

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Vagner Mateus Berres

**INVESTIGAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTIFÚNGICA
DE *Cochlospermum regium* (Mart & Schrank) Pilger (Bixaceae) E SUA
COMBINAÇÃO COM FLUCONAZOL FRENTE A *Cryptococcus
gattii***

Trabalho de Conclusão de Curso

Dourados MS

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Vagner Mateus Berres

INVESTIGAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE
Cochlospermum regium (Mart & Schrank) Pilger (Bixaceae) E SUA
COMBINAÇÃO COM FLUCONAZOL FRENTE A *Cryptococcus gattii*

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado a Faculdade de Ciências
Biológicas e Ambientais para a
obtenção do título de Bacharel em
Biotecnologia, com orientação da
Profa. Dra. Kelly Mari Pires de
Oliveira.

Dourados MS

2016

VAGNER MATEUS BERRES

**“INVESTIGAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE
Cochlospermum regium (Mart & Schrank) Pilger (Bixaceae) E SUA
COMBINAÇÃO COM FLUCONAZOL FRENTE A *Cryptococcus gattii*”**

Trabalho de conclusão de curso apresentado a Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais para obtenção de título de Bacharel em Biotecnologia.

Aprovado em __/__/____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Kelly Mari Pires de Oliveira
Universidade Federal da Grande Dourados

Profa. Me. Adriana Araújo de Almeida Apolonio
Universidade Federal da Grande Dourados

Profa. Dra. Raquel dos Santos Donatini
Universidade Federal da Grande Dourados

Me. Fabiana Gomes da Silva Dantas
Universidade Federal da Grande Dourados

Dourados, 14 de Dezembro de 2016.

*“Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável,
eles são a abertura para achar as que estão certas”.*

Carl Sagan

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo, agradeço a Deus, por permitir que eu pudesse chegar a este ponto, por me abençoar todos os dias e me dar forças para alcançar meus objetivos.

Aos meus pais, Volmir e Denilce, por sempre primarem pela minha educação. Por todo amor e que em todos os momentos de dificuldade, estiveram ao meu lado, me guiando e me apoiando, sem vocês, minha caminhada até aqui não teria acontecido. Vocês são meu maior exemplo, sou eternamente grato por tudo, amo vocês.

Ao meu irmão e melhor amigo, Vander, que graças a ele decidi cursar este curso que mudou minha vida. Agradeço por sempre poder contar contigo durante toda a vida e todo o curso, todo meu agradecimento não pode ser expresso em palavras, amo você.

A minha noiva, Evelize, por estar ao meu lado desde o começo e nos momentos mais difíceis, por sempre apoiar minhas decisões, por nunca duvidar da minha capacidade, sou grato por cada gesto, sorriso, afeto e afago, você é o melhor presente que este curso poderia ter me dado, te amo.

A minha orientadora, Profa. Dra. Kelly Mari Pires de Oliveira, muito obrigado pela orientação, pelos ensinamentos, por ter me ajudado em meu crescimento acadêmico, que Deus continue sempre te abençoando.

A minha também orientadora, Me. Adriana Araújo de Almeida Apolonio, por ter me ajudado desde o início ao fim do meu TCC, por não ser apenas uma orientadora, mas uma amiga, agradeço seu companheirismo, ensinamento, conselhos e paciência durante todo esse tempo.

Aos meus amigos de vida, Ana, Pedro, Sabrina, Kamila, Andreza, que cada um me ajudou de modo único durante todos esses anos, não consigo imaginar meus últimos quatro anos, sem a presença de vocês na minha vida.

Aos meus amigos do grupo de pesquisa do Laboratório de Microbiologia Aplicada: Allan, Danny, Fabiana, Stephanie, Renata, Mel, Bianca, Fernanda, Andressa e aos demais, por toda ajuda, que sempre terei por vocês, um carinho especial. Principalmente aos meus grandes amigos e “irmãos científicos” Jhon e Pamella, obrigado por toda ajuda no laboratório, paciência em lidar comigo e por tornar um ambiente de trabalho, também em um ambiente de descontração. Obrigado por tudo.

Aos demais amigos da V turma de Biotecnologia, por tornarem essa, na melhor turma possível.

Agradeço a todos, e aos que aqui não foram citados, que de alguma forma contribuíram de algum modo, para que eu chegasse a esse ponto.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS	7
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	9
RESUMO	10
ABSTRACT	11
I. INTRODUÇÃO	12
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 Criptococose	13
2.2 <i>Cryptococcus gattii</i>	14
2.3 Tratamento da criptococose	15
2.3.1 5-flucitosina	16
2.3.2 Fluconazol.....	17
2.3.3 Anfotericina B.....	18
2.4 <i>Cochlospermum regium</i>	19
2.5 Sinergismo	20
III. OBJETIVOS	21
3.1 Objetivo geral	21
3.2 Objetivos específicos	21
IV. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22
V. ANEXOS	27
5.1 Artigo.....	27
5.2 Normas da Revista – <i>Industrial Crops and Products</i>	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

AMB	Anfotericina B
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CIF	Concentração Inibitória Fracionaria
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
FCBA	Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais
g	Gramas
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
mg	Miligramas
mL	Mililitros
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
UFC	Unidade Formadora de Colônias
UFGD	Universidade Federal da Grande Dourados
V	volume
°C	Graus Celsius
µg	Microgramas
µL	Microlitros

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura química da molécula de flucitosina. Pág. 16
- Figura 2.** Estrutura química da molécula de fluconazol. Pág. 18
- Figura 3.** Estrutura química da molécula de anfotericina B. Pág. 19

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração inibitória mínima (CIM: $\mu\text{g/mL}$) e origem dos microrganismos testados. Pág. 31

Tabela 2. Concentração inibitória mínima do extrato etanólico, fluconazol e concentração inibitória fracionária, frente a isolados de *C. gattii*. Pág. 31

RESUMO

Cryptococcus gattii é um dos agentes etiológicos da criptococose, doença que afeta o sistema nervoso central e pulmões, tanto em pacientes imunocomprometidos, como em pacientes saudáveis. *Cochlospermum regium*, popularmente conhecida como algodãozinho, apresenta grande importância popular, devido aos compostos secundários presentes, e ser utilizado para diversos fins terapêuticos pela população brasileira. O presente trabalho avaliou a atividade antifúngica do extrato etanólico das folhas de *Cochlospermum regium* e sua interação com fluconazol frente a isolados de *Cryptococcus gattii*. O extrato etanólico apresentou atividade antifúngica de 125 µg/mL para isolados de escarro, 62,5 µg/mL para isolado de líquor e 250 µg/mL na ATCC utilizada como referência. Para avaliação da combinação do extrato etanólico e fluconazol, todos os espécimes testados, apresentaram valores indiferentes, onde em nenhuma houve interação sinérgica. O presente estudo pôde contribuir com novas informações para a área de pesquisa, e pode ser um ponto de referência para o desenvolvimento de novos antifúngicos no tratamento da criptococose.

Palavras-chave: Algodãozinho. Criptococose. Antifúngicos naturais.

ABSTRACT

Cryptococcus gattii is one of the etiologic agents of cryptococcosis, a disease that affects the central nervous system and lungs, both in immunocompromised patients and in healthy patients. *Cochlospermum regium*, popularly known as algodãozinho, have a popular importance due to large amounts of secondary compounds present, and is used for various therapeutic purposes by the Brazilian population. The present work evaluated the antifungal activity of the ethanolic extract from the leaves of *Cochlospermum regium* and its interaction with fluconazole against *Cryptococcus gattii* isolates. The ethanolic extract showed antifungal activity of 125 µg/mL for sputum isolates, 62.5 µg/mL for cerebrospinal fluid isolate and 250 µg/mL for the ATCC used as reference. In order to evaluate the combination of ethanolic extract and fluconazole, all the specimens tested presented indifferent values, where none showed synergistic interaction. The present study was able to contribute with new information for the research area, and can be a point of reference for the development of new antifungal in the treatment of cryptococcosis.

Keywords: Algodãozinho. Cryptococcosis. Natural antifungals.

I. INTRODUÇÃO

As infecções causadas por fungos possuem grande importância devido a seu amplo número de portadores e ao número de mortes decorridos dessas infecções. As enfermidades fúngicas oportunistas mais frequentes são candidíase, aspergilose e criptococose, esta última causada por leveduras do gênero *Cryptococcus* (WANKE et al., 2000; MARTINS-DINIZ et al., 2005; HARVEY et al., 2008).

O gênero *Cryptococcus* possui 37 espécies, em que apenas duas, *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans* são importantes em infecções em humanos (CASADEVALL & PERFECT, 1998). O início das infecções acontece pela inalação dos fungos, causando infecções pulmonares, onde o fungo pode disseminar-se pelo sistema nervoso central, causando meningite (CHEN et al., 2013).

A criptococose é atualmente considerada a doença oportunista com maior morbidade e mortalidade em pacientes imunocomprometidos (DE AQUINO MOREIRA et al., 2006). As infecções desenvolvem-se nos pulmões causando massas granulomatosas, necessitando prolongadas terapias com antifúngicos para seu tratamento (LIN, 2009).

Cochlospermum regium (Mart. & Schr.) conhecido popularmente como algodãozinho, algodãozinho-do-cerrado, algodão-bravo é uma planta típica do bioma cerrado brasileiro (SOUZA & LORENZI, 2008). O algodãozinho apresenta elevadas concentrações de taninos, triterpenoides, mucilagem e flavonoides, utilizado pela população como agente antimicrobiano (OLIVEIRA et al., 1994).

A partir do apresentado, o presente estudo tem como objetivo investigar o potencial antifúngico do extrato etanólico das folhas de *Cochlospermum regium* e em combinação com fluconazol frente a *Cryptococcus gattii*.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Criptococose

Cryptococcus gattii e *Cryptococcus neoformans* são os agentes etiológicos da criptococose, sendo o sistema nervoso central e os pulmões os sítios anatômicos mais acometidos. A criptococose é considerado uma infecção fúngica oportunista, pois afeta principalmente pacientes imunocomprometidos, como HIV-positivo, pacientes em uso de imunossuppressores, corticoides, diabéticos, cirrose hepática, doenças pulmonares crônicas, sarcoidose e pacientes com anemia falciforme. O paciente, quando imunocomprometido, pode ser infectado pelos fungos, que se disseminam por via hematogênica, podendo envolver pele, próstata, trato urinário e os olhos (CASADEVALL & PERFECT, 1998; AGUIAR et al., 2006; MA & MAY, 2009).

A infecção acontece de duas formas, a criptococose oportunista, em associação com quadros de imunossupressão causada majoritariamente por *Cryptococcus neoformans*, e a criptococose primária de hospedeiros tipicamente imunocompetentes, endêmica de ocorrência em regiões tropicais e subtropicais, causada por *Cryptococcus gattii* (MORETTI et al., 2008).

Os sinais da criptococose diferem-se entre paciente imunocomprometidos e não imunocomprometidos. Em pacientes com HIV ou outras doenças imunossupressoras, a meningoencefalite ocorre com ampla variação de sinais clínicos, sem que haja sinais meníngeos. Em pacientes não imunocomprometidos a doença apresenta um quadro de inflamações no sistema nervoso central, com sinais de náuseas, rigidez da nuca e vômitos (MORETTI et al., 2008).

Naturalmente, a infecção inicia-se com a inalação de basidiósporos ou leveduras desidratadas, que ao entrarem em contato com os alvéolos pulmonares, iniciam seu processo de multiplicação (RUIZ & BULMER, 1981). Uma vez que a levedura se instala nos pulmões, pode produzir criptococose pulmonar, que pode variar desde quadros assintomáticos, até casos com sintomas de febre, tosse, perda de peso e dores no peito (CHAYAKULKEEREE & PERFECT, 2006).

O processo de imunidade mediada por células é uma importante defesa do paciente contra infecções de *Cryptococcus gattii*, sendo de fundamental importância para o controle da doença, visto que em pacientes imunocomprometidos, o risco do desenvolvimento da doença é maior, a doença pode ser contida naturalmente como

resposta imune humoral, quando o paciente é imunocompetentes (GARCIA-HERMOSO et al., 1999; STEENBERGEN & CASADEVALL, 2003; UICKER et al., 2005).

A forma clínica com maior número de diagnóstico é a meningoencefalite, com ocorrência de 80% dos casos, podendo estar ou não acompanhada de acometimento pulmonar ou em outros órgãos. A levedura tem tendência a disseminar-se para o sistema nervoso central, onde existem grandes quantidades de catecolaminas, componente utilizado na produção de melanina pela levedura (BIVANCO et al., 2006). A infecção no sistema nervoso central causa a inflamação do espaço subaracnóide e do parênquima cerebral, sendo esta a forma mais aguda da doença (CASADEVALL & PERFECT, 1998; STEENBERGEN & CASADEVALL, 2003). A meningite criptocócica pode causar mortalidade de até 30% dos casos (LIN & HEITMAN, 2006; LIN, 2009).

Outro caso de criptococose é a cutânea que ocorre em cerca de 10 a 15% dos casos da doença. As lesões causadas pela criptococose cutânea podem apresentar nódulos, edemas, massas na região subcutânea, celulites, abscessos ou úlceras (BIVANCO et al., 2006).

2.2 *Cryptococcus gattii*

Cryptococcus é um gênero de fungos basidiomicetos, com mais de 30 espécies distribuídas no ambiente, mas há apenas duas espécies comumente conhecidas que causam doenças em humanos, *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*. Ambas se apresentam como leveduras ovaladas ou globosas, com cerca de 3 a 8 μm de diâmetro, envolvidas por uma cápsula mucopolissacarídica, tendo diferenças entre os sorotipos pelas diferenças estruturais apresentadas na cápsula polissacarídica, podendo ter brotamentos único ou múltiplos (CASADEVALL & PERFECT, 1998; MACDOUGALL et al., 2011). Essa cápsula polissacarídea é considerada o maior fator de virulência desta levedura, atuando na defesa do microrganismo de ser fagocitado por monócitos, neutrófilos e macrófagos, dificultando a resposta imune do hospedeiro (BUCHANAN & MURPHY, 1998).

A cápsula polissacarídea é composta por dois polissacarídeos, a glucoronoxilomanana (GXM) e a galactoxilomanana (GalXM); essas são responsáveis pelo fator de virulência e pela indução da apoptose em células T e macrófagos, sendo a

apoptose mediada pela expressão do ligante Fas (MONARI et al., 2005; VILLENA et al., 2008; ZARAGOZA et al., 2009).

A partir da enzima difenoxidase, a levedura consegue sintetizar a melanina, que tem como função a resistência aos efeitos fungicidas da radiação ultravioleta e resistência a agentes antioxidantes gerados pelas células de defesa imunológica (WANG & CASADEVALL, 1994; WANG et al., 1995; SALAS et al., 1996).

Cryptococcus gattii é geralmente restrito a regiões de clima tropical e subtropical. Seu principal nicho ecológico são árvores de *Eucalyptus camaldulensis* e *Eucalyptus tereticornis*, mas também podem ser encontradas em árvores de amendoeira (*Prunus dulcis*), cássia-imperial (*Cassia fistula*) e *Pseudotsuga menziesii* (DIXIT et al., 2009). *C. gattii* desenvolveu a capacidade de colonizar novas regiões climáticas, como Vancouver, no Canadá, onde houve surtos de infecção em humanos e animais (SORRELL, 2001). No Brasil, além de serem encontradas em árvores, também são isoladas amostras de *Cryptococcus gattii* de excretas de pombos, mesmo que proporcionalmente menor que isolados de *Cryptococcus neoformans* (MEZZARI et al., 2015).

A levedura causa infecções predominantemente em indivíduos imunocompetentes, com ocorrências de 70 a 80% dos casos de criptococose em imunocompetentes, na Austrália e Papua Nova Guiné (CASADEVALL & PERFECT, 2008; LIN & HEITMAN, 2006). No Brasil, aproximadamente metade dos isolados de *Cryptococcus* são da espécie *C. gattii* onde a ampla maioria eram de pacientes não imunocompetentes (DOS SANTOS et al., 2008).

Pacientes infectados com *C. gattii* possuem um maior número de sequelas neurológicas que pacientes infectados com *C. neoformans*, necessitando um maior tempo de tratamento. Em pacientes imunocompetentes, aqueles que sofrem de infecções por *C. gattii* apresentavam um pior quadro de sequelas e número de mortes em comparação à outra espécie do gênero (SPEED & DUNT, 1995; MITCHELL et al., 1995).

2.3 Tratamento da criptococose

Para o tratamento da criptococose, são comumente utilizado três tipos de antifúngicos, a anfotericina B, o 5-flucitosina e o fluconazol. A criptococose é principalmente tratada com a combinação de mais de um agente antifúngico, o tratamento

com Anfotericina B e triazóis são os mais convencionais, porém, muitas vezes apresenta efeitos colaterais, devido a nefrotoxicidade desses agentes. Já o fluconazol apresenta baixas taxas de efeitos adversos e boa penetração no líquido cefalorraquidiano, porém apresenta baixo índice de combate a criptococose quando utilizado como monoterapia (JOHNSON & PERFECT, 2007).

2.3.1 5-flucitosina

A 5-flucitosina (Figura 1) é um agente antifúngico sintético, que possui um limitado espectro contra infecções fúngicas sistêmicas, possuindo maior ação frente àquelas causadas por leveduras, basicamente *Cryptococcus* sp. e *Candida* sp. O medicamento, quando tratado isoladamente, acarreta no desenvolvimento de resistência dos fungos, motivo pelo qual deve ser utilizado exclusivamente para propiciar o sinergismo junto a anfotericina B (GOODMAN & GILMAN, 1996; SHERDING, 2008; GOLAN, 2009).

O antifúngico é selecionado estritamente pelos fungos através de permeases da citosina, expressas somente nas membranas desses fungos (GOLAN, 2009).

A 5-flucitosina tem como mecanismo de ação, sua conversão no antimetabólico 5-fluorouracil nas células fúngicas. Ocorre a inibição do timidilato sintase, inibindo assim a síntese de DNA (GOLAN, 2009).

5-flucitosina apresenta grande vantagem devido ao grande volume de distribuição, apresentando ótima penetração no sistema nervoso central, trato urinário e olhos. Os efeitos colaterais variam de acordo com a dose e consistem basicamente em leucopenia, náuseas, vômitos, diarreia e disfunção hepática (GOLAN, 2009). Porém sua venda e comercialização é proibida no Brasil (LOYSE et al., 2013).

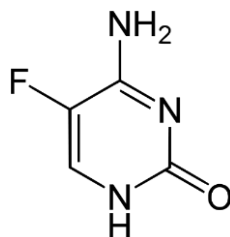


Figura 1. Estrutura química da molécula de flucitosina.

2.3.2 Fluconazol

O fluconazol (Figura 2) é um composto azol, do tipo triazólico, que atua contra a maioria dos fungos que causam micoses superficiais, cutâneas, subcutâneas, profundas e oportunistas. Os compostos do grupo azol, inibem de forma competitiva e reversível, algumas enzimas que desempenham papel na biossíntese do ergosterol. A principal enzima inibida é a lanosterol 14 α -desmetilase; a droga se liga através do grupo nitrogênio ao grupo ativo da enzima alvo e bloqueia sua função de desmetilação do carbono 14 do lanosterol, gerando um acúmulo de substâncias que substituem o ergosterol presente na membrana celular, alterando sua permeabilidade, ocasionando seu efeito fungistático (TRÖSKEN et al., 2006).

Por ser um antifúngico não seletivo, o fluconazol apresenta toxicidade ao hospedeiro, pois acarreta na inibição cruzada de enzimas dependentes do P-450 envolvidas na síntese de cortisol e de testosterona em mamíferos. Dessa forma, pode causar ginecomastia, uma neoplasia que leva ao crescimento de mamas nos homens, oligospermia, secreção insuficiente de sêmen, também perda de libido e impotência sexual. O fluconazol, assim como os outros compostos azois, são teratogênicos, podendo causar dano ao embrião ou feto durante a gravidez (FICA, 2004).

Os fungos desenvolvem resistência ao fluconazol, principalmente em pacientes imunocomprometidos (aidéticos e transplantados) devido ao seu uso maciço. Os principais mecanismos de resistência são: alteração no alvo da droga, ocorrido por uma mutação que altera a ligação do antifúngico sem que haja alteração da capacidade de catalisar a metilação, outro mecanismo é a superprodução da enzima alvo (lanosterol 14 α -desmetilase-gene ERG11), que causa o aumento do número de cópias da enzima alvo, e por fim, a redução na concentração intracelular da enzima alvo, causada pela superprodução de bombas específicas de efluxo de drogas (FICA, 2004).

O fluconazol apresenta altas concentrações plasmáticas em 2 a 4 horas, e meia vida de 22 a 31 horas, sendo esta a droga de primeira escolha em casos de neurocriptococose, apesar de apresentar efeito indesejáveis, como distúrbios gastrointestinais, rash cutâneo, cefaleia e convulsões (MAFFEI, 2010).

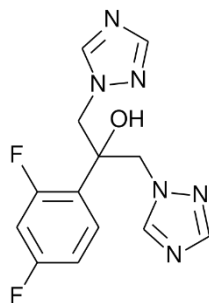


Figura 2. Estrutura química de molécula de fluconazol.

2.3.3 Anfotericina B

A anfotericina B (Figura 3) é um agente antifúngico de amplo espectro com grande eficácia contra maioria dos agentes causadores de micoses sistêmicas e oportunistas, também funciona como antiparasitário contra *Leishmania*. A anfotericina B possui baixos índices de resistência, devido principalmente às alterações qualitativas e quantitativas de ergosterol presente na membrana das células (SOKOL-ANDERSON et al., 1986).

Por ser um antifúngico poliênico, possuem atividade principalmente em fungos na fase estacionária do crescimento, por se unir por interações hidrofóbicas ao ergosterol, esta, encontrada na membrana citoplasmática dos fungos. Com a ligação da anfotericina B ao ergosterol, ocorre a alteração da permeabilidade seletiva da célula, o que desencadeia na liberação de nutrientes importantes da célula, causando a morte celular. Por se ligarem ao ergosterol, causam danos à membrana plasmática humana, motivo de seu potencial tóxico a humanos (SOKOL-ANDERSON et al., 1986).

A toxicidade da anfotericina B está relacionada aos rins, por serem responsáveis pela diminuição do fluxo glomerular em até 80% causando vasoconstrição (CATALÁN & MONTEJO, 2006). Existem dois mecanismos do antifúngico relacionados a nefrotoxicidade, o primeiro é um mecanismo vascular, causando a disfunção do fluxo sanguíneo renal, e o segundo mecanismo é resultado da lesão na estrutura da célula tubular, a ação de ambos, resulta na redução da filtração glomerular (BERDICHEVSKI, 2013).

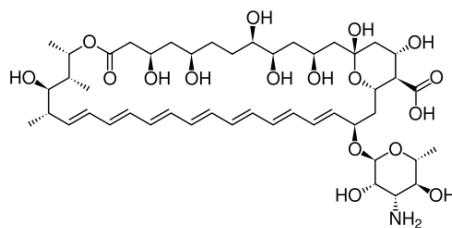


Figura 3. Estrutura química da molécula de anfotericina B.

2.4 *Cochlospermum regium*

A espécie *Cochlospermum regium* (Mart. & Schr.) é conhecida popularmente como algodãozinho-do-campo, algodãozinho-do-cerrado, algodão-bravo, algodão-do-mato, algodãozinho-cravo, algodãozinho, sumaúmade-igapó, pacote e ruibarbo-do-campo (CORREA, 1974). O algodãozinho é uma planta do bioma cerrado brasileiro, também já foi encontrada no Paraguai e Bolívia (DE LIMA et al., 1995; MENDONÇA et al., 1998; SOUZA & LORENZI, 2008).

Cochlospermum regium é uma espécie arbustiva, com cerca de 2 metros de altura, e ramificações variam entre 0,8 e 1,8 metro de comprimento, apresentado sistema subterrâneo robusto e lenhoso com raiz axial profunda, carnosa e bem desenvolvida, tendo comprimento máximo de 3 metros e 20 centímetros de diâmetro (KIRIZAWA, 1981; RITTO, 1996; CASTRO et al., 2004). Quando ocorrem queimadas no cerrado brasileiro, e os ramos da planta são destruídos, as flores surgem ao nível do solo a partir do xilopódo, onde também emergem seus ramos (POPPENDIECK, 1981).

O algodãozinho possui grande importância popular, devido a grandes quantidades de flavonoides, mucilagem, triterpenoides e taninos, além de possuir, açúcares e ácido arjúnólico (LIMA et al., 1995). Além também de possuir efeito analgésico e antidermatogênico, e atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (CASTRO et al., 1994; OLIVEIRA et al., 1994).

Segundo Nunes et al. (2003), o algodãozinho está entre as 10 espécies de plantas mais requeridas e/ou recomendadas por raizeiros em levantamentos entre 1992 e 2002, notando-se sua importância no comércio de plantas medicinais do cerrado.

2.5 Sinergismo

A resistência de drogas antifúngicas comerciais tem aumentado, além de apresentarem alta toxicidade e alto custo com seu tratamento, dificultam a utilização desses antifúngicos no tratamento de micoses (SOARES et al., 2008). Por isso, a investigação das propriedades biológicas de biomoléculas naturais, bem como do seu potencial fitoquímico, efeitos e mecanismos de ação sinérgicos torna-se importante para produção de novas drogas antimicrobianas (ROEMER et al., 2011).

A interação de drogas deve ser estudada para avaliar as possibilidades de que uma droga possa interferir na atividade e efeitos de outra droga administrada concomitantemente. A interação entre fármacos pode ocorrer de três formas: sinergismo, antagonismo ou indiferente.

Sinergismo é a interação de dois ou mais agentes antimicrobianos, na qual o efeito produzido pelo uso de drogas em combinação, é significativamente maior do que a soma dos seus efeitos utilizados de forma separada (MEDEIROS, 2012).

O antagonismo, é uma interação negativa, onde o efeito combinado de dois ou mais agentes antimicrobianos, tem um resultado menor do que seus efeitos independentes quando testados separadamente. Quando não há interação significativa entre os agentes antimicrobianos, o resultado é descrito como indiferente (MEDEIROS, 2012).

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar *in vitro* a potencial atividade antifúngica de *Cochlospermum regium* e sua combinação com fluconazol frente a *Cryptococcus gattii*.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar a concentração inibitória mínima do extrato etanólico das folhas de *Cochlospermum regium* frente a espécimes clínicas de *Cryptococcus gattii*.

- Avaliar a ação sinérgica entre a combinação do extrato etanólico das folhas de *Cochlospermum regium* e fluconazol frente a isolados de *Cryptococcus gattii*.

IV. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, L. L. A. et al. Criptococose pulmonar em paciente com carcinoma de mama (Relato de caso). **Boletim Pneumologia Paulista** v. 33, 2006.

BERDICHEVSKI, R. H. **Nefrotoxicidade associada à anfotericina B em pacientes de baixo risco**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003.

BIVANCO, F. C.; MACHADO, C. A. S.; MARTINS, E. L. Criptococose cutânea. **Arquivos médicos do ABC**, v. 31, n. 2, p. 102-109, 2006.

BUCHANAN, K. L.; MURPHY, J. W. What makes *Cryptococcus neoformans* a pathogen? **Emerging infectious diseases**, v. 4, n. 1, p. 71, 1998.

CASADEVALL, A.; PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans*. Washington, DC: ASM press, 1998.

CASTRO, D. B.; SANTOS, D. B.; FERREIRA, H. D.; SANTOS, S. C.; CHEN-CHEN, L. Atividade mutagênica e citotóxica do extrato de *Cochlospermum regium* Mart. (algodãozinho-do-campo) em camundongos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 6, n. 3, p. 15-19, 2004.

CASTRO, M.; DE SIQUEIRA, J. M.; PAZ-VIEIRA, I. C.; KASSAB, N. M. Estudos sobre o efeito analgésico e anti-edematogênico de uma flavanona isolada de *Cochlospermum regium* “algodãozinho”. **XIII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil. Fortaleza: UFC**, 1994.

CATALÁN, M.; MONTEJO, J. C. Systemic antifungals. Pharmacodynamics and pharmacokinetics. **Revista iberoamericana de micologia**, v. 23, n. 1, p. 39-49, 2006.

CHAYAKULKEEREE, M.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 20, p. 507, 2006.

CHEN, S. C. A.; KORMAN, T. M.; SLAVIN, M. A.; MARRIOTT, D.; BYTH, K.; BAK, N.; MCBRIDE, W. J. Antifungal therapy and management of complications of cryptococcosis due to *Cryptococcus gattii*. **Clinical infectious diseases**, v. 57, n. 4, p. 543-551, 2013.

CORREA, M. P.; PENNA, L. A. Dicionario das plantas uteis do Brasil e das exóticas cultivadas: volume 5. MR. **Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal 687p.-illus.. Por Icones. Geog**, v. 4, 1974.

DE AQUINO MOREIRA, T.; FERREIRA, M. S.; RIBAS, R. M.; BORGES, A. S. Criptococose: estudo clínico-epidemiológico, laboratorial e das variedades do fungo em 96 pacientes. **AIDS**, v. 78, n. 81, p. 3, 2006.

DIXIT, A.; CARROLL, S. F.; QURESHI, S. T. *Cryptococcus gattii*: an emerging cause of fungal disease in North America. **Interdisciplinary perspectives on infectious diseases**, v. 2009, 2009.

DOS SANTOS, W. R. A.; MEYER, W.; WANKE, B.; COSTA, S. P.; TRILLES, L.; NASCIMENTO, J. L. M.; FERREIRA, S. O. Primary endemic Cryptococcosis gattii by

molecular type VGII in the state of Pará, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 8, p. 813-818, 2008.

FICA, A. Tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas Primera parte: fluconazol, itraconazol y voriconazol. **Revista chilena de infectología**, v. 21, n. 1, p. 26-38, 2004.

GARCIA-HERMOSO, D.; JANBON, G.; DROMER, F. Epidemiological evidence for dormant *Cryptococcus neoformans* infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 10, p. 3204-3209, 1999.

GOLAN, D. JUNIOR, T.; ARMEN, H.; ARMSTRONG, E. J.; ARMSTRONG, A. W. Princípios de Farmacologia: A Base Fisiopatológica da **Farmacoterapia**. 2 edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009;

GOODMAN & GILMAN. - As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 9a ed. Rio de Janeiro, McGraw-Hill Interamericana editores. p.1436, 1996.

HARVEY, R. A.; CHAMPE, P. C.; FISHER, B. D. Microbiologia ilustrada. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2008.

JOHNSON, M. D.; PERFECT, J. R. Combination antifungal therapy: what can and should we expect?. **Bone marrow transplantation**, v. 40, n. 4, p. 297-306, 2007.

KIRIZAWA, M. Contribuição ao conhecimento morfo-ecológico e do desenvolvimento anatômico dos órgãos vegetativos e de reprodução de *Cochlospermum regium* (Mart. & Schr.) **Pilger-Cochlospermaceae**. 1981.

DE LIMA, D. P.; DE ABREU CASTRO, M. S.; DE MELLO, J. C. P.; SIQUEIRA, J. D.; KASSAB, N. M. A flavanone glycoside from *Cochlospermum regium*. **Fitoterapia**, v. 66, n. 6, p. 545-546, 1995.

LIN, X. *Cryptococcus neoformans*: morphogenesis, infection, and evolution. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, n. 4, p. 401-416, 2009.

LIN, X.; HEITMAN, J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 60, p. 69-105, 2006.

LOYSE, A.; DROMER, F.; DAY, J.; LORTHOLARY, O.; HARRISON, T. S. Flucytosine and cryptococcosis: time to urgently address the worldwide accessibility of a 50-year-old antifungal. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, p. 221, 2013.

MA, H.; MAY, ROBIN, C. Virulence in *Cryptococcus* species. **Advances in applied microbiology**, v. 67, p. 131-190, 2009.

MACDOUGALL, L.; FYFE, M.; ROMNEY, M.; STARR, M.; GALANIS, E. Risk factors for *Cryptococcus gattii* infection, British Columbia, Canada. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 2, p. 193-199, 2011.

MAFFEI, C. M. L. FMRP-USP. Disponível em: <<http://rbp.fmrp.usp.br/sites/default/files/antifngicos.pdf>>. Acesso em 10 de agosto de 2016.

MARTINS-DINIZ, J. N.; DA SILVA, R. A. M.; MIRANDA, E. T.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Monitoramento de fungos anemófilos e de leveduras em unidade hospitalar. **Revista de Saúde Pública**, v. 39, n. 3, p. 398-405, 2005.

MEDEIROS, M. Avaliação in vitro e in vivo de Efeitos Sinérgicos de Antibacterianos para o Tratamento de Infecções por *Acinetobacter baumannii* Multirresistentes produtoras de Carbapenemases tipo OXA endêmicas no Brasil. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo. 2012.

MENDONÇA, R. C.; FELFILI, J. M.; WALTER, B. M. T.; SILVA JUNIOR, M. D.; REZENDE, A. V.; FILGUEIRAS, T. S.; ALMEIDA, S. D. Flora vascular do cerrado. **Cerrado: ambiente e flora**, 1998.

MEZZARI, A. WLIEBBELLING, A. M. P.; MAY, G. G.; ALBÉ, G. C.; FILIK, H. P.; ESQUERDO, D.; FIDALGO, N. C. G.; BEHAR, P. R. P. Presença e susceptibilidade aos antifúngicos do *Cryptococcus* spp. em excretas de pombos nos arredores dos grandes hospitais de Porto Alegre. **Revista da AMRIGS**, v. 59, n. 3, p. 204-208, 2015.

MITCHELL, D. H.; SORRELL, T. C.; ALLWORTH, A. M.; HEATH, C. H.; MCGREGOR, A. R.; PAPANAOU, K.; RICHARDS, M. J.; GOTTLIEB, T. Cryptococcal disease of the CNS in immunocompetent hosts: influence of cryptococcal variety on clinical manifestations and outcome. **Clinical Infectious Diseases**, v. 20, n. 3, p. 611-616, 1995.

MONARI, C.; PERICOLINI, E.; BISTONI, G.; CASADEVALL, A.; KOZEL, T. R.; VECCHIARELLI, A. *Cryptococcus neoformans* capsular glucuronoxylomannan induces expression of fas ligand in macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 6, p. 3461-3468, 2005.

MORETTI, M. L.; RESENDE, M. R.; LAZERA, M. D. S.; COLOMBO, A. L.; SHIKANAI-YASUDA, M. A. Guidelines in cryptococcosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 524, 2008.

NUNES, G. P.; SILVA, M. D.; RESENDE, U. M.; SIQUEIRA, J. D. Plantas medicinais comercializadas por raizeiros no Centro de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n. 2, p. 83-92, 2003.

OLIVEIRA, C. C., J. M. SIQUEIRA, K. C. B. SOUZA, U. M. RESENDE. Avaliação da atividade antibacteriana da raiz de *Cochlospermum regium* “algodãozinho”, In: **Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil**, 13, Fortaleza, CE. Anais, p.155, 1994.

POPPENDIECK, H. H. Flora Neotropica Monograph, 1981. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/4393745?&Search=yes&term=cochlospermum&term=flora&term=neotropica&term=regium&list=hide&searchUri=%2Faction%2FdoBasicSearch%3FQuery%3Dflora%2Bneotropica%2Bcochlospermum%2Bregium%26wc%3Don%26x%3D8%26y%3D7&item=1&ttl=4&returnArticleService=showArticle>>. Acesso em: 10 de agosto de 2016.

RITTO, J. L. A. Caracterização farmacognóstica da droga e do extrato fluido de algodãozinho-do-campo, a *Cochlospermum regium* (MART et SCHR.) PILGER. 1996.

ROEMER, T.; XU, D.; SINGH, S. B.; PARISH, C. A.; HARRIS, G.; WANG, H.; DAVIES, J. E.; BILLS, G. F. Confronting the challenges of natural product-based antifungal discovery. **Chemistry & biology**, v. 18, n. 2, p. 148-164, 2011.

RUIZ, A.; BULMER, G. S. Particle size of airborne *Cryptococcus neoformans* in a tower. **Applied and environmental microbiology**, v. 41, n. 5, p. 1225-1229, 1981.

SALAS, S. D.; BENNETT, J. E.; KNOW-CHUNG, K. J.; PERFECT, J. R.; WILLIAMSON, P. R. Effect of the laccase gene CNLAC1, on virulence of *Cryptococcus neoformans*. **The Journal of experimental medicine**, v. 184, n. 2, p. 377-386, 1996.

SHERDING, R. G.; Micoses sistêmicas. **Manual Saunders: Clínica de pequenos animais**. v.3, p.209-222, 2008.

SOARES, B. M.; SANTOS, D. A.; KOHLER, L. M.; DA COSTA CÉSAR, G.; DE CARVALHO, I. R.; DOS ANJOS MARTINS, M; CISALPINO, P. S. Cerebral infection caused by *Cryptococcus gattii*: a case report and antifungal susceptibility testing. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 25, n. 4, p. 242-245, 2008.

SOKOL-ANDERSON, M. L.; BRAJTBURG, J.; MEDOFF, G. Amphotericin B-induced oxidative damage and killing of *Candida albicans*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 154, n. 1, p. 76-83, 1986.

SORRELL, T. C. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. **Medical mycology**, v. 39, n. 2, p. 155-168, 2001.

SOUZA, V.; LORENZI, H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. 2008.

SPEED, B.; DUNT, D. Clinical and host differences between infections with the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. **Clinical infectious diseases**, v. 21, n. 1, p. 28-34, 1995.

STEENBERGEN, J. N.; CASADEVALL, A The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 7, p. 667-675, 2003.

TRÖSKEN, E. R.; FISCHER, K.; VÖLKEL, W.; LUTZ, W. K. Inhibition of human CYP19 by azoles used as antifungal agents and aromatase inhibitors, using a new LC-MS/MS method for the analysis of estradiol product formation. **Toxicology**, v. 219, n. 1, p. 33-40, 2006.

UICKER, W. C.; DOYLE, H. A.; MCCRACKEN, J. P.; LANGLOIS, M.; BUCHANAN, K. L. Cytokine and chemokine expression in the central nervous system associated with protective cell-mediated immunity against *Cryptococcus neoformans*. **Medical mycology**, v. 43, n. 1, p. 27-38, 2005.

VILLENA, S. N.; PINHEIRO, R. O.; PINHEIRO, C. S.; NUNES, M. P.; TAKIYA, C. M.; DOS REIS, G. A.; PREVIATO, J. O.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; FREIRE-DE-LIMA, C. G. Capsular polysaccharides galactoxylomannan and glucuronoxylomannan from *Cryptococcus neoformans* induce macrophage apoptosis mediated by Fas ligand. **Cellular microbiology**, v. 10, n. 6, p. 1274-1285, 2008.

WANG, Y.; AISEN, P.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: mechanism of action. **Infection and immunity**, v. 63, n. 8, p. 3131-3136, 1995.

WANG, Y.; CASADEVALL, A. Decreased susceptibility of melanized *Cryptococcus neoformans* to UV light. **Applied and environmental microbiology**, v. 60, n. 10, p. 3864-3866, 1994.

WANKE, B.; LAZÉRA, M. S.; NUCCI, M. Fungal infections in the immunocompromised host. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 153-158, 2000.

ZARAGOZA, O.; RODRIGUES, M. L.; DE JESUS, M.; FRASES, S.; DADACHOVA, E.; CASADEVALL, A. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Advances in applied microbiology**, v. 68, p. 133-216, 2009.

V. ANEXOS

5.1 Artigo

INVESTIGAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE *Cochlospermum regium* (Mart & Schrank) Pilger (Bixaceae) E EM COMBINAÇÃO COM FLUCONAZOL FRENTE A *Cryptococcus gattii*

XXX¹, XXX², XXX³

Universidade Federal da Grande Dourados, UFGD - Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais – Itaum Km 12. 798000-000 Dourados MS.

RESUMO

Cryptococcus gattii é um dos agentes etiológicos da criptococose, doença que afeta o sistema nervoso central e pulmões, tanto em pacientes imunocomprometidos, como também em pacientes saudáveis. *Cochlospermum regium*, popularmente conhecida como Algodãozinho, apresenta grande importância popular, devido a grandes quantidades de compostos secundários presentes e de ser utilizado para diversos fins terapêuticos pela população brasileira. O presente trabalho avaliou a atividade antifúngica do extrato etanólico das folhas de *Cochlospermum regium* e sua interação com fluconazol frente a isolados de *Cryptococcus gattii*. O extrato etanólico apresentou atividade antifúngica de 125 µg/mL para isolados de escarro, 62,5 µg/mL para isolado de líquor e 250 µg/mL na ATCC utilizada como referência. Para avaliação da combinação do extrato etanólico e fluconazol, todos os espécimes testados apresentaram valores indiferentes. O presente estudo pôde contribuir com novas informações para a área de pesquisa, e pode ser um ponto de referência para o desenvolvimento de novos antifúngicos no tratamento da criptococose.

Palavras-chave: Algodãozinho. Criptococose. Antifúngicos naturais.

I. INTRODUÇÃO

No Brasil, a criptococose é a segunda micose sistêmica com maior número de morte e em pacientes soropositivos e a principal causa de mortes devido a doenças fúngicas (Prado et al., 2009). A disseminação da criptococose em pacientes com HIV abrange quase um terço dos pacientes deste grupo (Colombo & Rodrigues, 2015). A ocorrência da doença chega a um milhão de pacientes anualmente, relatando um índice de mortalidade de cerca de 600.000 pessoas (Park et al., 2009; Rodrigues et al., 2011).

A infecção é causada por leveduras do gênero *Cryptococcus*, sendo *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans* as espécies responsáveis por quase todos os casos de criptococose em humanos (Chen et al., 2013). Quando infectados por *C. gattii*, os pacientes apresentam um maior número de sequelas neurológicas em comparação a pacientes infectados com *C. neoformans*, necessitando um maior tempo de tratamento. Infecções causadas por *C. gattii* são mais comuns em pacientes imunocompetentes e há grande propensão a causar doenças no sistema nervoso central (Harris et al., 2011).

Para o tratamento de criptococose é utilizada principalmente a combinação de fluconazol e anfotericina B ou anfotericina B e 5-flucitosina. Porém, a utilização da anfotericina B apresenta alta toxicidade, alto custo podendo prejudicar o tratamento ao fungo, e a utilização da 5-flucitosina é proibida no Brasil. Estudos relatam que o uso da combinação de fluconazol e anfotericina B podem apresentar variações de resposta do organismo, variando de sinérgico até mesmo a antagônico. (Soares et al., 2008; Santos et al., 2012; Loyse et al., 2013).

Cochlospermum regium (Mart. & Schr.) conhecida como algodãozinho ou algodãozinho-do-cerrado, difundida ao longo do cerrado brasileiro, no Paraguai e Bolívia (Souza & Lorenzi, 2008). Possui grande importância popular, por apresentar atividade antimicrobiana, analgésica e antidermatogênica (Castro et al., 1994; Oliveira et al., 1994). A partir do apresentado, o presente trabalho tem como finalidade avaliar *in vitro* a atividade antifúngica de *Cochlospermum regium* e sua combinação com fluconazol frente a *Cryptococcus gattii*.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e extração

As folhas de *Cochlospermum regium* (Mart & Schrank) Pilger (Bixaceae) foram obtidas na fazenda “Mata dos Macacos”, nos pontos S 22° 08' 47.2" / W 054° 54' 54.1" na cidade de Dourados, MS - Brasil. Com identificação da espécie pela Prof. Dra. Zefa Valdivia Pereira, da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais (FCBA) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) sob registro DDMS 5001.

As folhas de *Cochlospermum regium* (Mart & Schrank) Pilger (Bixaceae) foram tratadas e secas em estufa de ar circulante à uma temperatura de 30 °C por um período de 10 dias. O material vegetal foi triturado em moinho de facas e depois foi adicionado 1000 mL de álcool etílico e deixado a temperatura ambiente com agitações ocasionais. Após 72 horas foi filtrado em papel filtro e o extrato vegetal foi concentrado em rota-evaporador (Rotaevapor R – 215) à 35 °C para completa eliminação do solvente orgânico. O extrato etanólico foi liofilizado (ValuPump VLP80 Savan) para obter um extrato seco e puro e armazenado sob refrigeração de 4 °C até sua utilização para os testes biológicos.

2.2 Microrganismos

Os microrganismos utilizados para os testes de atividade biológica foram provenientes da *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD, USA) (*Cryptococcus gattii* ATCC 56990) e de espécimes clínicos isolados de escarro e líquido (32 GL, 476 E e 2164 BP). As leveduras foram obtidas da coleção do Laboratório de Pesquisas Microbiológicas da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

2.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato

A susceptibilidade antifúngica foi avaliada por meio da técnica de microdiluição em caldo, com base na metodologia descrita pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* M27-A3 (CLSI, 2008) com alterações para utilização do extrato etanólico da planta. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada em microplacas de 96 poços (Nunclon, Delta, Nunc A/S, Roskilde, Denmark).

O extrato etanólico das folhas de *Cochlospermum regium* foi dissolvido em 1 mL de Dimetilsulfoxido (DMSO, Sigma-Aldrich), em seguida, diluído em RPMI 1640. Posteriormente, foram feitas diluições seriadas em placas de 96 poços com concentração inicial de 1,95 µg/mL e final de 1000 µg/mL. O inóculo foi ajustado em espectrofotômetro na transmitância de 88% em 530 nm, para obtenção de uma concentração de 0,5-2,5 x 10⁶ UFC/mL. Para os microrganismos, foi utilizado o meio de cultivo RPMI 1640 (Sigma-Aldrich). As placas foram incubadas por 72 horas a 35 °C.

A concentração inibitória mínima foi considerada como a menor concentração do extrato que não apresentou crescimento visível de microrganismo após incubação. O teste foi realizado em duplicata em dois momentos distintos.

2.4 Teste de sinergismo “Checkerboard”

A realização do teste de sinergismo foi realizada de acordo com PILLAI et al., (2005), com adaptações.

As leveduras foram ajustadas em espectrofotômetro para obtenção da concentração de 0,5-2,5 x 10³ UFC/mL.

Oito diluições seriadas (1:2) do extrato etanólico das folhas de *Cochlospermum regium* (500 – 3,9 µg/mL) e fluconazol (64 – 0,5 µg/mL) foram preparadas em dimetilsulfoxido e água destilada esterilizada, respectivamente. O *checkerboard* foi preparado em microplacas de 96 poços para múltiplas combinações dos dois agentes antifúngicos. Diluições seriadas do extrato etanólico de *C. regium* e fluconazol foram distribuídos ao longo das linhas e colunas, formando uma matriz de combinações de diferentes concentrações. As colunas 10 e 11 foram utilizadas como CIM separadas para posterior avaliação do efeito sinérgico. Foram adicionados 100 µL de inóculo nos poços das colunas 2 a 12 e cultivadas por 48 a 72 horas a 35 °C.

A concentração inibitória fracionaria (CIF) foi calculada como a CIM da combinação dividido pela CIM sozinha do extrato etanólico e o mesmo cálculo para o fluconazol. O índice da CIF foi calculado com a somatória de ambos e interpretado de acordo com Lewis et al., 2002: como valores $\leq 0,5$ foram considerados sinérgicos, $0,5 < \sum CIF < 1$ considerados aditivo, $1 \leq \sum CIF < 4$ considerados indiferentes e valores ≥ 4 foram considerados antagonistas.

III. RESULTADOS

O extrato etanólico das folhas de *Cochlospermum regium* apresentou atividade antifúngica para todas as leveduras *C. gattii* testadas e a CIM variou de 62,5 a 250 µg/mL (Tabela 1).

Tabela 1. Concentração inibitória mínima do extrato etanólico das folhas de *Cochlospermum regium* frente a espécimes de *Cryptococcus gattii*.

Microrganismo	Origem	CIM (µg/mL)
476	Escarro	125
2164	Escarro	125
32	Líquor	62,5
<i>C. gattii</i> ATCC 56990	Referência	250

CIM: Concentração Inibitória Mínima

Cryptococcus gattii ATCC 56990 utilizada como referência, apresentou uma concentração inibitória mínima de 250 µg/mL, valor maior que o apresentado para os espécimes clínicos que variaram de 62,5 µg/mL a 125 µg/mL.

Tabela 2. Concentração inibitória mínima do extrato etanólico das folhas de *Cochlospermum regium* e do fluconazol, e concentração inibitória fracionária, frente a espécimes de *Cryptococcus gattii*.

Microrganismo	CIM_a	CIM_b	CIF	∑CIF
476	125	8	0,25 1	1,25
2164	125	32	0,5 0,5	1
32	62,5	16	2 0,5	2,5
<i>C. gattii</i> ATCC 56990	250	16	0,5 0,5	1

CIM_a: CIM do extrato sozinho; CIM_b: CIM do fluconazol sozinho;
CIF: Concentração inibitória fracionária.

O extrato etanólico apresentou os mesmos valores no ensaio de sinergismo que os apresentados no teste de microdiluição em caldo, e os valores de concentração inibitória mínima do fluconazol apresentou uma variação de 8 a 32 µg/mL. Os valores obtidos da

combinação entre o extrato e o fluconazol foram de Σ CIF de 1 (ATCC e escarro), 1,25 (escarro) e 2,5 (líquor) e todos os valores são considerados indiferentes segundo Lewis et al., 2002.

IV. DISCUSSÃO

Toxicidade, alto custo e resistência tornaram-se problemas no combate a criptococose (Soares et al., 2008), o que realça a necessidade da busca por diferentes agentes antifúngicos, que possa ser utilizado em combinação a antifúngicos comerciais, visto a dificuldade no tratamento desta doença. O extrato etanólico das folhas de *Cochlospermum regium* mostrou-se um promissor antifúngico a ser utilizado em combinação ao fluconazol.

As plantas produzem como defesa uma variedade de compostos secundários com potencial antimicrobiano, devido a patogenicidade de microrganismos no meio ambiente (Assunccedil et al., 2013). *Cochlospermum regium* apresenta uma grande diversidade de compostos, como saponinas, taninos, compostos fenólicos e flavonoides, este último apresenta estudos que comprovam ação antimicrobiana de seus derivados (Manayi et al., 2013).

Santos et al. (2012), evidenciaram que o extrato bruto das folhas de *Cochlospermum regium* apresentou atividade antifúngica frente a diferentes espécies de *Candida*. O que fomenta a hipótese de os compostos secundários da planta possuírem atividade antifúngica, como apresentado neste trabalho.

Zeng et al. (2016), avaliaram a atividade anti-*Cryptococcus* do óleo essencial de *Coreopsis tinctoria* e verificou atividade antifúngica significativamente melhor que os antifúngicos comumente utilizados. *C. tinctoria* é uma planta rica em muitos compostos fitoquímicos, como flavonoides e saponinas (Abdureyim et al., 2013; Zhang et al., 2011; Emet et al., 2010). Já Lima et al. (2016), comprovaram que flavonas derivadas de *Pterogyne nitens* apresentaram atividade antifúngica frente a espécies de *Cryptococcus* e *Candida*.

Endo et al. (2010), confirmaram efeito sinérgico na combinação de um composto isolado do extrato de *Punica granatum* e fluconazol, frente a isolados de *Candida spp.*, levedura responsável por um grande número de mortes, apresentando concentração

inibitória fracionária (CIF) de 0,25. Um estudo realizado por Sangalli-Leite et al. (2016) comprovou que a utilização de pedalitin, composto derivado de *Nitens Pterogyne*, em combinação com anfotericina B, mostrou-se mais eficiente que o uso de AMB sozinho frente a *Cryptococcus* spp.

Outro estudo relatando a utilização de composto natural em combinação com antifúngicos, foi desenvolvido por Silva e colaboradores (2016), onde o composto curcumina em associação com o fluconazol para verificar a atividade frente a *Cryptococcus gattii*, onde apresentou valores de CIF entre 0,79 e 2,29. Estes estudos demonstraram que a utilização de extratos vegetais ou seus derivados em combinações com antifúngicos sintéticos comerciais, mostra-se um método eficaz contra leveduras de interesse clínico, e também uma alternativa contra o desenvolvimento de resistência por esses microrganismos.

V. CONCLUSÃO

O presente trabalho pôde contribuir com novos conhecimentos para a área de bioprospecção de plantas do cerrado brasileiro. O extrato etanólico das folhas de *Cochlospermum regium* apresentou atividade frente a isolados de *Cryptococcus gattii*, e mostrou ser uma alternativa para o tratamento da criptococose em combinação com o fluconazol. Assim, esse estudo pode ser um ponto de direcionamento para novas pesquisas da área e para o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdureyim, A., Abliz, M., Sultan, A., & Eshbakova, K. A. (2013). Phenolic compounds from the flowers of *Coreopsis tinctoria*. *Chemistry of Natural Compounds*, 48(6), 1085-1086.

Assunccedil, M. R., Santiago, R. R., Langassner, S. M. Z., Svidzinski, T. I. E., & Soares, L. A. L. (2013). Antifungal activity of medicinal plants from Northeastern Brazil. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(40), 3008-3013.

Castro, M., De Siqueira, J. M., Paz-Vieira, I. C., & Kassab, N. M. (1994). Estudos sobre o efeito analgésico e anti-edematogênico de uma flavanona isolada de *Cochlospermum regium*, “algodãozinho”. XIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. Fortaleza: UFC.

Chen, M., Pan, W. H., & Boekhout, T. (2013). *Cryptococcus gattii* infections in China: extent of the problem. *Chin Med J (Engl)*, 126(2), 203-205.

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2008). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard M27-A3. 3rd ed.; Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Colombo, A. C., & Rodrigues, M. L. (2015). Fungal colonization of the brain: anatomopathological aspects of neurological cryptococcosis. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, (AHEAD), 00-00.

dos Santos, K. T. J., Silva, W. C., Torquato, H. F. V., Selhorst, A. M., Beserra, S., dos Santos, R. A. N., & da Silva Junior, I. F. (2015). Abordagem Fitoquímica Preliminar e Avaliação da Atividade Antimicrobiana de *Cochlospermum regium* em Diferentes Metodologias (Bioautografia, Disco-Difusão e Microdiluição). *UNICIÊNCIAS*, 16(1).

EMET, M., ABLISE, M., & Lei, M. (2010). Content determination of water soluble total flavonoids in *Coreopsis tinctoria* flowers from Kunlun Mountain [J]. *Strait Pharmaceutical Journal*, 10, 028.

Endo, E. H., Cortez, D. A. G., Ueda-Nakamura, T., Nakamura, C. V., & Dias Filho, B. P. (2010). Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*. *Research in Microbiology*, 161(7), 534-540.

Harris, J. R., Lockhart, S. R., Debess, E., Marsden-Haug, N., Goldoft, M., Wohrle, R., ... & Chiller, T. (2011). *Cryptococcus gattii* in the United States: clinical aspects of infection with an emerging pathogen. *Clinical infectious diseases*, 53(12), 1188-1195.

Lewis, R. E., Diekema, D. J., Messer, S. A., Pfaller, M. A., & Klepser, M. E. (2002). Comparison of Etest, checkerboard dilution and time–kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49(2), 345-351.

Lima, C. S., Polaquini, C. R., dos Santos, M. B., Gullo, F. P., Leite, F. S., Scorzoni, L., ... & Regasini, L. O. (2016). Anti-*Candida* and anti-*Cryptococcus* evaluation of 15 non-

alkaloidal compounds from *Pterogyne nitens*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(10), 841-845.

Loyse, A., Dromer, F., Day, J., Lortholary, O., & Harrison, T. S. (2013). Flucytosine and cryptococcosis: time to urgently address the worldwide accessibility of a 50-year-old antifungal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, dkt221.

Oliveira, C. C., J. M. Siqueira, K. C. B. Souza, U. M. Resende. (1994) Avaliação da atividade antibacteriana da raiz de *Cochlospermum regium* “algodãozinho”, In: Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, 13, Fortaleza, CE. Anais, p.155.

Park, B. J., Wannemuehler, K. A., Marston, B. J., Govender, N., Pappas, P. G., & Chiller, T. M. (2009). Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *Aids*, 23(4), 525-530.

Pillai, S. K.; Moellering, R. C.; Eliopoulos, M. (2005). Antimicrobial combinations. *Antibiotics in laboratory medicine*, v. 5, p. 365-440.

Prado, M., Silva, M. B. D., Laurenti, R., Travassos, L. R., & Taborda, C. P. (2009). Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(3), 513-521.

Rodrigues, M., Nimrichter, L., Cordero, R., & Casadevall, A. (2011). Fungal polysaccharides: biological activity beyond the usual structural properties. *Frontiers in microbiology*, 2, 171.

Sangalli-Leite, F., Scorzoni, L., da Silva, J. D. F., de Oliveira, H. C., de Lacorte Singulani, J., Gullo, F. P., ... & Fusco-Almeida, A. M. (2016). Synergistic effect of pedalitin and amphotericin B against *Cryptococcus neoformans* by in vitro and in vivo evaluation. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 48(5), 504-511.

Santos, J. R. A., Gouveia, L. F., Taylor, E. L. S., Resende-Stoianoff, M. A., Pianetti, G. A., César, I. C., & Santos, D. A. (2012). Dynamic interaction between fluconazole and amphotericin B against *Cryptococcus gattii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(5), 2553-2558.

Silva, D. L., Magalhães, T. F. F., Santos, J. R. A., Paula, T. P., Modolo, L. V., Fátima, A., ... & Resende-Stoianoff, M. A. (2016). Curcumin enhances the activity of fluconazole against *Cryptococcus gattii*-induced cryptococcosis infection in mice. *Journal of applied microbiology*, 120(1), 41-48.

Soares, B. M., Santos, D. A., Kohler, L. M., da Costa César, G., de Carvalho, I. R., dos Anjos Martins, M., & Cisalpino, P. S. (2008). Cerebral infection caused by *Cryptococcus gattii*: a case report and antifungal susceptibility testing. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25(4), 242-245.

Souza, V., & Lorenzi, H. (2008). *Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II*.

Zeng, H., Li, T., Ding, H., & Tian, J. (2016). Anti-*Cryptococcus* Activity and Mechanism of Essential Oil from *Coreopsis tinctoria* Flowering on *Cryptococcus*. *Fungal Genom Biol*, 6(132), 2.

Zhang Y., et al. Measurement of saponin content in *Coreopsis tinctoria* from Uygur Kunlun mountain. *Journal of Northwest Medicine (China)*, v.26, p. 87-88, 2011.



INDUSTRIAL CROPS AND PRODUCTS

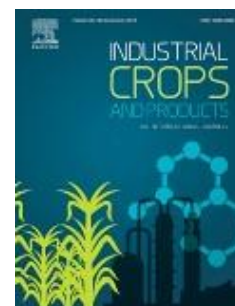
An International Journal

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF

CONTENTS

- **Description** p.1
- **Audience** p.2
- **Impact Factor** p.2
- **Abstracting and Indexing** p.2
- **Editorial Board** p.2 ● **Guide for Authors** p.5



ISSN: 0926-6690

DESCRIPTION

Industrial Crops and Products is an International Journal publishing academic and industrial research on industrial (**defined as non-food/non-feed**) crops and products. Papers concern both crop-oriented and bio-based materials from crops-oriented research, and should be of interest to an international audience, hypothesis driven, and where comparisons are made statistics performed. The following are examples of research that fit within the scope of the journal.

The emphasis must be on plants. Non-plant research, for instance animal, algae, microorganisms, and medical oriented research are not within the scope of the journal. 2. Non-food/non-feed products (bio-based materials) from specific crops. Food/feed uses can be mentioned, but the majority of data and emphasis in the Discussion must be on non-food/non-feed uses of plants and plant products. Cultural practices to improve production of industrial crops and products. Experiments should be run at least twice, whether performed in the field, greenhouse, growth chamber, and in tissue culture or micropropagation, to account for environmental variation and/or genotype x environment interactions. Germplasm development and breeding of industrial crops. New or alternative crops with potential industrial uses. a. The manuscript should include an evaluation of the real potential to make a plant an industrial crop, not just information on plants gathered in natural habitats (many plants make products, but they will not become a crop). An economic analysis may be included as appropriate.

b. Industrial Crops and Products is a crop oriented journal; these can be field crops, horticultural crops, or forest crops, but they must be managed, not just collected natural stands. The focus should be on agricultural production as an end result. Plant products, tied to specific crops/plants, and their modification to meet new industrial uses. For instance, for nanoparticles, a direct link is required with an industrial crop or with the respective value-chain. Testing industrial uses of specific plant products. Processing research to improve recovery of specific plant products.

For more information/suggestions/comments please contact AuthorSupport@elsevier.com

Benefits to authors

We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please click here for more information on our [author services](#).

Please see our [Guide for Authors](#) for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our support pages: <http://support.elsevier.com>

AUDIENCE

Scientists in the areas of agronomy, crop protection, post-harvest and processing research, product testing and evaluation, distribution, marketing and economics.

IMPACT FACTOR

2015: 3.449 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2016

ABSTRACTING AND INDEXING

AGRICOLA

Elsevier BIOBASE

Chemical Abstracts

Current Contents/Agriculture, Biology & Environmental Sciences

EMBASE

Environmental Abstracts

GEOBASE

CAB Abstracts

Scopus

EMBiology

EDITORIAL BOARD

Editors-in-Chief:

N. Belgacem, INPG, St Martin d'Herès, France

M.T. Berti, North Dakota State University, Fargo, North Dakota, USA

E. Frollini, Macromolecular Materials and Lignocellulosic Fibers Group, Institute of Chemistry of Sao Carlos University of Sao Paulo Carlos, Sao Paulo, Brazil

M.J. Pascual-Villalobos, Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario, La Alberca, Murcia, Spain

Managing Editors:

D.S. Bajwa, North Dakota State University, Fargo, North Dakota, USA

M. Blohm, Loyola University Maryland, Baltimore, Maryland, USA

L. S. Severino, EMBRAPA Brazil, Campina Grande-PB, Brazil

W. Thielemans, KU Leuven, Kortrijk, Belgium

Associate Editors

J. Bras, Grenoble INP - Pagora, St. Martin d'Hères Cedex, France

J. González-Álvarez, Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain

O. Koul, Insect Biopesticide Research Centre, Jalandhar, India

J. Labidi, Universidad del Pais Vasco (Basque Country), San Sebastian, Spain

Z. Liu, ARS USDA, Peoria, Illinois, USA

W.W. Schloman Jr., Stow, Ohio, USA

R.C. Sun, Beijing Forestry University, Beijing, China

Editorial Advisory Board

H. Abdel-Haleem, US Arid-Land Agricultural Research Center, Maricopa, Arizona, USA

Agronomics; biodiesel; biofuel; new industrial crops; oil seed crops; plant breeding; plant genetics; plant genomics; plant genetic resources; plant physiology (abiotic stress); natural rubber; natural rubber plants.

E. Alexopoulou, Center for Renewable Energy Sources and Saving-CRES, Athens, Greece

Non-Food Crops

A. Ashori, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran

Non-wood fibers; pulp and paper technology; wood-plastic composite; wood cement bonded composite; fibres

A Biswas, USDA/ARS/NCAUR, Peoria, Illinois, USA

J-F. Bloch, Grenoble INP - Pagora, St. Martin d'Hères Cedex, France

Mechanics of fibres and fiber mats; structure; simulation; heat and mass transfer; optics

S. Boufi, University of Sfax, Sfax, Tunisia

Natural fibres based composites; nanocomposite based on nanosized cellulose filler; surface modification of cellulose fibres

A.J.F. Carvalho, Universidade de São Paulo (USP), São Carlos -SP-, Brazil

Starch; thermoplastic starch; polymers and monomers from renewable resources; cellulose fibers and nanofibers

S.C. Cermak, U.S. Department of Agriculture (USDA), Peoria, Illinois, USA

Chemistry; Organic; New Crops; Lubricants; Distillation

R. Chhabra, Indian Institute of Technology (I.I.T.) Kanpur, Kanpur, India

Non-Newtonian behaviour; rheology; viscoelasticity; yield stress; shear-thinning; shear-thickening; thixotropy; food processing; baking characteristics.

M.J. Cocero Alonso, Universidad de Valladolid, Valladolid, Spain

T.A. Coffelt, U.S. Department of Agriculture (USDA), Agricultural Research Service (ARS), Maricopa, Arizona,

USA

Plant breeding (germplasm evaluation and enhancement); genetics and agronomics (planting and harvesting dates, water use, fertility, plant populations, cropping systems, etc.) of oilseed crops and guayule.

K. Cornish, The Ohio State University, Wooster, Ohio, USA rubber; plant physiology; biomass; biofuels; resins.

M.D. Curt, Universidad Politécnica de Madrid (UPM), Madrid, Spain

Crops for biomass and biofuels; agronomy; improvement and processing

D.A. Dierig, Bridgestone Americas, Inc., Eloy, Arizona, USA

Oilseeds, plant genetic resources, new industrial crop breeding.

S.Z. Erhan, U.S. Department of Agriculture (USDA), Agricultural Research Service (ARS), Wyndmoor, Pennsylvania, USA

fats and oils, polymerization, chemical engineering, ink, lubricant, grease, metal working fluids, industrial uses of vegetable oils, biodiesel, bioethanol, bio oil

R.L. Evangelista, U.S. Department of Agriculture (USDA), Agricultural Research Service (ARS), Peoria, Illinois,

USA

Postharvest handling of crops; crop processing; oilseed processing; vegetable oil refining; plant oil characterization; seed protein characterization

M. Faisal, King Saud University, Riyadh, Saudi Arabia

in vitro morphogenesis, tissue culture and genetic transformation in plants of economic and medicinal importance; characterization of regenerated plants using molecular markers and flow cytometry and also the estimation of genetic diversity using DNA-based markers.

M. Foster, Texas A&M University, College Station, Texas, USA the production agriculture aspects of natural rubber and oilseed crops

A. Gandini, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal

Chemistry of vegetal biomass; furan and furanics

R. Gesch, U.S. Department of Agriculture (USDA), Agricultural Research Service (ARS), Morris, Minnesota, USA Agronomy of oilseed crops (e.g. influence of agronomic practices and environment on crop growth and yield, including seed oil content and composition); crop water use; photosynthesis; plant carbohydrate metabolism and usage

M. Hanna, University of Nebraska at Lincoln, Lincoln, Nebraska, USA

Extrusion; biodiesel and biopolymers

X. He, U.S. Department of Agriculture (USDA), Agricultural Research Service (ARS), Albany, California, USA

Molecular biology; Protein detection methods; Food safety; Food contaminants and Protein toxins

M.A. Jackson, U.S. Department of Agriculture (USDA), Peoria, Illinois, USA

Catalytic conversion of fats and oils

D. Jasso de Rodriguez, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila, Mexico

medicinal and nutraceuticals; antioxidants; waxes; resins; latices; guayule and phytochemicals of the plants of the semiarid lands

S. Korkut, Duzce University, Duzce, Turkey

Fibres and fibre compounds; natural fibres-based composites; waxes; resins; gums; rubber and other polymers; composites and reconstituted products; energy and chemicals from forest biomass; nonwood forest products; adhesives for wood; bonding strength; contact angles; adhesion by chemical bonding; mechanical properties of adhesives; surface roughness/morphology; wood-based composite materials and their applications.

M-P. Laborie, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Freiburg, Germany

particle boards; wood; wood adhesive; nanocellulose; cellulosic composites; adhesion; interface properties; bio-based adhesives

D. Lachenal, Grenoble INP - Pagora, St. Martin d'Hères Cedex, France pulping; lignin; bleaching; biorefinery from lignocellulosics **L. Lazzeri**, Research Institute for Industrial Crops, Bologna, Italy

Crops for soil remediation; biofumigation; oilseeds

A. Monti, University of Bologna, Bologna, Italy biofuels; biomass; bioenergy crops

D. Pasquini, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlandia MG, Brazil

vegetal macromolecules; cellulosic fibers; composites; nanocellulose; nanocomposites; polymers from renewable sources

R. Pavela, Crop Research Institute, Prague, Czech Republic botanical insecticides

W.B. Phippen, Western Illinois University, Macomb, Illinois, USA oil seed crops; plant breeding; genetics; agronomy; GC oil analysis

D. Pioch, CIRAD, Montpellier Cedex 5, France

oleaginous, oleochemistry (especially palms); extraction of active compounds, especially forest products (water and supercritical CO₂ based); biorefinery (cascade extraction of a range of useful compounds, from a single biomass, including deconstruction of lignocellulose; Ultra and microfiltration for separating fractions

A. Pizzi, Université Henri Poincaré (Nancy I), Epinal Cedex 9, France particle boards; wood; wood adhesive

Y. Popineau, Institute National de la Recherche Agronomique, Nantes, France **D.A. Ravetta**, Museo Egidio Feruglio, Trelew, Chubut, Argentina new crops; arid lands; resins; specialty oils, secondary metabolites; eco-physiology

D.T. Ray, University of Arizona, Tucson, Arizona, USA

C. Regnault-Roger, Université de Pau et des Pays de l'Adour, Pau Cedex, France natural insecticides; essential oils; plant chemistry

R. Roseberg, Oregon State University, Klamath Falls, Oregon, USA Soil science; agronomic aspects of crop production

H. Ruiz, Autonomous University of Coahuila, Saltillo-Coahuila, Mexico

renewable energy, specifically in biorefinery process and bioethanol production of second generation using lignocellulosic materials (agricultural residues), hydrothermal process (autohydrolysis), simultaneous saccharification and bioethanol fermentation and modeling of enzymatic hydrolysis.

A.J.D. Silvestre, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal extractives; GC-MS

D. Turley, National Non-Food Crops Centre, York, England, UK

non food crops in general; economic aspects; processing; rural strategies; agronomy of non-food crops; biofuels and bioenergy applications; bio-based materials

P. Velmurugan, Chonbuk National University, Jeonbuk, South Korea **G. Wang**, University of Arizona, Maricopa, Arizona, USA crop production, nutrient management, crop rotation, and tillage management.

J Xiao, Macau University of Science and Technology, Taipa, Macau, China

Medicinal plants, polyphenols, flavonoids, natural products, bioactivity, antioxidants

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Industrial Crops and Products, an International Journal, publishes papers reporting the results of original research, short communications and critical reviews on all aspects of industrial crops and products (defined as non-food/non-feed uses of plants and plant products). This covers a wide range of aspects of cultivation, crop improvement, crop compounds, processing, and integrated chain control, all focusing on the exploitation of agricultural crops for industrial use.

The scope of the journal covers a vast range of crops and research disciplines. Crops should contain significant renewable resources such as:

- Fibres and fibre compounds
- Carbohydrates
- Oils and fatty acids
- Waxes, resins, gums, rubber, and other polymers
- Proteins
- Essential oils for ink, lubricants, plastics, cosmetics
- Biologically active compounds for pharmaceutical, herbicides and insecticides, and preservatives.

Some examples of industrial (non-food/non-feed uses) crops are agave, cassava, crambe, cuphea, elephant grass, fibre hemp, flax, guar, guayule, jojoba, kenaf, lesquerella, maize, meadowfoam, oil palm, peas, plantago, potato, pyrethrum, rape seed, safflower, soybean, Stokes aster, sugar beet, sunflower, vernonia, and wheat.

Papers within the above indicated frame-work will be accepted if they cover or integrate research on:

- Agronomic production and modelling
- Breeding, genetics, and biotechnology
- Post-harvest treatment and storage
- (Bio)process technology
- (Bio)chemistry
- Product testing, development, and marketing
- Economics, and systems analysis and optimization

Types of paper

1. Original research papers (regular papers)
2. Review articles
3. Short Communications
4. Book Reviews

Original research papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

Review articles Review articles should cover subjects falling within the scope of the journal which are of active current interest. We welcome reviews but authors should contact the Editors-in-Chief before submission to ensure appropriateness for publication.

A *Short Communication* is a concise but complete description of a limited investigation, which will not be included in a later paper. Short Communications should be as completely documented, both by reference to the literature and description of the experimental procedures employed, as a regular paper. They should not occupy more than 4 printed pages (about 8 manuscript pages, including figures, tables and references).

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including theInternet)

- Relevant declarations of interest have been made
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Declaration of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. [More information](#).

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [CrossCheck](#).

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. [More information](#).

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the Open Access Publication Fee. Details of [existing agreements](#) are available online.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups throughout [universal access programs](#).
- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following [Creative Commons user licenses](#):

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 3000**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our [green open access page](#) for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. [Find out more](#).

This journal has an embargo period of 24 months.

Elsevier Publishing Campus

The Elsevier Publishing Campus (www.publishingcampus.com) is an online platform offering free lectures, interactive training and professional advice to support you in publishing your research. The College of Skills training offers modules on how to prepare, write and structure your article and explains how editors will look at your paper when it is submitted for publication. Use these resources, and more, to ensure that your submission will be the best that you can make it.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's WebShop.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Submit your article

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/indcro/>

PREPARATION*Use of wordprocessing software*

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. Do not embed "graphically designed" equations or tables, but prepare these using the wordprocessor's facility. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier:

<http://www.elsevier.com/guidepublication>). Do not import the figures into the text file but, instead, indicate their approximate locations directly in the electronic text and on the manuscript. See also the section on Electronic illustrations. **Lines should be doublespaced and every line and page should be numbered.**

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the "spell-check" and "grammar-check" functions of your wordprocessor.

Article structure*Subdivision - numbered sections*

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view [example Highlights](#) on our information site.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article. Try not to over-use abbreviations.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Nomenclature and Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Authors and Editor(s) are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the *International Code of Botanical Nomenclature*, the *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Zoological Nomenclature*.

All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals.

All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.

For chemical nomenclature, the conventions of the *International Union of Pure and Applied Chemistry* and the official recommendations of the *IUPAC-IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature* should be followed.

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible. In principle, variables are to be presented in italics.

Number consecutively any equations that have to be displayed separate from the text (if referred to explicitly in the text).

Subscripts and superscripts should be clear.

Greek letters and other non-Roman or handwritten symbols should be explained in the margin where they are first used. Take special care to show clearly the difference between zero (0) and the letter O, and between one (1) and the letter l.

Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used. For simple fractions use the solidus (/) instead of a horizontal line.

Equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. In general only equations explicitly referred to in the text need be numbered.

The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Also powers of e are often more conveniently denoted by exp.

Levels of statistical significance which can be mentioned without further explanation are: *P < 0.05, **P < 0.01 and ***P < 0.001.

In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g., Ca²⁺, not as Ca⁺⁺. Isotope numbers should precede the symbols, e.g., ¹⁸O.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Electronic artwork General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.

- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here. *Formats*

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in-press and full citation details are not yet known, but the article is available online. A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <http://dx.doi.org/10.1029/2001JB000884i>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. This identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#) and [Zotero](#), as well as [EndNote](#). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/industrial-crops-and-products>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication. Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically. Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13.03.03).

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. Mendeley Data, v1. <http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary material

Supplementary material can support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Please note that such items are published online exactly as they are submitted; there is no typesetting involved (supplementary data supplied as an Excel file or as a PowerPoint slide will appear as such online). Please submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. If you wish to make any changes to supplementary data during any stage of the process, then please make sure to provide an updated file, and do not annotate any corrections on a previous version. Please also make sure to switch off the 'Track Changes' option in any Microsoft Office files as these will appear in the published supplementary file(s). For more detailed instructions please visit our [artwork instruction pages](#).

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. [More information and examples are available](#). Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Interactive plots

This journal enables you to show an Interactive Plot with your article by simply submitting a data file. [Full instructions](#).

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Webshop](#). Corresponding authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).