrightii* Guzmán, a species so far known only from the holotype collected in 1978 in the region of Tucumán, Argentina (Guzmán 1978). This mushroom was found to be common near to small rivers and very humid places in southern Brazil, and produces medium-sized basidiomes with typical features of the bluing species (Silva *et al.* 2006). In order to provide further taxonomic and chemical data on this species, especially regarding the presence of hallucinogenic compounds, this investigation was proposed.

Materials and methods

Samples – Specimens were collected in the municipality of Santa Maria, Rio Grande do Sul State, in southern Brazil. The specimens were photographed *in situ* and collected, then analyzed macro- and microscopically following previously described methods (Guzmán 1983). Color codes are those from Kernerup & Wanscher (1978), abbreviated as KW. Microscopic examination comprised a minimum of 25 microstructures (basidia, basidiospores, cystidia and hyphae), which were drawn with a light tube. The studied collections are preserved at the herbarium ICN (Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul).

Chemical analysis – Hallucinogenic compounds were extracted through decoction using previously dried mushrooms and methanol, 70 ° C for 30 minutes. The detection methods of psilocybin and psilocin include thin layer chromatography employing silicagel GF₂₅₄ and Methanol: NH₄OH (10:0.25) as mobile

phase. Subsequently, the samples were performed by gas-chromatography-mass spectrometry (GC/MS) on a chromatograph (Shimadzu GC-17A) equipped with a fused silica capillary column 30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m, coated with DB-5 and a quadrupole MS system (QP 5000) operating at 70 eV. Injector temperature was set at 250°C. The oven temperature was programmed from 180 °C to 320 °C at 20 °C/min and helium was employed as carrier gas (1 mL/min). The percentage compositions were obtained from electronic integration measurements without taking into account relative response factors. Prior GC analyses, the methanolic extract were submitted to derivatization with BSTFA (N-O-Bis-Trimethylsilyl-trifluoroacetamide) following adapted methods by Keller *et al.* (1999).

Results and discussion

Psilocybe wrightii Guzmán, *Mycotaxon* 7: 251, 1978.

FIGS. 1-6

Pileus 28–49 mm diam., convex to applanate, distinctly umbonate, golden brown (KW 5D8) to yellowish brown (KW 5C7) or light orange (KW 5A4) toward the margin, which can also present greenish tones, surface smooth, dry to moist, and strongly hygrophanous; margin striate and with velar remnants appendiculate; context whitish, becoming blue after a few minutes; odor strongly farinaceous. *Lamellae* adnexed, firstly greyish yellow (KW 4C6) then violet brown (KW 11F8) at maturity, with conspicuously whitish margin, membranous, close. *Stipe* 52–74 × 3–6 mm, central, cylindrical to subclavate, light orange (KW 5A5) to reddish brown (KW 8D6), base white, greenish tones seen in older basidiomes or within a few minutes after injured; surface smooth in the apex becoming squamulose toward the bottom, hollow. *Veil* not forming an annulus on stipe but producing marginal remnants on pileus, which are membranous, first yellowish then bluish to greenish in older specimens. *Spore print* dark purple (KW 14F5).



Fig. 1. Basidiomes of *Psilocybe wrightii*.

Basidiospores 7.5–9 × 5.5–6.5 × 5–6 µm, subrhomboid in face view, ovoid to subellipsoid in side view, yellowish brown in KOH preparations, smooth and thickened walls with a small but truncate germ pore. *Basidia* 17–23.5 × 6–8.5 µm, ventricose to subclavate, producing four basidiospores. *Pleurocystidia* 12.5–18.5 × 6–9 µm, fusoid to ventricose, hyaline, but with the mucronate apex slightly pigmented and sometimes chrysocystidioid due to the presence of small and yellow contents, walls thin and smooth. *Cheilocystidia* (13.5–)19–23.5(–28) × 3.5–7.5 µm, lageniform to ventricose, hyaline, with the pigmented apex, which is forked in some cases, very numerous making the gill edge completely sterile. *Caulocystidia* 20–29.5 × 5–7 µm, mainly clavate, hyaline, with rounded apex, sometimes double, in small clusters on stipe apex. *Pileipellis* an ixocutis formed by filamentous, little gelatinized, 2–4 µm diam. hyphae, hyaline and with smooth and thin walls. *Context* subcellular, formed by subglobose, 8.5–31 µm diam., with yellow and little thickened walls. *Lamella trama* subregular, composed by hyaline to pale yellow hyphae, 5–15 µm diam., with smooth and thin walls. *Stipitipellis* composed by hyaline hyphae, 6–11 µm diam., smooth and thin-walled. *Clamp connections* present in most septa.

Specimens examined: BRAZIL. RIO GRANDE DO SUL STATE: Santa Maria, Três Barras, 14 Mar 2008, V.G. Cortez 064/08 (ICN).

Taxonomic discussion: *Psilocybe wrightii* was described from Argentina (Guzmán 1978) and later reported from southern Brazil (Guzmán & Cortez 2004), where it has been encountered in several localities later (Silva et al. 2006, Silva 2008). The basidiomes grows solitary or gregarious under riparian forests or near to small rivers, in autumn months (April to June). For the size and shape of the basidiospores, presence of pleurocystidia and bluing feature of the basidiomes, Guzmán (1983) placed it on *Psilocybe* Sect. *Cordispora* Guzmán, which is widely represented in the Neotropical area.

Psilocybe heliconiae Guzmán, Saldarr., Pineda, G. García & L.-F. Velazquez, described from Colombia, shares similar features like size and shape of the basidiospores, size and shape of pleurocystidia and cheilocystidia, as well as macroscopic features of the basidiomes (Guzmán *et al.* 1994). This similarity was emphasized by Guzmán *et al.* (1994) and Guzmán & Cortez (2004), but only with the revision of its types this question can be solved.

In addition, *P. farinacea* Rick ex Guzmán differs from *P. wrightii* only by the absence of pleurocystidia in the former (Guzmán 1978). The pleurocystidia of *P. wrightii* are somewhat difficult to observe in dried specimens because they are usually smaller than basidia, but in fresh specimens they are easily found. Since *P. farinacea* is based in older specimen collected by J. Rick, the probable synonymy with *P. wrightii* cannot be fully rejected. Moreover, all the above-cited species are similar to *P. caerulescens* Murrill, which differs by the larger basidiomes and absence of pleurocystidia (Guzmán 1983).

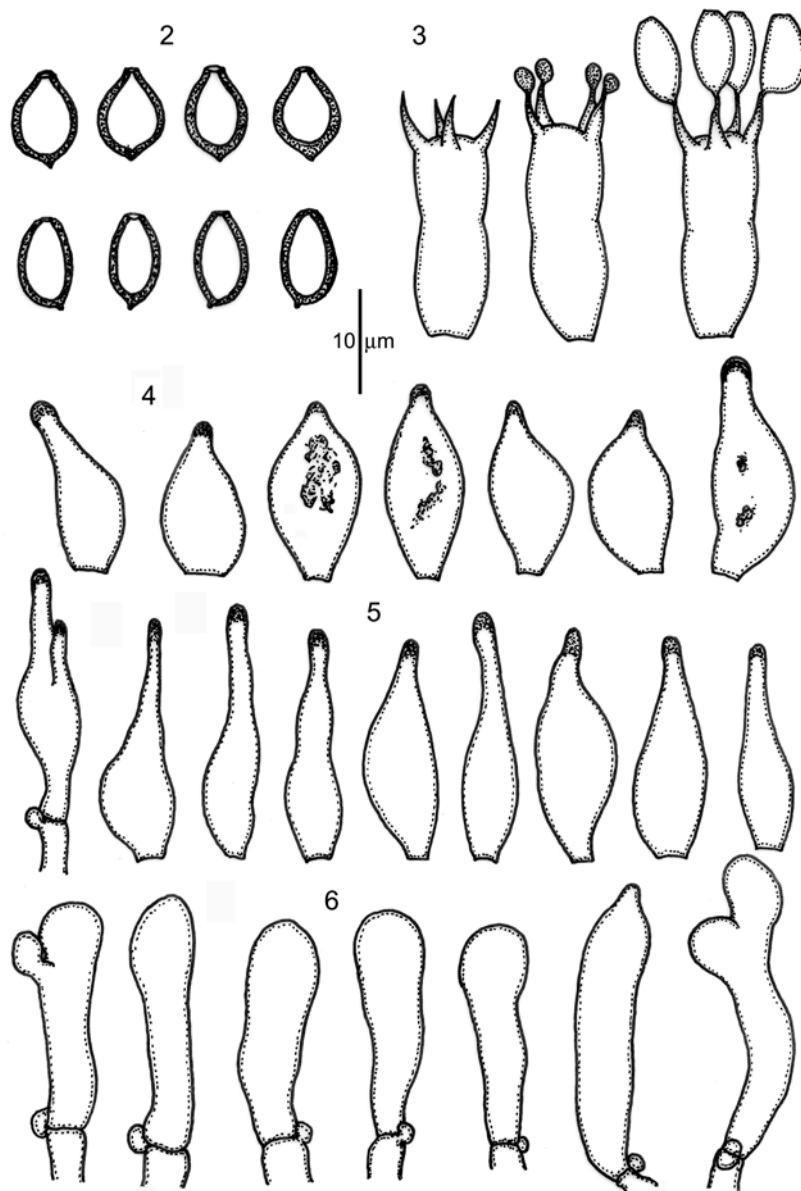


Fig. 2-6. *Psilocybe wrightii*.

2. Basidiospores. 3. Basidia.

4. Pleurocystidia. 5. Cheilocystidia. 6. Caulocystidia.

Chemical analysis: After extraction, all the samples showed intense characteristic reaction with chromogenic agent in thin layer chromatography. Through gas chromatography psilocybin and psilocin were detected. Derivatization allows to increase the detector's sensitivity (Lanças 1993). This reaction was performed with BSTFA, producing bis-trimethyl-silyl-psilocybin and bis-trimethyl-silyl-psilocin, which presents retention time of 10.683 min and 10.592 min respectively. The identity of this derivatives is confirmed by characteristic fragments m/z 58, 189 and 261 for bis-trimethyl-silyl-psilocybin and 58, 290 and 348 for bis-trimethyl-silyl-psilocin.

The proportion of hallucinogenic compounds were obtained by normalization. The average proportion obtained in *P. wrightii* was 1.06% (10.6 mg/g per dry mass) psilocybin and 5.32% (53.2 mg/g per dry mass) psilocin (TABLE I).

Table I: Proportion of psilocybin and psilocin in *P. wrightii* by CG/MS

Sample	Psilocybin (mg/g)	Psilocin (mg/g)
1	13,6	38,2
2	10,0	49,2
3	8,75	59,7
4	10,3	65,6

Differences in the psilocin and psilocybin contents in hallucinogenic mushrooms from the same species depends on factors such as developmental stages, climatic conditions and the availability of soluble nitrogen and phosphorous in the soil (Tsujikawa et. al 2003). Due to thermal dephosphorylation of psilocybin in the inlet system of the gas-chromatograph, psilocybin is converted into psilocin (Keller, *et. al.*, 1999).

However, *in natura*, the content of psilocybin is normally far higher than that of psilocin which does not have the protecting phosphorous ester group in its molecule (Sticht & Käferstein 2000). These results confirm the hallucinogenic potential associated to this species.

Acknowledgements

The authors thank to Dr. Gastón Guzmán (Instituto de Ecología, México) for critical review of the manuscript. CNPq (Brazil) is acknowledged for financial support.

Literature cited

- Benedict RG, Tyler VE. 1967. Blueing in *Conocybe*, *Psilocybe*, and a *Stropharia* species and the detection of psilocybin. *Lloydia* 30: 149-157.
- Guzmán G. 1978. The species of *Psilocybe* known from Central and South America. *Mycotaxon* 7: 225-255.
- Guzmán G. 1983. The genus *Psilocybe*. *Beih Nova Hedw.* 74: 1-439.
- Guzmán G. 1995. Supplement to the monograph of the genus *Psilocybe*. *Bibl. Mycol.* 159: 91-141.
- Guzmán G. 2005. Species diversity of the genus *Psilocybe* (*Basidiomycotina*, *Agaricales*, *Strophariaceae*) in the world mycobiota with special attention to hallucinogenic properties. *Int. J. Med. Mushr.* 7: 305-331.
- Guzmán G, Cortez VG. 2004. The neurotropic *Psilocybe* (Fr.) P. Kumm. (*Strophariaceae*, *Agaricales*) in Brazil: a revision of the known species, the first record of *P. wrightii* and the synonymy of *P. caeruleoannulata*. *Int. J. Med. Mushr.* 6:383-388.
- Guzmán G, Saldarriaga Y, Pineda F, García G, Velázquez LF. 1994. New species of *Psilocybe* from Colombia and discussion on the known species. *Mycotaxon* 51: 225-235.
- Keller T, Schneider A, Regenscheit P, Dirnhofer R, Rücker T, Jaspers J, Kissner W. 1999. Analysis of psilocybin and psilocin in *Psilocybe subcubensis* Guzmán by ion mobility spectrometry and gas chromatography-mass spectrometry. *Forensic Sci. Int.* 99: 93-105.
- Kornerup A, Wanscher JH. 1978. *Methuen Handbook of Colour*. 3rd ed. London: Eyre Methuen.
- Lanças FM. 1993. *Cromatografia em Fase Gasosa*. São Carlos: Acta.
- Matheny PB, Curtis JM, Hofstetter V, Aime MC, Moncalvo JM, Ge ZW, Yang ZL, Slot JC, Ammirati JF, Baroni TJ, Bougher NL, Hughes KW, Lodge DJ, Kerrigan RW, Seidl MT, Aanen DK, DeNitis M, Daniele GM, Desjardin DE, Kropp BR, Norvell LL, Parker A, Vellinga EC, Vilgalys R, Hibbett DS. 2006. Major clades of *Agaricales*: a multilocus phylogenetic review. *Mycologia* 98: 982-995.
- Moncalvo JM, Vilgalys R, Redhead SA, Johnson JE, James TY, Aime MC, Hoffsteitter V, Verduin SJW, Larsson E, Baroni TJ, Thorn RG, Jacobsson S, Cléménçon H, Miller Jr. OK. 2002. One hundred and seventeen clades of euagarics. *Mol. Phylogen. Evol.* 23:357-400.
- Redhead SA, Moncalvo JM, Vilgalys R, Matheny PB, Guzmán-Dávalos L, Guzmán G. 2007. Proposal to conserve the name *Psilocybe* (*Basidiomycota*) with a conserved type. *Taxon* 56: 255-257.
- Silva PS. 2008. *Espécies de Strophariaceae na Floresta Nacional de São Francisco de Paula, RS, Brasil*. Porto Alegre (Brazil): Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Unpublished Msc. Dissertation. 111p.
- Silva PS, Cortez VG, Silveira RMB. 2006. The mycobiota of Itapuã Park, Rio Grande do Sul, Brazil. I. Species of *Strophariaceae* (*Agaricales*). *Mycotaxon* 97: 219-229.

- Stamets P. 1996. *Psilocybin mushrooms of the world*. Berkeley: Ten Speed Press.
- Sticht G, Käferstein H. 2000. Detection of psilocin in body fluids. *Forensic Sci. Int.* 113: 403-407.
- Stijve T, Meijer AAR. 1993. Macromycetes from the state of Paraná. 4. The psychoactive species. *Arq. Bras. Biol. Technol.* 36: 313-329.
- Tsujikawa K, Kanamori T, Iwata Y, Ohmae Y, Sugita R, Inoue H, Kishi T. 2003. Morphological and chemical analysis of magic mushrooms in Japan. *Forensic Sci. Int.* 138: 85-90.

ANEXO II: Normas para Publicação na Revista Mycotaxon

MYCOTAXON

Instructions for Authors

(Updated November, 2007)

Mycotaxon is an international mycological journal devoted to research on the taxonomy and nomenclature of fungi. Publication is open to everyone. Authors are responsible for obtaining *peer reviews* from experts in the field prior to pre-submission of their manuscripts to the **Nomenclature** and **French Language Editors**. The **Editor-in-Chief** reviews all expert peer reviews, pre-submission recommendations, and author submissions. **Sheridan Press** prints the digital files prepared by the *Editor-in-Chief* from accepted manuscript files, distributes volumes to subscribers, and handles reprints.

Subscriptions, author invoices, and payments are handled by the **Business Manager**. Mycotaxon is indexed by the *Index Editor*. The *Webmaster* oversees the **Mycotaxon** website.

What is suitable for publication in MYCOTAXON?

Mycotaxon is restricted to papers on the **taxonomy and nomenclature of fungi**. We intend this broadly to include monographic works, reviews of taxonomic groups and/or taxonomic criteria, arguments dealing with specific nomenclatural problems, proceedings of symposia on taxonomic or nomenclatural matters, and well-documented floras. Papers that deal with other mycological disciplines (cytology, ecology, genetics, phylogenetics, physiology, etc.) should be submitted to another journal unless their *primary focus* is taxonomic. Prospective authors are invited to send a draft to the *Editor-in-Chief* if they have doubt the suitability of their manuscripts for publication in the journal.

Articles may be of any length. Most authors pay no page charges, although sole/senior authors who exceed 100 pages per year may be charged \$18 per excess page. Authors are granted two halftone plates for every ten (10) text pages (11-20 text pages qualify for 4 halftones, 21-30 pages for 6

halftones, etc.). Fees are \$20 for each excess halftone plate. Black & white line drawings, phylotrees, graphs, and tables are not considered halftones and count as text in assessing page charges. Color processing fees are \$475 per color plate. There are also fees for digitizing original artwork, converting non-standard graphics files to tif or eps format, and correcting author errors in pdf proofs.

Mycotaxon reserves the right to reject papers of questionable taxonomic merit or those that do not meet criteria listed in the following instructions. Manuscripts are reviewed in the order received and acknowledged within two weeks of receipt. (As acknowledgments usually slow during field season or at press time, submitters are asked to wait at least 14 days before sending a letter of inquiry regarding receipt of final submissions.) The *Book Review Editor* coordinates reviews of recently published books and journals. The *French Language Editor* reviews papers written in French. The *Nomenclature Editor* assigns permanent accession numbers and reviews nomenclature of all submitted text documents. The *Editor-in-Chief* dictates editorial policy and styles, receives and reviews all final submissions, converts files into pdf press proofs, and sends proofs to authors for final approval, correcting errors prior to publication, and selects the cover illustration for each volume from among submitted drawings.

Preparing text files

Authors must prepare concise, well-formatted, error-free copy that accurately conveys the author's ideas with an economy of space. Articles may be written in either English or French. Authors submitting copy in English should apply uniform spelling and grammatical conventions (either American or British, but not a mixture of both) throughout the manuscript.

Digital submission is encouraged, with MSWord® text files and Adobe Photoshop® graphics files preferred. The [Digital Art pdf](#) prepared by Mycotaxon's printer, Sheridan Press, explains how to prepare illustrations for publication. Sheridan Press also permits authors to submit up to 3 digital tif files to '[Digital Expert](#)' for free diagnosis of potential problems prior to submission. Authors wishing to prepare their own press pdf files must contact the *Editor-in-Chief* for special instructions and pre-flight their pdf with [Sheridan Press](#) before

final submission. Authors are welcome to submit pdfs for the purpose of guiding figure placement to the *Editor-in-Chief* without Press approval.

Hard-copy submission is still accepted, but authors are asked to consult with the *Editor-in-Chief* for additional guidance before submission. Mycotaxon now charges a \$5 per page/illustration scanning fee to digitize hard copy and is unable to scan artwork larger than 23 × 31 cm (9" × 12").

Text must conform to the following specifications

Note: Title, author address, abstract, key words, body text, figure legend, acknowledgment, & literature-cited elements must adhere to all requirements. Our sample manuscript (pp. 17–22) illustrates optional formats for other sections common to “new species” papers.

Print area size is 11 × 17.5 cm (4.33" × 6.89"). The **Mycotaxon Word shell** is formatted for a US letter paper size with 5.25 cm top/bottom & 5.3 cm side margins. It also contains a mock-up of the Mycotaxon logo and header for the first page. Those using other wordprocessing applications should format their documents similarly and allow 2.5 cm (1") for the title page masthead.

Fonts & Paragraph formatting—Authors are asked to use two basic font families: serif times or times new roman (tnr)—and sans serif arial or helvetica (helv).

Characters not displayed on keyboards (α , β , μ , \times , \equiv) should be selected from the symbols menu if not available in the regular fonts. Courier is used only when comparative columnar arrangement is essential (e.g., DNA sequence data). *All* other fonts require editorial permission and must be listed on the submission form. Lines *must* be singlespaced within paragraphs, and authors should use *paragraph format menu* options to separate paragraphs or indent first lines. (Files containing double returns to space paragraphs or tab keys to indent paragraphs will be returned for reformatting.)

Required formats:

- Title—*Font*: Arial, 11-pt, Bold, **sentence** (*not* upper or title) case;

Paragraph: no period

(dot) at the end (unless ending with an abbreviation), no indent, center aligned.

Special: Set Latin scientific names in ***bold italic***. Titles should not exceed three lines.

Titles with author citations will be rejected unless an authority is needed in the title to prevent confusion. Abbreviate genus names after the first use, but otherwise avoid

abbreviations. Use arabic (not roman) numerals. Example: Studies in

Agaricales 3:

Phaeocollybia phaeogaleroides and ***P. rifflipes***, new western North American species.

- Author names—*Font*: Times, 10-pt, Roman (regular), ‘Small caps’; *Paragraph*: no indent, center aligned. *Special*: Given names and initials precede surnames. Separate authors with commas except use ‘&’ before the last author’s name.

- Address information—*Font*: Times, 9-pt, Italic; *Paragraph*: no indent, center aligned, no periods at line ends; *Placement*: E-mail address (required for first author) on top line; Institution/Street on middle line; City, Code, Country on bottom line. *Special*: Junior author E-mail addresses recommended, but optional. Keep street & institutional information to one line. Do not end lines with commas or full stops (except for abbreviations).

- Abstract & Key words—*Font*: Times, 8-pt; set ‘*Abstract*’ and ‘*Key words*’ in bold, but format the em-dash and remaining text in regular or italic as needed. *Paragraphs*: 1 cm right & left margins, no indent, left-justified.

Abstract: Abstracts briefly summarize the content & conclusions and list all new taxa (but not authorities unless differentiating homonyms). English abstracts are required; 1–2 abstracts in other languages are permitted for longer articles. Abstracts should not exceed 15 printed lines.

Key words: Up to five key words or phrases are encouraged. Do not repeat terms already used in the title or abstract. Separate terms with commas and capitalize the first letters of proper nouns only. Do not end the list with a full stop.

- Subheadings: Primary (stand-alone)—*Font*: Arial 10-pt, Bold/Bold Italic; *Paragraph*: no indent, center aligned. Secondary (stand-alone)—*Font*: Arial 9-pt, Bold/Bold Italic;

Paragraph: no indent, left aligned. Taxonomic (special)—*Font*: Times; *Size & Style*: Latin name—10-pt Bold Italic, Author citation—9-pt regular; ‘nom. nov.’, sp. nov., gen. nov, etc.’ & ‘Fig. #’—9-pt bold. *Paragraph*: hanging indent, left

aligned; set right tab to 11 cm to justify Fig. # at right (i.e. place a backward arrow tab directly at the right margin marker in the tab bar ruler.) *Special*: figure references for new names may stand on the same line as the MycoBank number.

- Basic text—*Font*: Times 10-pt; *Paragraphs*: left-justified. Use the format>paragraph menu to select **one** of the following options: *either* set 6 pts before the paragraph *or* indent the first line by 0.5 cm.

Introduce your subject briefly by citing significant background literature. You may choose to make your first primary subheading 'Introduction'. Provide necessary abbreviations and other data in a brief 'Materials & methods' section (9-pt font permitted here). Document your own observations concisely, stressing new discoveries. Minimize confusion between generic epithets beginning with the same initial letter by abbreviating one using the first **two** letters of the generic name. Italics are required for Latin scientific names at all levels and reserved elsewhere for emphasis; common Latin abbreviations (e.g., i.e., et al., etc.) and references must **not** be italicized. List author citations *once* only: where first mentioned in the text, in the taxonomic subheading introducing descriptions, or in a table containing several taxonomic names. Authors should list previously misidentified taxa as 'misapplied' *not* 'sensu + author + reference.'

Required references: Consult the current **international code of botanical nomenclature** when describing new taxa or proposing new combinations. Author citations *must* follow either the **international plant names index** or the **authors of fungal names** PDF (available on Index Fungorum). Consult **index herbariorum** for herbarium/collection acronyms. Authors describing new taxa *must* cite relevant acronyms and numbers to facilitate retrieval by readers *and* deposit new names/data in **mycobank**, type specimens in an official public *herbarium*, ex-type strains in a public *culture collection*, and/or sequence data in **genbank**.

- MycoBank & GenBank numbers, nomenclators, Latin diagnoses, holotype information, etymologies, and 'Specimens examined'—*Font*: Times, 8-pt; *Paragraph*: margins indented 1 cm, fully justified with first line flush. *Special*: Italicize all Latin text in diagnoses but only Latin scientific names in nomenclators & 'Specimens examined.' (Latin scientific names should stand in

regular font in otherwise italicized diagnoses.)

- Acknowledgments—*Font:* Times, 9-pt. *Paragraph:* no indent, left-justified. *Special:* Mycotaxon requires recognition of peer reviewers in this section.

- Literature cited—*Font:* Times, 8-pt; *Paragraph:* Hanging indent, 10-pt leading. *Required:* All references must be cited in the main text. Follow a consistent citation style throughout.

Single space all entries. *Author names:* substitute initials (no periods after initials) for given names, order surnames before initials and do not separate with commas, separate author entries only by commas and never by ‘&’ or ‘and’, placing a full stop after the last author entry. Standardize journal abbreviations. Do not use more than one space after full stops or other punctuation. *See sample manuscript for examples.*

Useful references: See botanico-periodico-huntianum (bph: Lawrence & al.1968), botanico-periodico-huntianum/supplementum (bph/s: Bridson 1991, 2004), taxonomic literature, (tl2: Stafleu & Cowan 1976-2000), and supplements to taxonomic literature (Stafleu & Mennenga 1992-1995) for recommended abbreviations.

Preparing illustrations

Size & placement

Illustrations should be submitted at page width size (4.33” or 11 cm) and distributed throughout the paper whenever possible. Remember that each article will begins on an odd-numbered (right-hand) page and that each plates should face the first reference to it within the text. Group figures into plates to aid in comparing species. Do not border either photographs or drawings with a line. The *Editor-in-Chief* will place legends (captions) below illustrations or at the bottom of the page *facing* full-page illustrations when there is not enough room for both plate and legend on the same page.

Line drawings

Authors may submit digital images prepared from scanned originals, high quality reduced photocopies, or original artwork. Authors with access to computer scanners and photographic software are encouraged to digitize original drawings themselves.

Digital files—Digital files that incorporate fonts or fine lines must have a 900–1200 *dpi* (dots per inch) resolution for the mycotaxon page width (4.33" or 11 cm).

Acceptable format types include (i) tif using lzw compression (bitmap or grayscale mode, unless paying \$475 for color processing), (ii) jpg, (iii) eps or ai, or (iv) high resolution files embedded in MSWord. Scan simple line drawings using software such as adobe photoshop®, but use more sophisticated illustration software (e.g., adobe illustrator®) to convert phylotrees and other drawings containing vector information to eps format. Image adjustments—e.g., insertion of scales, numbers, and arrows — should be handled in such applications. Remember that digital art should *not* include legends, which belong in the legend text file.

Hard copy—Authors who submit digital text with hard copy artwork may include photocopies within a manuscript printout to indicate figure placement; however, they should also submit line drawings separately *without* legends. Authors who submit printed manuscripts for scanning should position line drawings onto existing text pages *with* captions printed directly below or to the side of each drawing. With care, authors can scale down oversized drawings using the reduction feature on photocopiers without decreasing image quality to assemble an attractively arranged plate from the cut & paste illustrations.

Photographs: ‘halftones’ and color Mycotaxon prints only grayscale (‘black & white’) halftones without extra charge, but authors who submit film-based (not digital) prints may submit color photos for conversion to grayscale halftones when necessary.

Digital grayscale halftones—Use a photographic application (e.g., Adobe Photoshop®) to prepare jpgs and tifs. lzw compressed tifs do not degrade, are the same size as jpgs (which do degrade when edited), and so are preferred and used during press preparation. Tif or jpg photos intended to be printed without color *must* be set in *grayscale* mode with a minimum resolution of 300-600 *dpi* matching the target width, generally 4.33" (11 cm). Authors should ensure that the contrast among individual photographs within a single plate is not too great; individual photographs within plates may be set flush (generally preferred) or separated by a 1-2 mm white or black band. note: Authors who wish to combine line drawings with photographs in one plate should send two

files for each combined plate: a line drawing file formatted at 900-1200 dpi and a photographic file formatted at 300 dpi. The *Editor-in-Chief* will combine the two 'semiplates' into a single plate at no charge.

Digital color plates—Current press charges are \$475 per color page, and those wishing to publish color illustrations should contact the *Editor-in-Chief* before final submission.

Color plates must be submitted in tif format (using lzw compression) at 300 dpi resolution and in cmyk color mode. Authors are encouraged to preflight their color files with Sheridan Press prior to final submission.

Negative-based photographs—To prepare hard copy plates from negative-based photographs, crop individual photographs so that edges touch and the plate is exactly 4.33" (11 cm) wide. Mount photographs on separate sheets of heavy white paper or matte board. Apply annotations (arrows, numbers, scales, etc.) and band strips after the photographs are positioned. Print the senior author's name, Mycotaxon accession number, and plate number on the back in soft pencil. Note: Authors must *not* submit halftone prints prepared from digital files as hard copy intended for publication. Scans of files printed from *digital* files produce unacceptable 'moiré' artifacts and will be rejected.

Labeling

Title all graphic files (jpg, tif, eps) with the *senior* author's name, *figure* number, and 3-letter *extension* label (e.g., *name_fig#.tif*). The file label should have only *one* dot, placed before the extension (e.g., change 'fig.3-8.jpg' to 'fig3-8.jpg' by removing the dot after fig.). Label all art hard copy with the senior author's name and figure number on the **reverse** side.

Final notes about digital images

Because the *Editor-in-Chief* can convert many different file formats quickly to tif or eps files in Adobe Photoshop®, there are no fees for converting photoshop, bmp, jpg, pcx, pict, pixar, png, scitex ct, or targa files that open in Photoshop in proper grayscale/bitmap mode and have the required resolution. Fees are no longer charged for processing Word-embedded pictures through Adobe Illustrator® unless the original photograph lacks sufficient resolution for processing.

The *Editor-in-Chief* cannot improve the quality of a bad image. Authors should submit as clear and clean an image as possible but must remember that,

in science, reality supersedes beauty. Do *not* 'over-photoshop' or otherwise distort images. Authors should note in their 'Materials and methods' section when artifacts have been removed from images.

Always retain digital files in their original format and edit *only* tif-formatted copies.

(Compressed jpgs lose resolution each time a file is edited; uncompressed tifs are the least damaged by editing.)

Resolution of a low-resolution file cannot be increased by simply typing in a higher dpi. Authors with low-resolution files *must* (i) photograph or scan the objects again or (ii) design their manuscript to accommodate a smaller plate. If authors submit only substandard illustrations, they should expect to find their paper rejected or run without the illustrations.

Each MYCOTAXON front cover now displays a drawing chosen from a paper published in that volume.