



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO DELTA DO PARNAÍBA
CAMPUS MINISTRO REIS VELLOSO
CURSO DE BIOMEDICINA



AIRTON LUCAS SOUSA DOS SANTOS
FRANCISCO ALEX DA ROCHA COELHO

**XYLODIOL DE *Xylopi* *langsdorffiana* APRESENTA ATIVIDADE ANTI-*Leishmania*
amazonensis ASSOCIADA À ATIVAÇÃO MACROFÁGICA**

PARNAÍBA
2022

AIRTON LUCAS SOUSA DOS SANTOS
FRANCISCO ALEX DA ROCHA COELHO

**XYLODIOL DE *Xylopi* *langsdorffiana* APRESENTA ATIVIDADE ANTI-*Leishmania*
amazonensis ASSOCIADA À ATIVAÇÃO MACROFÁGICA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Biomedicina da Universidade
Federal do Delta do Parnaíba, Campus
Ministro Reis Velloso, como requisito para
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Klinger Antonio da Franca Rodrigues

PARNAÍBA

2022

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Delta do Parnaíba
Biblioteca Central Prof. Cândido Athayde

S237x Santos, Airton Lucas Sousa dos
Xylodiol de *Xylopia langsdorffiana* apresenta atividade anti-*Leishmania amazonensis* associada à ativação macrofágica [recurso eletrônico] / Airton Lucas Sousa dos Santos, Francisco Alex da Rocha Coelho. – 2022

1 Arquivo em PDF.

TCC (Bacharelado em Biomedicina) – Universidade Federal do Delta do Parnaíba, 2022.

Orientação: Prof. Dr. Klinger Antônio da Franca Rodrigues.

1. Atividade Antileishmania. 2. *Leishmania amazonensis*. 3. Xylodiol.
I. Coelho, Francisco Alex da Rocha. II. Título.

CDD: 615.1



ATA DE APRESENTAÇÃO DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos 14 dias do mês de outubro de 2022, às 14:30 horas, em sessão remota, via plataforma virtual Google meet, na presença da Banca Examinadora presidida pelo Prof. Dr. Klinger Antonio da Franca Rodrigues (Orientador) e composta pelas examinadoras: Profa. Dra. Ana Jérsia Araújo e Profa. Dra. Juliana Félix de Melo, os alunos Airton Lucas Sousa dos Santos e Francisco Alex da Rocha Coelho apresentaram o Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação em Biomedicina intitulado: **“XYLODIOL DE *Xylopi* *langsdorffiana* APRESENTA ATIVIDADE ANTI-*Leishmania amazonensis* ASSOCIADA À ATIVAÇÃO MACROFÁGICA”**, como requisito curricular indispensável à integralização de curso. Após reunião em sessão remota reservada, a banca examinadora deliberou e decidiu pela APROVAÇÃO do referido Trabalho de Conclusão de Curso, divulgando o resultado formalmente aos orientandos e aos demais presentes, e eu na qualidade de presidente da Banca, lavrei a presente ata que será assinada por mim, pelas demais componentes da Banca Examinadora e pelos alunos orientados.

Presidente e Orientador(a)

Examinador 1

Examinador 2

Orientando

Orientando(a)

XYLODIOL DE *Xylopia langsdorffiana* APRESENTA ATIVIDADE ANTI-*Leishmania amazonensis* ASSOCIADA À ATIVAÇÃO MACROFÁGICA

Airton Lucas Sousa dos Santos^{a#}, Francisco Alex da Rocha Coelho^{a#}, Thais Amanda de Lima Nunes^a, Julyanne Maria Saraiva de Sousa^a, Raiza Raianne Luz Rodrigues^a, Marcos Vinicius da Silva^b, Klinger Antonio da Franca Rodrigues^{a*}

^aLaboratório de Doenças Infecciosas, Campus Ministro Reis Velloso, Universidade Federal do Delta do Parnaíba, 64202-020, Parnaíba, PI, Brasil

^bLaboratório de Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas e Naturais, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, 38025-180, Uberada, MG, Brasil.

* Autor Correspondente

Klinger Antonio da Franca Rodrigues

Laboratório de Doenças Infecciosas, Campus Ministro Reis Velloso, Universidade Federal do Delta do Parnaíba, 65202-020, Parnaíba, PI, Brasil

Tel: +55 83 986363310 Email: klinger.antonio@gmail.com

^{1#} Os autores indicados contribuíram igualmente para o trabalho

Resumo

As leishmanioses destacam-se como a segunda maior doença parasitária de incidência no mundo, com elevados índices de morbimortalidade. São causadas por parasitos do gênero *Leishmania* e, devido aos efeitos tóxicos e ao aumento da resistência aos medicamentos, tem seu tratamento terapêutico limitado. Neste cenário, os produtos naturais possuem um importante papel, pois os metabólitos secundários produzidos pelas plantas são potenciais fontes de pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos. Diante disso, a busca por novos agentes quimioterápicos provenientes de fontes naturais para o tratamento das leishmanioses tem sido constante. Assim, considerando a problemática do tratamento das leishmanioses e ausência de estudos com o xylodiol, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade biológica do constituinte sobre as diferentes formas de *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*, bem como sua citotoxicidade e seus possíveis mecanismos de ação. O xylodiol foi mais ativo contra promastigotas (CI_{50} de $2,93 \pm 0,12 \mu M$) e amastigotas axênicas (CI_{50} de $1,8 \pm 0,05 \mu M$) do que o fármaco de referência antimoniato de meglumina. O composto também demonstrou ser mais efetivo sobre formas amastigotas intramacrofágicas, com CE_{50} de $1,68 \pm 0,06 \mu M$. Observou-se que o xylodiol apresenta atividade antileishmania em concentrações atóxicas para os macrófagos RAW 264.7 e células Vero, obtendo um índice de seletividade 52,64 e 5,32 vezes mais seletivo que a anfotericina B e o antimoniato de meglumina, respectivamente. Ademais, o constituinte apresentou efeitos indiretos contra os parasitos não só pelo aumento da capacidade fagocítica e do volume lisossomal, mas também pela indução ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico. Com isso, nossos resultados sugerem que o xylodiol é um candidato potencial para avaliação de modelos *in vivo* de leishmaniose tegumentar.

Palavras-chave: Atividade antileishmania. *Leishmania amazonensis*. xylodiol.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	7
2. Materiais e Métodos	9
2.1 Fármaco e reagentes	9
2.2 Cultivo dos parasitas, macrófagos RAW 264.7 e células da linhagem Vero	10
2.3 Atividade antileishmania do xylodiol sobre formas promastigotas e amastigotas axênicas de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	11
2.4 Avaliação da citotoxicidade da xylodiol em macrófagos RAW 264.7 e células Vero.....	11
2.5 Atividade antileishmania contra amastigotas intramacrofágica	12
2.6 Atividade lisossomal	13
2.7 Capacidade fagocítica.....	13
2.8 Avaliação da produção de óxido nítrico (NO).....	14
2.9 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs).....	14
2.10 Análise estatística	15
3. Resultados	15
3.1 Avaliação da atividade antileishmania do xylodiol sobre formas promastigotas e amastigotas axênicas de <i>L. amazonensis</i>	15
3.2 Avaliação da citotoxicidade do xylodiol sobre macrófagos RAW 264.7 e células da linhagem Vero	18
3.3 A eficácia do xylodiol contra amastigotas intramacrofágicas	19
3.4 Capacidade fagocítica e atividade lisossomal de macrófagos tratados com xylodiol	20
3.5 O xylodiol induz a produção de EROs e NO.....	21
4. Discussão.....	22
5. Conclusão	26
Referências	28
ANEXO I – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA	35

1. Introdução

As doenças tropicais negligenciadas (DTNs) são um grupo de doenças transmitidas por protozoários, helmintos, bactérias e vírus que estão, geralmente, associadas à pobreza e que afetam mais de 1,4 bilhão de pessoas em todo o mundo. Tais doenças são reconhecidas por não serem prioritárias pela indústria farmacêutica, recebendo menos investimento em pesquisa do que outras enfermidades, tendo, dessa forma, as opções de tratamento disponíveis ultrapassadas, precárias e, em certos casos, inexistentes [1].

Dentre as DTNs, as leishmanioses destacam-se como a segunda maior doença parasitária de incidência no mundo, com índice de morbimortalidade elevado, ficando atrás apenas da malária [2, 3]. A doença encontra-se disseminada nas áreas tropicais e subtropicais e situa-se presente em 98 países de todo o globo, com estimativa de 1,5 a 2 milhões de novos casos anualmente [4].

As leishmanioses são causadas por protozoários digenéticos da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*. Sua transmissão, por sua vez, ocorre por insetos vetores denominados flebotomíneos, pertencentes à ordem Diptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, gênero *Lutzomyia*, conhecidos popularmente como mosquito palha [5, 6].

As infecções por *Leishmania* sp. podem resultar em formas distintas de manifestações da doença, que estão diretamente relacionadas à resposta imunológica do hospedeiro e à variedade de espécies envolvidas nas infecções, sendo agrupadas em duas formas principais: a leishmaniose visceral (LV) que acomete órgãos internos, como o fígado e o baço; e a leishmaniose tegumentar (LT), que por sua vez ainda é subdividida em leishmaniose cutânea difusa, leishmaniose cutânea localizada, leishmaniose cutânea disseminada e leishmaniose mucocutânea, na qual são caracterizadas por afetar pele e membranas mucosas [7, 8, 9, 10].

Nesse ínterim, mesmo diante de um importante problema de saúde pública, o tratamento farmacológico para leishmaniose segue o mesmo padrão por mais de um século, sendo utilizado, atualmente, cinco fármacos. Dentre estes, destacam-se os antimonialis pentavalentes, a anfotericina B e a sua formulação lipossômica, a miltefosina, a paromomicina e a pentamidina. Contudo, tais fármacos apresentam graves efeitos tóxicos para o organismo, causando diversos efeitos colaterais, como cardiotoxicidade, danos renais e pancreatite, além de possuírem uma administração prolongada, na qual submete o paciente a um grande período de internação. Além disso, nos últimos anos foi observado um grande aumento de parasitas resistentes contra as drogas comumente utilizadas na terapêutica. Portanto, é urgente a reavaliação, em base global, das condições atuais de tratamento [11, 12]. Neste cenário, os produtos naturais possuem um importante papel, pois os metabólitos secundários produzidos pelas plantas são potenciais fontes de pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos [13].

A família Annonaceae é bastante conhecida por conta da sua diversidade de plantas, possuindo cerca de 2.300 espécies e aproximadamente 130 gêneros. Dentre as espécies de Annonaceae, a *Xylopia langsdorffiana* St.Hilaire & Tulasne, popularmente conhecida como pimenteira da terra, se destaca por ser bastante utilizada na medicina popular, para tratamento de reumatismo, doenças cardiovasculares, câncer, além de atuar como agente antimicrobiano [14]. Estudos fitoquímicos demonstraram que esta espécie apresenta como metabólitos secundários os diterpenos, dentre eles o ácido ent-7 α -acetoxitraquiloban-18-óico (traquilobano), ácido 8(17),12E,14-labdatrien-18-óico (labdano) e o ent-atisano-7 α ,16 α -diol (xylodiol) [15, 16]. O xylodiol vem apresentando, em alguns estudos, baixa citotoxicidade em diferentes linhagens de células e atividade contra formas epimastigotas e tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, tornando-o um composto promissor para o desenvolvimento de novos fármacos anti-Kinetoplastida [17, 18].

Portanto, tendo em vista a baixa citotoxicidade do xylodiol, a sua potencialidade sobre outros tripanossomatídeos e os escassos estudos antileishmania, o objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* a atividade anti-*Leishmania amazonensis* do composto xylodiol contra a espécie de *Leishmania amazonensis*, bem como possíveis mecanismos de ação.

2. Materiais e Métodos

2.1 Fármaco e reagentes

Meio Schneider para insetos, Dulbecco's Modified Eagle's meio (DMEM) e meio RPMI 1640; dimetilsulfóxido (DMSO 99%), dodecil sulfato e sódio (SDS), 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difeniltetrazólio brometo (MTT), lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS), reagente de *Griess* (1% sulfanilamida em 10% (v/v) H₃PO₄ em água Milli-Q), os antibióticos penicilina e estreptomicina, zimosan e vermelho neutro foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA). O soro fetal bovino inativado pelo calor (FBS) foi adquirido na loja Netlab (São Paulo, SP, Brasil). O antibiótico anfotericina B foi comprado da Cristália (São Paulo, SP, Brasil). O antimoníato de meglumina (Glucantime®; 300 mg/mL) foi obtido da Aventis Pharma (São Paulo, SP, Brasil) xylodiol (Fig. 1) foi obtido das folhas de *Xylopia langsdorffiana* St.Hilaire & Tulasne, Annonaceae, como previamente descrito [19]. O acesso à planta foi cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (SISGEN) sob número A94B923. O xylodiol foi gentilmente cedido pelo professor Dr. Josean Fachine Tavares, da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

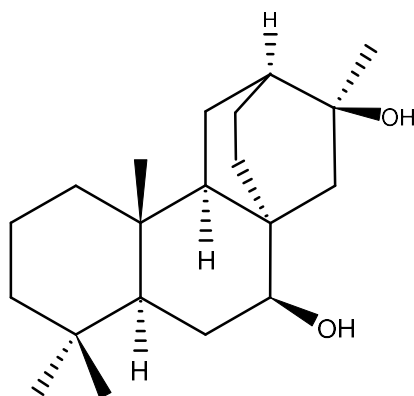


Figura 1: Estrutura química do xylodiol

2.2 Cultivo dos parasitas, macrófagos RAW 264.7 e células da linhagem Vero

Para o teste de atividade antileishmania *in vitro*, foi utilizado formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. As formas promastigotas foram primeiramente cultivadas em tubos de cultura contendo meio Schneider suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) inativado pelo calor, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina a 26 ± 1 °C. As formas amastigotas foram obtidas a partir de formas promastigotas em fase estacionária tardia. Para a obtenção foi ajustado o pH para 5,5 e incubadas a 32 °C. Para a obtenção das formas amastigotas axênicas, realizou-se a transformação *in vitro* de promastigotas infectantes, na qual foram incubadas a 32°C em meio Schneider, suplementado com pH de 4,6 [20].

Os macrófagos RAW 264.7 e as células Vero isolado dos rins de macacos verdes africanos utilizados neste trabalho foram cultivados em meio DMEM e meio RPMI 1640, respectivamente, com pH 7,2, suplementado com 10% de SFB e 1% de penicilina 100 U/mL e 100 µg/mL de estreptomicina a uma temperatura de 37°C com 5% de CO₂ [21].

2.3 Atividade antileishmania do xylodiol sobre formas promastigotas e amastigotas axênicas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

O teste foi realizado utilizando promastigotas em fase de crescimento logarítmico ou amastigotas axênicas de *L. amazonensis*. Leishmanias foram cultivadas em placas de microcultura de células de 96 poços na proporção 1×10^6 /poço contendo Schneider suplementado. Posteriormente, as diferentes concentrações de xylodiol foram adicionadas aos poços em triplicata e diluições seriadas foram realizadas até atingir a faixa de oito concentrações (100 - 1,56 μ M). As placas foram incubadas por 72 horas em uma demanda biológica de oxigênio (BOD) a 26 °C para as formas promastigotas e 32 °C para as amastigotas axênicas, e ao final do tempo foram adicionados 10 μ L de brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazólio (MTT) seguindo com a incubação das placas novamente por mais 4 horas. Por fim, adicionou-se 50 μ L de SDS a 10% em todos os poços, a fim de solubilizar os cristais de formazan. A leitura da placa foi realizada utilizando uma absorbância de 540 nm com o auxílio de um leitor de placa ELISA. Os fármacos de referência antimoniato de meglumina (200 a 40000 μ M) e anfotericina B (0,031 a 2 μ M) foram utilizados como controle positivo. Para o controle negativo foi usado meio Schneider suplementado contendo 0,2% de DMSO [22].

2.4 Avaliação da citotoxicidade da xylodiol em macrófagos RAW 264.7 e células Vero

A avaliação da citotoxicidade sobre macrófagos isolados da linhagem RAW 264.7 e células Vero foi feita de acordo com Mosmann [23] com adaptações. Nesse sentido, células na proporção de 1×10^6 células/100 μ L de meio foram plaqueados em placas de microcultura contendo 96 poços com meio DMEM ou meio RPMI 1640, ambos completo, seguindo com a incubação por 4 horas em atmosfera enriquecida a 37 °C e 5 % de CO₂ para adesão celular. Após esse período de incubação, seguiu-se com três lavagens com PBS estéril pré-aquecido a

37 °C para a retirada de células não aderidas e, posteriormente, adicionou-se diferentes concentrações de xylodiol (200 - 1,56 µM) e levou-se novamente para incubação por 72 h, nas mesmas condições anteriores. Após a incubação, foi realizado o ensaio com MTT. Foi adicionado 10 µL do MTT aos poços e incubado por mais 4 horas à 37 °C em estufa com 5% de CO₂. Em seguida, foi acrescentado 50 µL dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% (p/v em água destilada) para a solubilização dos cristais formazan, seguindo com a leitura no espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm. Para o controle negativo foi utilizado meio DMEM suplementado e contendo 0,2% de DMSO. Além disso, foi considerado como 100% de viabilidade de macrófagos.

2.5 Atividade antileishmania contra amastigotas intramacrofágica

Para avaliar a atividade antileishmania intramacrofágica sobre formas amastigotas de *L. amazonensis*, cultivou-se macrófagos RAW 264.7 em placas de cultura com 24 poços a uma concentração de 1×10^5 células/mL, contendo 1 mL de meio de RPMI 1640 suplementado e lamínulas circulares estéreis de 13 mm. As placas foram incubadas a uma temperatura de 37°C e com 5% de CO₂ por cerca de 3 h para que ocorresse a adesão celular. Em seguida, foram realizadas três lavagens utilizando PBS estéril para retirar as células não aderidas. Após a lavagem, foi adicionado um novo meio contendo formas promastigotas em fase estacionária, na proporção de dez promastigotas para 1 macrófago, e foi incubada novamente por mais 4 h a 5% de CO₂ e 37 °C. Decorrido o tempo, o meio foi aspirado para remover os parasitas não internalizados e os poços foram novamente lavados com PBS. A cultura infectada foi então novamente incubada por 72 h, contendo xylodiol nas concentrações de 1,56 µM, 3,12 µM, 6,25 µM e 12,5 µM. Após o período de incubação as lamínulas foram removidas, fixadas e coradas

utilizando o kit de coloração panótico rápido. Por fim, as lamínulas foram analisadas utilizando microscopia óptica e foram contados 300 macrófagos [24].

2.6 Atividade lisossomal

Para realizar a atividade lisossomal macrófagos RAW 264.7 (1×10^5 por poço) foram plaqueados e incubados com diferentes concentrações do xylodiol, 1,56 μM , 3,12 μM , 6,25 μM e 12,5 μM , por 72 h a 37 °C e com 5% de CO_2 . Ao término do tempo de incubação, foram adicionados 10 μL de solução de vermelho neutro e incubados novamente por mais 30 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, os poços foram lavados com PBS a 37 °C e foram adicionados 100 μL de solução de extração (ácido acético glacial a 1% v/v e etanol a 50% v/v dissolvido em água bidestilada) para que ocorresse a solubilização do vermelho neutro presente dentro das vesículas de secreção lisossomal. Por fim, a placa foi agitada por 30 minutos com o auxílio de um agitador de Kline e ao final foi realizada a leitura com a absorbância de 540 nm em um leitor de ELISA [25].

2.7 Capacidade fagocítica

Macrófagos RAW 264.7 (1×10^5 por poço) foram plaqueados e incubados junto com diferentes concentrações do xylodiol 1,56 μM , 3,12 μM , 6,25 μM e 12,5 μM , por 72 h a 37°C e com 5% de CO_2 . Em seguida, foram adicionados 10 μL de zimosan corado com vermelho neutro e incubado novamente por mais 30 minutos a 37 °C. Após o tempo, o sobrenadante foi removido e adicionou-se 100 μL do fixador de Baker (formaldeído 4% v/v, cloreto de sódio 2% p/v e acetato de cálcio de 1% w/v em água destilada) para interromper o processo de fagocitose do zimosan. Após 30 minutos, as células foram lavadas com PBS para ocorrer a remoção do zimosan que não foi fagocitado pelos macrófagos. Com o auxílio de um agitador de kline foi

feita a solubilização com a adição da solução de extração, e em seguida a placa foi lida com uma absorbância de 540 nm com auxílio de um leitor de placas ELISA [22].

2.8 Avaliação da produção de óxido nítrico (NO)

A avaliação da produção de óxido nítrico foi realizada utilizando o sobrenadante do ensaio de infecção dos macrófagos RAW 264.7 pelo método de Griess. Dessa forma, 100µL dos sobrenadantes foram adicionados em placas de 96 poços e adicionados o mesmo volume do reagente de Griess. Paralelamente o mesmo procedimento foi realizado com concentrações variadas (2-125 µM) de NaNO₂ em meio RPMI para a obtenção da curva padrão. Após 10 min de incubação a temperatura ambiente, a reação colorimétrica foi determinada a 540 nm por espectrofotometria e a concentração de nitrito foi estimada por interpolação da curva padrão [26].

2.9 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)

Para a investigação da produção de EROs foi utilizado o teste de H₂DCFDA, com macrófagos RAW 264.7 infectados com *L. amazonensis* e tratados com xylodiol. Inicialmente, macrófagos (1 x 10⁶) foram semeados, para adesão celular, em placas de 96 poços, contendo meio RPMI 1640 suplementado e incubado por 3 h a 37 °C com 5% de CO₂. Posteriormente, foram infectados com formas promastigotas de *L. amazonensis* na proporção de 10 leishmanias para 1 macrófago. Depois de 4 h de incubação, foram adicionados na placa concentração seriada do xylodiol, 1,56 µM, 3,12 µM, 6,25 µM e 12,5 µM, e incubada novamente por 72 horas. Decorrido o tempo, 10 µL do corante de H₂DCFDA foi adicionado, obtendo uma concentração final de 20 µM. Logo após, a placa foi incubada no escuro por 30 min e a intensidade da fluorescência foi mensurada usando um espectrofotômetro (FLx800) a 485 nm de excitação e

528 nm de emissão [25]. Antimicina A (5 μ M) foi usado como controle positivo para geração de EROs.

2.10 Análise estatística

Os ensaios foram realizados em triplicatas em três experimentos distintos. Para a obtenção dos valores de concentração inibitória média (CI_{50}), concentração efetiva média (CE_{50}) e de concentração citotóxica média (CC_{50}), com intervalo de confiança de 95%, foram calculadas utilizando o modelo de regressão não linear. Em suma, os dados foram avaliados utilizando a variância one-way (ANOVA), seguida do teste de Tukey através do programa GraphPad Prism versão 8.0, tomando-se o valor de $p < 0,05$ como nível mínimo necessário para significância estatística.

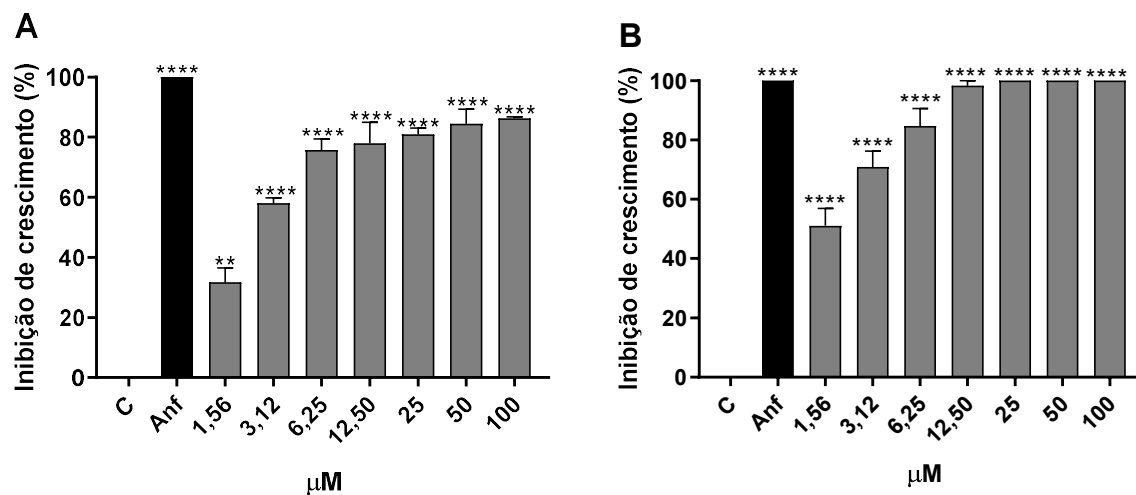
3. Resultados

3.1 Avaliação da atividade antileishmania do xylodiol sobre formas promastigotas e amastigotas axênicas de *L. amazonensis*.

Os resultados da atividade antileishmania do xylodiol estão representados na Fig.2. A partir da análise gráfica, pode-se observar que o composto foi capaz de reduzir o crescimento das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* em todas as concentrações testadas (Fig. 2A), resultando em uma inibição de 37,28%, 58,05%, 77,8%, 78,42%, 79,18%, 82,09% e 83,5% nas concentrações de 1,56 μ M, 3,12 μ M, 6,25 μ M, 12,5 μ M, 25 μ M, 50 μ M e 100 μ M, respectivamente, obtendo um valor de CI_{50} de 2,93 μ M $\pm$ 0,12, representado na Tabela 1. Seu efeito inibitório foi ainda melhor sobre formas amastigotas axênicas (Fig. 2B), com inibição de crescimento de 100% nas concentrações de 100 μ M, 50 μ M e 25 μ M; 98,1%, 83,25%, 70,5%

e 51,32% em concentrações de 12,5 μ M, 6,25 μ M, 3,12 μ M e 1,56 μ M, respectivamente, com CE_{50} de $1,8 \pm 0,05 \mu$ M.

Figura 2: Efeito do xylodiol sobre formas promastigotas e amastigotas axênicas de *L. amazonensis*.



Realizado a partir de culturas em fase logarítmica de crescimento (1×10^6) incubadas a 26 °C por 72 h com concentrações seriadas do xylodiol. (A) formas promastigotas; (B) formas amastigotas axênicas. A análise da atividade antileishmania foi avaliada pelo método colorimétrico do MTT. Os resultados representam média $\pm$ erro padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicata. (**) $p < 0,01$ vs. controle, (****) $p < 0,0001$ vs. controle. C – controle. Anf – anfotericina B a 2 μ M.

Tabela 1. Atividade antileishmania sobre *Leishmania amazonensis*, citotoxicidade sobre macrófagos RAW 264.7 e células VERO e índice de seletividade (IS) calculados para o xylodiol, antimoniato de meglumina e anfotericina B

Compostos	RAW 264.7	VERO	Promastigotas			Amastigotas axênicas			Amastigotas intracelulares	
	CC ₅₀ μM	CC ₅₀ μM	CI ₅₀ μM	IS _{RAW} 264.7	IS _{VERO}	CE ₅₀ μM	IS _{RAW} 264.7	IS _{VERO}	CE ₅₀ μM	IS _{RAW} 264.7
Xylodiol	279,5 ± 3,1	>200	2,93 ± 0,12	95,39	>68,26	1,8 ± 0,05	155,27	>111,11	1,68 ± 0.06	166,37
Anfotericina B	0,38 ± 0,03	0,32 ± 0,01	0,36 ± 0,01	1,05	0,88	0,32 ± 0,01	1,19	1,00	0,12 ± 0.03	3,16
Antimoniato de meglumina	16433 ± 122,3	17363 ± 9,64	21564 ± 131	0,76	0,80	1583 ± 25,5	10,38	13,62	526,4 ± 23	31,22

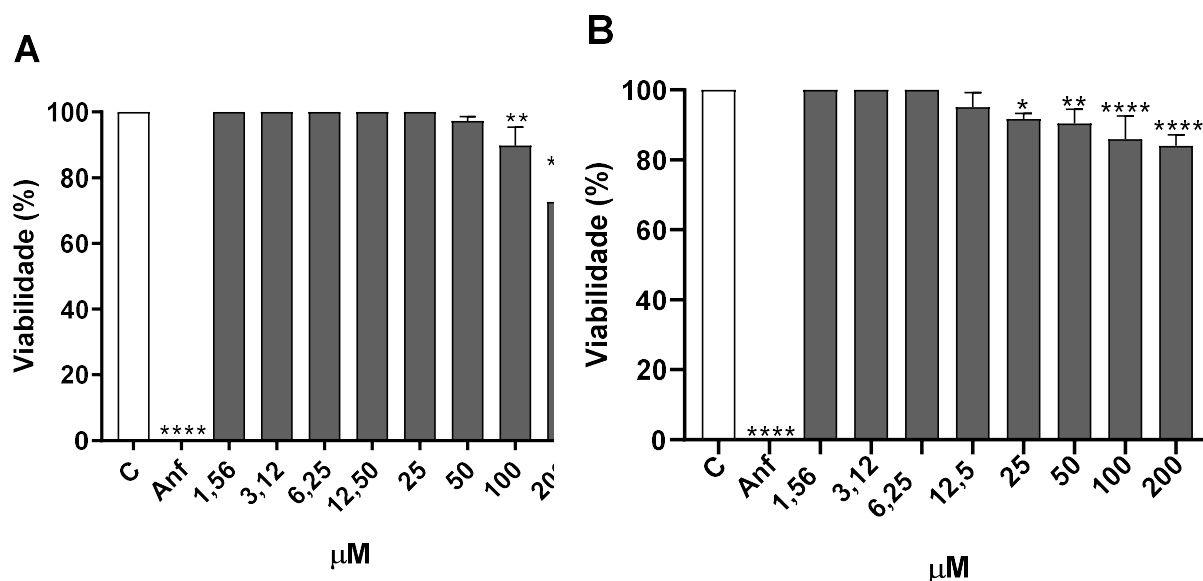
IS = CC₅₀/CI₅₀ ou CE₅₀

3.2 Avaliação da citotoxicidade do xylodiol sobre macrófagos RAW 264.7 e células da linhagem Vero

Os resultados da avaliação citotóxica do xylodiol estão representados na Fig. 3. Diante dos resultados obtidos, foi possível analisar que os macrófagos RAW 264.7 mantiveram a viabilidade de 100% nas concentrações de 1,56, 3,12, 6,25, 12,5 e 25 μ M. Contudo, nas concentrações de 50, 100 e 200 μ M teve-se uma redução na viabilidade de 3,63%, 10,13% e 24,6%, respectivamente (Fig. 3A). Com estes resultados foi possível, então, calcular o valor de CC_{50} de $279,5 \pm 3,1$ μ M, conforme demonstrado na Tabela 1. O índice de seletividade (IS) foi obtido a partir da divisão do valor do CC_{50} pelo valor do CI_{50} . Dessa forma, o índice de seletividade do xylodiol foi de 95,39 com relação às formas promastigotas e de 155,27 considerando as amastigotas axênicas (Tabela 1).

Em relação à análise da citotoxicidade frente às células da linhagem Vero, os resultados alcançados demonstraram que o xylodiol manteve 100% de viabilidade nas três menores concentrações testadas (Fig. 3B). No entanto, nas concentrações de 12,5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M e 200 μ M, verificou-se redução de 5,2%, 8,17%, 9,6%, 13,45% e 15,7%, respectivamente e valor de $CC_{50} > 200$ μ M e um IS de $> 68,26$ com relação às formas promastigotas e $> 111,11$ com relação às amastigotas axênicas (Tabela 1).

Figura 3: Efeitos citotóxicos do xylodiol sobre macrófagos RAW 264.7 e células Vero.



Realizado a partir de culturas de células (1×10^5) incubados a 37 °C com 5% de CO₂ por 72 horas, com diferentes concentrações do xylodiol. (A) macrófagos RAW 264.7; (B) células Vero. A citotoxicidade foi avaliada pelo método colorimétrico do MTT. Os resultados representam média $\pm$ o erro padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicata. (**) $p < 0,01$ vs. controle, (***) $p < 0,001$ vs. controle, (****) $p < 0,0001$ vs. controle. C – controle. Anf – anfotericina B a 2 μ M.

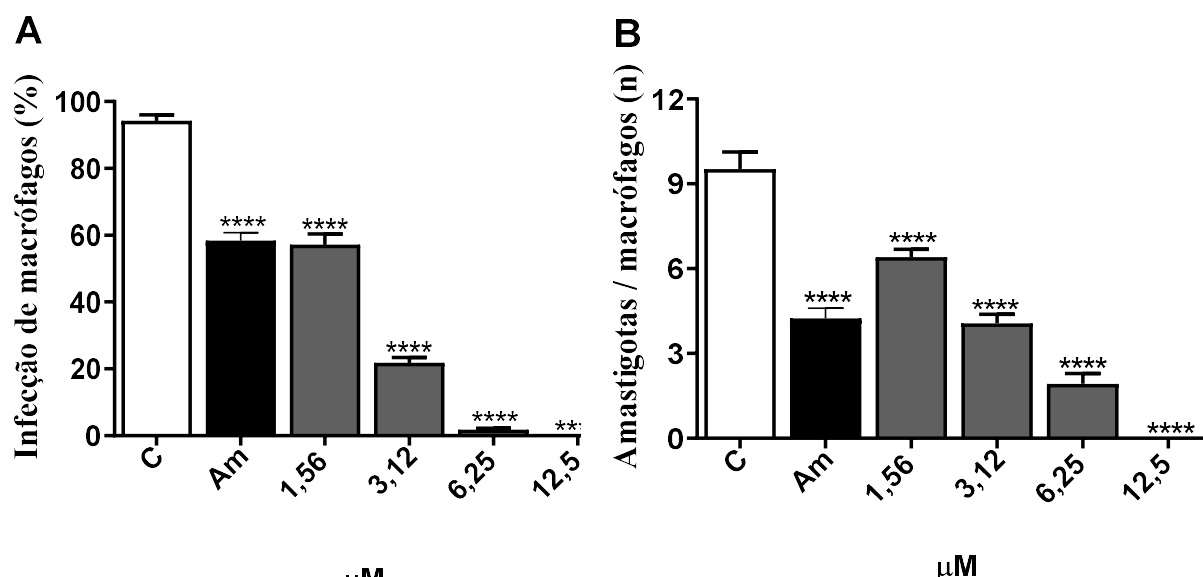
3.3 A eficácia do xylodiol contra amastigotas intramacrofágicas

Os resultados sobre formas amastigotas intramacrofágicas foram analisados por meio de dois parâmetros: a porcentagem de macrófagos infectados (Fig. 4A) e o número de amastigotas por macrófagos (Fig. 4B). No que se refere à avaliação da porcentagem de macrófagos infectados, o xylodiol foi capaz de induzir uma redução relevante em todas as concentrações testadas quando comparado ao controle negativo. Neste parâmetro, observou-se uma redução de 43,36%, 78,22%, 98,3% e 100% nas concentrações de 1,56, 3,12, 6,25 e 12,5 μ M, respectivamente.

Além disso, foi possível observar que houve uma diminuição do número de amastigotas por macrófagos infectados em todas as concentrações avaliadas. Observando-se, então, uma

diminuição de 50,28%, 66,7%, 91,6% e 100% nas concentrações de 1,56, 3,12, 6,25 e 12,5 μM , respectivamente (Fig. 4B).

Figura 4: Atividade antiamastigotas intramacrofágicas do xylodiol após 72 h de exposição



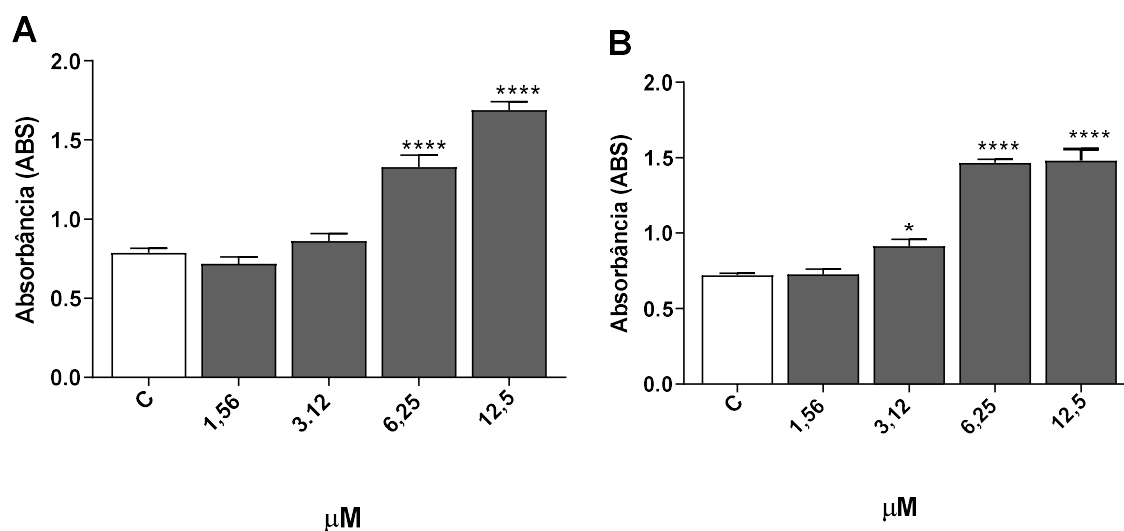
Porcentagem de infecção (A); Número de amastigotas por macrófagos (B). Macrófagos da linhagem RAW 264.7 (1×10^5) foram infectados com formas promastigotas na proporção de 10:1 e tratados com diferentes concentrações de xylodiol. Foram mantidos incubados a 5% CO_2 e 37 °C por 72 h. Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão de três experiências independentes realizadas em triplicata. (****) $p < 0,0001$ vs. controle. C – controle. Am – antimoniato de meglumina a 500 μM .

3.4 Capacidade fagocítica e atividade lisossomal de macrófagos tratados com xylodiol

Os resultados da capacidade fagocítica dos macrófagos incubados com diferentes concentrações de xylodiol são representados na Fig. 5A. O xylodiol demonstrou ativação estatisticamente significativa da fagocitose nas concentrações de 6,25 e 12,5 μM .

Por outro lado, a atividade lisossomal foi avaliada pela retenção de vermelho neutro retido no lisossomo de macrófagos e determinado colorimetricamente. Observa-se, com base na Fig. 5B, que o volume lisossomal dos macrófagos tratados com o xylodiol aumentou significativamente o compartimento do volume endocítico nas concentrações de 3,12 a 12,5 μM quando comparado ao grupo controle.

Figura 5: Alteração dos mecanismos de estruturais de macrófagos infectados e tratados com xylodiol

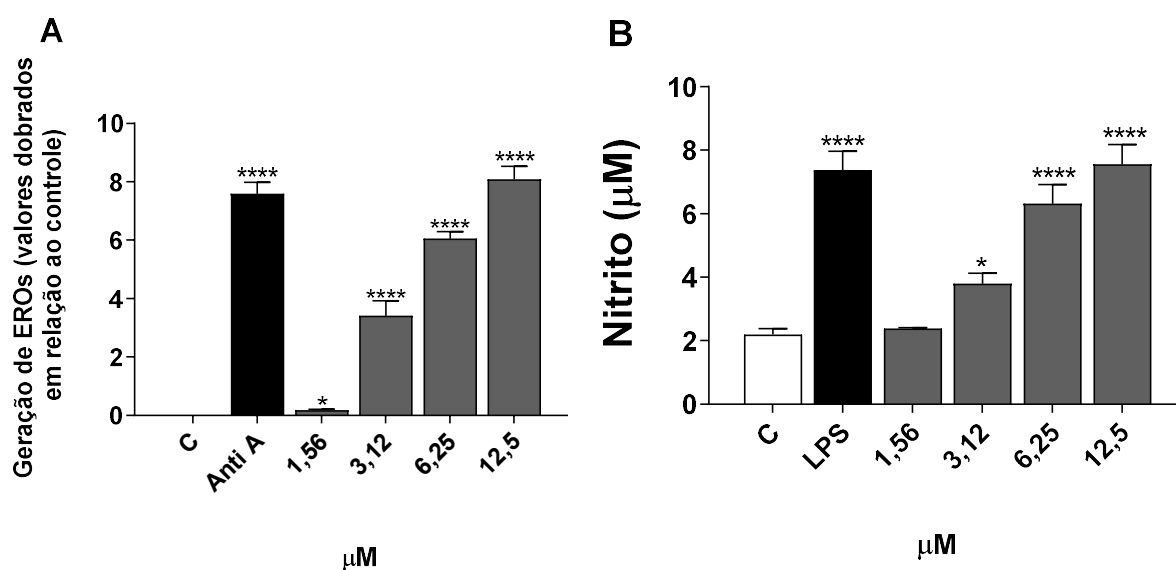


A capacidade fagocítica (A) foi avaliada espectrofotometricamente pela incorporação de zimosan corado com vermelho neutro (VR), solubilizado com solução de extração. A atividade lisossomal (B) foi analisada pela quantificação do aumento da absorção de VR após a solubilização com solução de extração. Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão de três experimentos independentes realizados em triplicado. (*) $p < 0,05$ vs. o controle; (****) $p < 0,0001$ vs. o controle. C – controle.

3.5 O xylodiol induz a produção de EROs e NO

No ensaio para a investigação da produção de EROs e NO em macrófagos incubados na presença das formas promastigotas de *L. amazonensis*, observou-se que houve aumento significativo na produção tanto de EROs quanto NO em macrófagos tratados com xylodiol (Fig. 6A e 6B). Macrófagos infectados por *L. amazonensis* e tratados com xylodiol aumentaram a produção de EROs e NO em concentrações de 3,12 a 12,5 μ M.

Figura 6: Alterações nos mecanismos celulares de macrófagos infectados após tratamento com xylodiol



Os níveis de EROs (A) e os níveis de NO (B) foram medidos em macrófagos RAW 264.7 cultivados infectados com *L. (leishmania) amazonensis* e tratados com xylodiol por 72 h a 37 °C e 5% de CO₂. Os resultados representam a média ± erro padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata. (*) $p < 0,05$ vs. o controle; (***) $p < 0,001$ vs. controle; (****) $p < 0,0001$ vs. o controle. C- controle. Anti A - antimycin A (5 µM)

4. Discussão

Ao passo que os fármacos atualmente disponíveis para o tratamento das leishmanioses estão associados à relevantes limitações, como os efeitos adversos graves e dificuldades relacionadas ao tempo e métodos de administração, a busca por agentes quimioterápicos mais seguros e eficazes se faz urgente [11]. Diante disso, novas abordagens terapêuticas têm sido

investigadas e uma das alternativas promissoras são os compostos naturais à base de plantas [25].

As plantas medicinais são amplamente conhecidas pelas suas inúmeras propriedades farmacológicas [27]. Estudos têm demonstrado que a atividade biológica antileishmania de extratos de várias plantas se associa a substâncias pertencentes a diversos grupos químicos que incluem ácidos orgânicos, terpenos, alcaloides, flavonoides, taninos, esteroides, chalconas e naftoquinonas [28, 29].

O xylodiol trata-se de um diterpeno atisano obtido das folhas de *Xylopia langsdorfiana* St. Hilaire & Tulasne - Annonaceae, que embora tenha sido demonstrado possuir atividade sobre diferentes formas de *T. cruzi*, além de outras propriedades terapêuticas, como anticancerígena, ainda figura-se como um composto biologicamente pouco estudado [30, 18]. Nesse sentido, o presente estudo abordou a atividade antileishmania do xylodiol sobre as diferentes formas evolutivas de *L. amazonensis* bem como os mecanismos envolvidos em tal ação.

Os estudos iniciaram com a investigação da inibição do crescimento de promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* pelo xylodiol, na qual foram observados valores de CI_{50} abaixo de substâncias consideradas como potenciais agentes antileishmania a exemplo do nerolidol, que apresenta CI_{50} 85,22 μM para formas promastigotas e um CI_{50} de 67,73 μM para as amastigotas de *L. amazonensis* Arruda et al. [31] e da cordiaquinona E com CI_{50} $4,5 \pm 0,3$ μM sobre promastigotas e um CI_{50} 2,89 μM para formas amastigotas de *L. amazonensis* [20]. Quando se compara aos compostos naturais da mesma classe (diterpenos), o xylodiol também apresenta superioridade em sua atividade antileishmania, como é visto nos estudos de Oliveira et al. e Miranda et al. [32, 33] na qual utilizaram os diterpenos 6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapan-17 β -oato de metila e o ácido caurenoico que apresentaram um CI_{50} de 20,12 e 30 μM , respectivamente, para as formas promastigotas. Além disto, foi possível observar

neste estudo que o xylodiol apresentou uma melhor inibição de crescimento das formas amastigotas do que para as formas promastigotas, corroborando com o estudo de Santo et al. [34] na qual demonstraram que a maioria dos seus compostos diterpenos analisados foram mais efetivos contra as formas amastigotas, tendo destaque para os diterpenos ácido pinifólico e o ácido caurenóico.

Na descoberta de um novo fármaco para o tratamento das leishmanioses, deve-se levar em consideração alguns aspectos, dentre eles, o seu grau de toxicidade contra as células do hospedeiro, principalmente os macrófagos, já que são as células alvo dos parasitas causadores das leishmanioses [35]. Desta forma, neste estudo avaliou-se a citotoxicidade do xylodiol sobre macrófagos e foi possível observar que o composto apresenta atividade antileishmania em concentrações não tóxicas para macrófagos, revelando um alto índice de seletividade.

Além dos macrófagos, diversas linhagens celulares podem ser utilizadas para avaliar a toxicidade de um determinado composto sobre as células de mamíferos de forma geral, com o propósito de um futuro tratamento *in vivo*. Assim, a fim de salientar a baixa citotoxicidade do xylodiol, foi utilizado neste estudo células da linhagem Vero, obtidas dos rins de macaco verde africano [36]. Com isso, foi possível observar que o composto manteve a viabilidade celular apresentando elevado IS, o que reitera a segurança do xylodiol.

De acordo com Nunes et al. [25], o índice de seletividade indica o quanto o composto é mais seletivo para o parasita do que para a célula e recomenda que o valor deste parâmetro seja superior a 20. Desta forma, neste estudo o xylodiol apresentou um IS de 97,75, que quando comparado com os fármacos de referência utilizados, observamos que o xylodiol foi 90,34 vezes mais seletivo em relação à anfotericina B e 125,5 mais seletivo que o antimoniato de meglumina. O xylodiol também demonstrou ser mais seletivo que outros diterpenos disponíveis na literatura, como no estudo de Lima et al. [37] em que avaliou-se o diterpeno trans-desidrocrotonina, apresentando 13 vezes mais seletividade que a pentamidina. No estudo

de Demarchi et al. [38], por sua vez, o diterpeno 6,7-dehidroileanona apresentou um IS de 0,22. Sendo assim, ambos demonstraram ser menos seletivos que o xylodiol.

Neste estudo foi realizado o teste de eficácia do xylodiol sobre formas amastigotas intracelulares, pois este é o modelo experimental que mais se assemelha à maneira de como ocorre a infecção no hospedeiro vertebrado [39]. Nesse aspecto, os resultados com o xylodiol demonstraram-se superiores quando comparado ao estudo de Santos et al. [40], que utilizou o diterpeno 4-Acetoxidolastano e obtiveram porcentagens inferiores da redução de infecção. Dessa forma, o xylodiol apresenta resultados preliminares bastante promissores, haja vista que essa redução da infecção promove a diminuição da multiplicação, instalação do parasita e, conseqüentemente, das manifestações clínicas [41].

No presente estudo foi possível observar que o xylodiol apresentou uma melhor inibição de crescimento das formas amastigotas do que para as formas promastigotas, corroborando com o estudo de Santos et al. [34] na qual demonstraram que a maioria dos seus compostos diterpenos analisados foram mais efetivos contra as formas amastigotas, tendo destaque para os diterpenos ácido pinifólico e o ácido caurenóico. A maior atividade sobre formas amastigotas axênicas pode ser indicativo de atividade indireta, modulando a resposta microbicida dos macrófagos. Para testar essa hipótese, realizamos teste de atividade imunomoduladora dos macrófagos.

Em infecções por *Leishmania* é desejável que ocorra a ativação da resposta imunológica do tipo Th1, mediados principalmente por macrófagos, pois esse tipo de resposta é capaz de conferir cura ou proteção contra estes parasitas. Dessa forma, para que ocorra a morte celular induzida, alguns mecanismos celulares e estruturais dos macrófagos precisam ser ativados, como a produção de ROS e de NO, fagocitose, vacuolização e aumento do volume lisossomal [42].

Os mecanismos estruturais dos macrófagos, como a capacidade fagocítica e lisossomal, são bastante importantes no processo de controle da infecção, pois leva a internalização do protozoário e posterior eliminação, por meio da fusão do fagosossomo aos lisossomas que possuem em seu interior hidrolases ácidas e outros componentes envolvidos no processo de destruição do parasita [43]. O nosso estudo mostrou que o xylodiol foi capaz de promover aumento significativo na capacidade fagocítica e lisossomal, tendo um aumento duas vezes maior quando comparado ao grupo controle, sugerindo então a participação ativa desse mecanismo na atividade leishmanicida.

Além dos mecanismos estruturais, neste estudo também foram analisados os mecanismos celulares, como a produção de espécies reativas de oxigênio e de óxido nítrico, mecanismos os quais são ativados por meio da produção de citocinas Th1 como interferon- γ (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), responsáveis pela morte do parasita [44]. Sendo assim, os resultados demonstram que o xylodiol foi capaz de aumentar significativamente a produção de EROs e NO, quando comparado ao controle não tratado, corroborando com o estudo de Kathuria et al. [45] que utilizou o diterpeno 16 α -hidroxicleroda-3,12(14)Z-dien-15,16-olide (K-09) apresentando resultados semelhantes. Contudo, o xylodiol demonstrar ser mais eficaz que outros diterpenos, quando comparado com o estudo de Chatter et al. [46], que utilizou o diterpeno neorogioltriol e descreveu que este diterpeno gerou uma diminuição na produção de NO.

5. Conclusão

A partir dos resultados obtidos neste estudo, constata-se que o xylodiol apresenta atividade anti-*Leishmania* eficaz e seletiva sobre as duas formas de *L. amazonensis*. Além disto, foi verificado que o xylodiol promove uma atividade indireta, mediada por

imunomodulação, sendo observado aumento da capacidade fagocítica e do volume lisossomal, assim como também da produção de EROs e NO, resultando na diminuição significativa das formas amastigotas intracelulares. Desta forma, os resultados denotam que o xylodiol é um candidato potencial para avaliação de modelos *in vivo* de leishmaniose tegumentar no desenvolvimento de novos agentes antileishmania.

Declaração de contribuição de autoria

Airton Lucas Sousa dos Santos: Investigação, Conceitualização, Metodologia, Curadoria de dados e Redação. **Francisco Alex da Rocha Coelho:** Investigação, Conceitualização, Metodologia, Curadoria de dados e Redação. **Thais Amanda de Lima Nunes:** Investigação. **Julyanne Maria Saraiva de Sousa:** Investigação. **Raiza Raianne Luz Rodrigues:** Investigação. **Marcos Vinícius da Silva:** Investigação. **Klinger Antonio da Franca Rodrigues:** Investigação, Conceitualização, Metodologia, Curadoria de dados, Redação, Aquisição de financiamento e Administração do projeto.

Conflito de interesse

Os autores confirmam que não têm conflitos de interesse.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (número de concessão 403260/2021-3) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Piauí (número de concessão 004/2020-PPSUS).

Referências

- [1] Rees CA, Hotez PJ, Monuteaux MC, Niescierenko M, Bourgeois FT. Neglected tropical diseases in children: An assessment of gaps in research prioritization. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2019;13(1):e0007111. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0007111>
- [2] Zahedifard F, Rafati S. Prospects for antimicrobial peptide-based immunotherapy approaches in *Leishmania* control. Expert Rev Anti Infect Ther [Internet]. 2018;16(6):461–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/14787210.2018.1483720>
- [3] Bilgic-Temel A, Murrell DF, Uzun S. Cutaneous leishmaniasis: A neglected disfiguring disease for women. Int J Womens Dermatol [Internet]. 2019;5(3):158–65. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijwd.2019.01.002>
- [4] Talas J, Mielcarek K, Wu J, Brunner M, Steinhoff M, Zouboulis CC. Cutaneous leishmaniasis in Germany-still a travel-related disease. Hautarzt [Internet]. 2022;73(2):146–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00105-021-04890-6>
- [5] ROCHA, T. J. M. et al. Aspectos epidemiológicos dos casos humanos confirmados de leishmaniose tegumentar americana no Estado de Alagoas, Brasil. Revista Pan-Amazônica de Saúde, v. 6, n. 4, p. 49-54, 2015.
- [6] AGUIAR, P. F.; RODRIGUES, R. K. Leishmaniose visceral no Brasil: artigo de revisão. Unimontes Científica, v. 19, n. 1, p. 191-204, 2017.

- [7] Barbosa IR. Leishmaniose Visceral Humana no município de Natal-RN: análise clínico-epidemiológica e espacial. LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA NO MUNICÍPIO DE NATAL-RN: ANÁLISE CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA E ESPACIAL. Revista Ciência Plural [Internet]. 2016;2(1):89–101. Available from: <http://dx.doi.org/10.21680/2446-7286.2016v2n1id8559>
- [8] Ponte-Sucre A, Gamarro F, Dujardin J-C, Barrett MP, López-Vélez R, García-Hernández R, et al. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2017;11(12):e0006052. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0006052>
- [9] Wilkins-Rodríguez AA, Pérez-Torres A, Escalona-Montaña AR, Gutiérrez-Kobeh L. Differential regulation of l-arginine metabolism through arginase 1 during infection with *Leishmania mexicana* isolates obtained from patients with localized and diffuse cutaneous leishmaniasis. Infect Immun [Internet]. 2020;88(7). Available from: <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00963-19>
- [10] Tegegne B, Alemu G. Progress of Mucocutaneous Leishmaniasis to Drug Nonresponsive Diffuse Cutaneous Leishmaniasis in Ethiopia. A Case Report. IMCRJ. outubro de 2020;Volume 13:551–5. doi: 10.2147/IMCRJ.S275133.
- [11] Vital-Fujii DG, Baptista MS. Progress in the photodynamic therapy treatment of Leishmaniasis. Braz J Med Biol Res. 2021;54(12):e11570. doi: 10.1590/1414-431X2021e11570.
- [12] Andrade-Neto VV, da Silva Pacheco J, Inácio JD, Almeida-Amaral EE, Torres-Santos EC, Cunha-Junior EF. Efficacy of *Spironolactone* Treatment in Murine Models of Cutaneous and Visceral Leishmaniasis. Front Pharmacol. 13 de abril de 2021;12:636265. doi: 10.3389/fphar.2021.636265.
- [13] Parthasarathy A, Borrego EJ, Savka MA, Dobson RCJ, Hudson AO. Amino acid-derived defense metabolites from plants: A potential source to facilitate novel antimicrobial development. Journal of Biological Chemistry. janeiro de 2021;296:100438. doi: 10.1016/j.jbc.2021.100438.

- [14] Dos Santos PF, Duarte MC, Bezerra DAC, de F. Agra M, Barbosa Filho JM, da Silva MS, et al. Diterpenes from *Xylopia langsdorffiana*. HCA. junho de 2013;96(6):1085–92. doi: 10.1002/hlca.201200372.
- [15] Castello Branco MVS, Anazetti MC, Silva MS, Tavares JF, Diniz MFFM, Frungillo L, et al. Diterpenes from *Xylopia langsdorffiana* Inhibit Cell Growth and Induce Differentiation in Human Leukemia Cells. Zeitschrift für Naturforschung C. 1º de outubro de 2009;64(9–10):650–6. doi: 10.1515/znc-2009-9-1008.
- [16] De Andrade R, de Araújo D, do Nascimento Y, Tavares J, da Silva M. Evaluation of the antioxidant and photoprotective activity of *Xylopia langsdorffiana* St-hill & Tul. Evaluation of the antioxidant and photoprotective activity of *Xylopia langsdorffiana* St-hill & Tul. Em: Proceedings of MOL2NET'18, Conference on Molecular, Biomedical & Computational Sciences and Engineering, 4th ed. Sciforum.net: MDPI; 2018. p. 5553. doi: 10.3390/mol2net-04-05553.
- [17] Drummond GJ, Grant PS, Brimble MA. *ent*-Atisane diterpenoids: isolation, structure and bioactivity. Nat Prod Rep. 2021;38(2):330–45. doi: 10.1039/D0NP00039F.
- [18] Barros de Menezes RP, Fachine Tavares J, Kato MJ, da Rocha Coelho FA, Sousa dos Santos AL, da Franca Rodrigues KA, et al. Natural Products from Annonaceae as Potential Antichagasic Agents. ChemMedChem. julho de 2022 ;doi:10.1002/cmdc.202200196.
- [19] Tavares JF, Silva MVB, Queiroga KF, Diniz MFFM, Filho JMB, Haun M, et al. Xylodiol, a New Atisane Diterpenoid from *Xylopia Langsdorffiana* St.-Hil. & Tul. (Annonaceae). Zeitschrift für Naturforschung B. 1º de maio de 2007;62(5):742–4. doi: 10.1515/znb-2007-0520.
- [20] Rodrigues RRL, Nunes TAL, de Araújo AR, Marinho Filho JDB, da Silva MV, Carvalho FA de A, et al. Antileishmanial activity of cordiaquinone E towards *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Int Immunopharmacol [Internet]. 2021;90(107124):107124. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2020.107124>

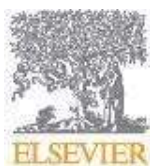
- [21] Ghasemi E, Ghaffarifar F, Dalimi A, Sadraei J. *In -vitro* and *In -vivo* Antileishmanial Activity of a Compound Derived of Platinum, Oxaliplatin, against *Leishmania mMajor*. IJPR [Internet]. dezembro de 2019 [citado 17 de julho de 2022];18(4). doi:10.22037/ijpr.2019.15364.13046.
- [22] Carvalho CES, Sobrinho-Junior EPC, Brito LM, Nicolau LAD, Carvalho TP, Moura AKS, et al. Anti-*Leishmania* activity of essential oil of *Myracrodruon urundeuva* (Engl.) Fr. All.: Composition, cytotoxicity and possible mechanisms of action. Experimental Parasitology. abril de 2017;175:59–67. doi: 10.1016/j.exppara.2017.02.012.
- [23] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods [Internet]. 1983;65(1–2):55–63. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- [24] Noleto Dias C, Nunes TA de L, Sousa JMS de, Costa LH, Rodrigues RRL, Araújo AJ, et al. Methyl gallate: Selective antileishmanial activity correlates with host-cell directed effects. Chemico-Biological Interactions. abril de 2020;320:109026. doi: 10.1016/j.cbi.2020.109026.
- [25] Nunes TA de L, Santos MM, de Oliveira MS, de Sousa JMS, Rodrigues RRL, Sousa PS de A, et al. Curzerene antileishmania activity: Effects on *Leishmania amazonensis* and possible action mechanisms. International Immunopharmacology. novembro de 2021;100:108130. doi: 10.1016/j.intimp.2021.108130.
- [26] Amorim FM, Rodrigues YKS, Barbosa TP, Nêris PLN, Caldas JPA, Sousa SCO, et al. Morita-Baylis-Hillman adduct shows *in vitro* activity against *Leishmania (Viannia) braziliensis* associated with a reduction in IL-6 and IL-10 but independent of nitric oxide. Parasitology. janeiro de 2013;140(1):29–38. doi: 10.1017/S0031182012001291.
- [27] Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. J Nat Prod [Internet]. 2020;83(3):770–803. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>

- [28] Oliveira, LFG. et al. Oportunidades para inovação no tratamento da leishmaniose usando o potencial das plantas e produtos naturais como fontes de novos fármacos. *Revista Fitos*, v. 8, n. 1, p. 33-42, 2013.
- [29] Martins, Giulveline Veras et al. Estudo químico e avaliação das atividades antioxidante, antiacetilcolinesterase e antileishmanial de extratos de *Jatropha Gossypifolia* L.(Pião Roxo). *Revista Virtual de Química*, v. 10, n. 1, p. 21-36, 2018.
- [30] Castello-Branco MVS, Tavares JF, Silva MS, Barbosa Filho JM, Anazetti MC, Frungillo L, et al. Xylodiol from *Xylopia langsdorfiana* induces apoptosis in HL60 cells. *Rev bras farmacogn*. dezembro de 2011;21(6):1035–42. doi: 10.1590/S0102-695X2011005000135.
- [31] Arruda DC, D’Alexandri FL, Katzin AM, Uliana SRB. Antileishmanial activity of the terpene nerolidol. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2005;49(5):1679–87. Available from: <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.49.5.1679-1687.2005>
- [32] Oliveira L, Oliveira G, Lemes G, Romão W, Vaz B, Albuquerque S, et al. Isolation and Structural Characterization of Two New Furanoditerpenes from *Pterodon emarginatus* (Fabaceae). *J Braz Chem Soc*. 2017. doi: 10.21577/0103-5053.20170029.
- [33] Miranda MM, Panis C, da Silva SS, Macri JA, Kawakami NY, Hayashida TH, et al. Kaurenoic Acid Possesses Leishmanicidal Activity by Triggering a NLRP12/IL-1 β /cNOS/NO Pathway. *Mediators of Inflammation*. 2015;2015:1–10. doi: 10.1155/2015/392918.
- [34] Santos AO dos, Izumi E, Ueda-Nakamura T, Dias-Filho BP, Veiga-Júnior VF da, Nakamura CV. Antileishmanial activity of diterpene acids in copaiba oil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. fevereiro de 2013;108(1):59–64. doi: 10.1590/S0074-02762013000100010.
- [35] De Oliveira VVG, Aranda de Souza MA, Cavalcanti RRM, de Oliveira Cardoso MV, Leite ACL, da Silva Junior VA, et al. Study of in vitro biological activity of thiazoles on *Leishmania (Leishmania) infantum*. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. setembro de 2020;22:414–21. doi: 10.1016/j.jgar.2020.02.028.

- [36] Perryman AL, Patel JS, Russo R, Singleton E, Connell N, Ekins S, et al. Naïve Bayesian Models for Vero Cell Cytotoxicity. *Pharmaceutical Research*. 29 de junho de 2018;35(9):170. doi: 10.1007/s11095-018-2439-9.
- [37] Lima GS, Castro-Pinto DB, Machado GC, Maciel MAM, Echevarria A. Antileishmanial activity and trypanothione reductase effects of terpenes from the Amazonian species *Croton cajucara Benth (Euphorbiaceae)*. *Phytomedicine*. novembro de 2015;22(12):1133–7. doi: 10.1016/j.phymed.2015.08.012.
- [38] Demarchi IG, Thomazella MV, de Souza Terron M, Lopes L, Gazim ZC, Cortez DAG, et al. Antileishmanial activity of essential oil and 6,7-dehydroroleanone isolated from *Tetradenia riparia*. *Experimental Parasitology*. outubro de 2015;157:128–37. doi: 10.1016/j.exppara.2015.06.014.
- [39] Carneiro SMP, Carvalho FAA, Santana LCLR, Sousa APL, Neto JMM, Chaves MH. The cytotoxic and antileishmanial activity of extracts and fractions of leaves and fruits of *Azadirachta indica (A Juss.)*. *Biol Res*. 2012;45(2):111–6. doi: 10.4067/S0716-97602012000200002.
- [40] Santos AO dos, Britta EA, Bianco EM, Ueda-Nakamura T, Filho BPD, Pereira RC, et al. 4-Acetoxydolastane Diterpene from the Brazilian Brown Alga *Canistrocarpus cervicornis* as Antileishmanial Agent. *Marine Drugs*. 11 de novembro de 2011;9(11):2369–83. doi: 10.3390/md9112369.
- [41] Azevedo RC de F, Marcili A. Alterações cutâneas secundárias à infecção por *Lleishmania sp.*: revisão de literatura. *BJD*. 2020;6(4):19328–46. doi: 10.34117/bjdv6n4-195. doi: 10.34117/bjdv6n4-195.
- [42] Amaral-Machado L, Oliveira WN, Alencar ÉN, Cruz AKM, Rocha HAO, Ebeid K, et al. Bullfrog oil (*Rana catesbeiana Shaw*) induces apoptosis, in A2058 human melanoma cells by mitochondrial dysfunction triggered by oxidative stress. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. setembro de 2019;117:109103. doi: 10.1016/j.biopha.2019.109103.

- [43] Silva-López RE da. Proteases de *Leishmania*: novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. *Quím Nova*. 2010;33(7):1541–8. doi: 10.1590/S0100-40422010000700022.
- [44] Riezk A, Raynes JG, Yardley V, Murdan S, Croft SL. Activity of Chitosan and Its Derivatives against *Leishmania major* and *Leishmania mexicana* *in Vitro*. *Antimicrob Agents Chemother*. 21 de fevereiro de 2020;64(3):e01772-19. doi: 10.1128/AAC.01772-19.
- [45] Kathuria M, Bhattacharjee A, Sashidhara KV, Singh SP, Mitra K. Induction of Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in *Leishmania donovani* by Orally Active Clerodane Diterpene. *Antimicrob Agents Chemother*. outubro de 2014;58(10):5916–28. doi:10.1128/AAC.02459-14.
- [46] Chatter R, Othman RB, Rabhi S, Kladi M, Tarhouni S, Vagias C, et al. *In vivo* and *in vitro* Anti-Inflammatory Activity of Neorogioltriol, a New Diterpene Extracted from the Red Algae *Laurencia glandulifera*. *Marine Drugs*. 22 de julho de 2011;9(7):1293–306. doi: 10.3390/md9071293.

ANEXO I – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA



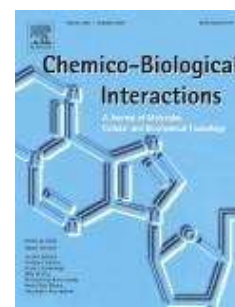
CHEMICO-BIOLOGICAL INTERACTIONS

A journal of molecular, cellular and biochemical toxicology

AUTHOR INFORMATION PACK

6. TABLE OF CONTENTS

- **Description** p.1
- **Audience** p.1
- **Impact Factor** p.1
- **Abstracting and Indexing** p.2
- **Editorial Board** p.2 • **Guide for Authors** p.4



ISSN: 0009-2797

7. DESCRIPTION

Chemico-Biological Interactions publishes research reports and review articles that examine the molecular, cellular, and/or biochemical basis of toxicologically relevant outcomes. Special emphasis

is placed on **toxicological mechanisms** associated with interactions between **chemicals** and **biological systems**. Outcomes may include all traditional endpoints caused by synthetic or naturally occurring chemicals, both *in vivo* and *in vitro*. Endpoints of interest include, but are not limited to **carcinogenesis, mutagenesis, respiratory toxicology, neurotoxicology, reproductive and developmental toxicology**, and **immunotoxicology**.

CBI discourages papers that are descriptive in nature and that do not address toxicological mechanisms (e.g., reports of toxicological effects following chemical exposure in absence of mechanistic experiments). CBI also discourages papers reporting on toxicological effects from materials, such as plant extracts or herbal medicines, that have not been chemically characterized.

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 Center](#)

8. *AUDIENCE*

Biochemists, Biologists, Cell Biologists, Toxicologists.

9. *IMPACT FACTOR*

2021: 5.168 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2022

10. *ABSTRACTING AND INDEXING*

Elsevier BIOBASE
EMBiology
BIOSIS Citation Index
Chemical Abstracts
Current Contents - Life Sciences
Current Contents
Embase
PubMed/Medline
Pascal Francis
Scopus

11. EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief

Daniel R. Dietrich, University of Konstanz, Human and Environmental Toxicology Group (Umwelttoxikologie), Dept. of Biology, Jacob-Burckhardt-Strasse 25, D-78457, Konstanz, Germany, Fax: +49 7531 883170

Section Editors

Enrique Cadenas, University of Southern California Department of Pharmacology and Pharmaceutical Sciences, 1985 Zonal Avenue, CA 90089-9121, Los Angeles, California, United States of America, Fax: +1 323 224 7473

Brian Cummings, Wayne State University, 48202-3489, Detroit, Michigan, United States of America, Fax: +1 706-542-5358

Billy Day, International Isocyanate Institute Inc, 07046, Mountain Lakes, New Jersey, United States of America

Bennard van Ravenzwaay, BASF SE, Carl-Bosch-Straße 38, 67063, Ludwigshafen, Germany

Melva Rios Blanco, AbbVie, Irvine, California, United States of America

Alessandra Roncaglioni, Mario Negri Institute for Pharmacological Research, 20157, Milano, Italy

Editorial Board

Aamir Ahmad, University of South Alabama Mitchell Cancer Institute, Mobile, Alabama, United States of America **Jamal Arif**, Shaqra University, Shaqra', Saudi Arabia

Paul Brookes, University of Rochester Medical Center Department of Anesthesiology, Rochester, New York, United States of America

David J. Burritt, University of Otago Department of Botany, Dunedin, New Zealand

Moray J. Campbell, Roswell Park Comprehensive Cancer Center Department of Pharmacology and Therapeutics, Buffalo, New York, United States of America

Guangping Chen, Oklahoma State University Department of Physiological Sciences, Stillwater, Oklahoma, United States of America

Guo-Qiang Chen, Shanghai Jiao Tong University - Fahu Campus, Shanghai, China

Ian Cotgreave, RISE Chemical and Pharmaceutical Safety Unit, Södertälje, Sweden

Adam Csordas, University of Innsbruck Faculty of Chemistry and Pharmacy, Innsbruck, Austria

Jonathan A. Doorn, The University of Iowa Division of Medicinal and Natural Products Chemistry, Iowa City, Iowa, United States of America

Thomas Efferth, Johannes Gutenberg University, Institute of Pharmaceutical and Biomedical Sciences, Mainz, Germany

Karam El-Bayoumy, Penn State College of Medicine, Hershey, Pennsylvania, United States of America

Rodrigo Franco, University of Nebraska-Lincoln School of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences, Lincoln, Nebraska, United States of America

Liyi Geng, Mayo Clinic Department of Molecular Pharmacology and Experimental Therapeutics, Rochester, Minnesota, United States of America

Romi Ghose, University of Houston College of Pharmacy, Houston, Texas, United States of America

Derick Han, University of Southern California Research Center for Liver Diseases, Los Angeles, California, United States of America

Jan-Olov Höög, Karolinska Institute Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Stockholm, Sweden

Dan-Ning Hu, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, New York, United States of America **Margaret**

James, University of Florida Department of Medicinal Chemistry, Gainesville, Florida, United States of America

Georges E.N. Kass, European Food Safety Authority, Parma, Italy

Igor Koturbash, University of Arkansas for Medical Sciences Department of Environmental and Occupational Health, Little Rock, Arkansas, United States of America

Samuel K. Kulp, The Ohio State University College of Pharmacy, Columbus, Ohio, United States of America

Jeffrey Larson, Tvardi Therapeutics, Houston, Texas, United States of America

Lawrence H. Lash, Wayne State University Department of Pharmacology, Detroit, Michigan, United States of America

David A. Lawrence, Wadsworth Center, Albany, New York, United States of America

Albert P. Li, Advanced Pharmaceutical Sciences, Inc., In Vitro ADMET Labs. LLC, Rockville, Maryland, United States of America

Oksana Lockridge, University of Nebraska Medical Center Eppley Institute for Research in Cancer and Allied Diseases, Omaha, Nebraska, United States of America

B.V. Madhukar, Michigan State University, East Lansing, Michigan, United States of America

Lijoy K. Mathew, University of Pennsylvania Perelman School of Medicine, Philadelphia, Pennsylvania, United States of America

Terrence Monks, The University of Arizona College of Pharmacy, Tucson, Arizona, United States of America

Ralf Morgenstern, RISE Chemical and Pharmaceutical Safety Unit, Södertälje, Sweden

Shanmugam Nagarajan, University of Pittsburgh McGowan Institute for Regenerative Medicine, Pittsburgh, Pennsylvania, United States of America

Curtis Omiecinski, The Pennsylvania State University Department of Veterinary and Biomedical Sciences, University Park, Pennsylvania, United States of America

Aglaia Pappa, Democritus University of Thrace Department Of Molecular Biology & Genetics, Alexandroupoli, Greece

Matthew Picklo, USDA-ARS Grand Forks Human Nutrition Research Center, Grand Forks, North Dakota, United States of America

Julian Preston, United States Environmental Protection Agency Research Triangle Park Campus, Durham, North Carolina, United States of America

Chris Pritsos, University of Nevada Reno, Reno, Nevada, United States of America

Alvaro Puga, University of Cincinnati Center for Environmental Genetics, Cincinnati, Ohio, United States of America

Gary O. Rankin, Marshall University Department of Biomedical Sciences, Huntington, West Virginia, United States of America

Vietla S. Rao, Federal University of Ceara Department of Physiology and Pharmacology, Fortaleza, Ceara, Brazil

Ivonne Rietjens, Wageningen University & Research Division of Toxicology, Wageningen, Netherlands

Sara S. Sanchez, National University of Salta Faculty of Natural Sciences, San Miguel de Tucuman, Argentina

Ashish Sharma, NIMS University, Jaipur, India

Jan S. Simoni, Texas Tech University Health Sciences Center School of Medicine, Lubbock, Texas, United States of America

Arno Siraki, University of Alberta Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Edmonton, Alberta, Canada

Hao Sun, Pfizer Inc, New York, New York, United States of America

Thomas Sutter, The University of Memphis W Harry Feinstone Center for Genomic Research, Memphis, Tennessee, United States of America

Takuji Tanaka, Kanazawa Medical University School of Medicine Graduate School of Medicine Department of Oncologic Pathology, Kahoku-gun, Japan

Alan Townsend, Wake Forest University School of Medicine, Winston-Salem, North Carolina, United States of America

Karl Tsim, The Hong Kong University of Science and Technology School of Science Division of Life Science, Hong Kong, Hong Kong

Xia-wei Wei, Sichuan University West China Hospital, Chengdu, China

Franz Worek, Bundeswehr Institute of Pharmacology and Toxicology, Munich, Germany

12. GUIDE FOR AUTHORS

Your Paper Your Way

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article. **To find out more, please visit the Preparation section below.**

INTRODUCTION

CHEMICO-BIOLOGICAL INTERACTIONS publishes research reports and review articles that examine the molecular, cellular, and/or biochemical basis of toxicologically relevant outcomes. Special emphasis is placed on toxicological mechanisms associated with interactions between chemicals and biological systems. Outcomes may include all traditional endpoints caused by synthetic

or naturally occurring chemicals, both in vivo and in vitro. Endpoints of interest include, but are not limited to carcinogenesis, mutagenesis, respiratory toxicology, neurotoxicology, reproductive and developmental toxicology, and immunotoxicology.

CBI discourages papers that are descriptive in nature and that do not address toxicological mechanisms (e.g., reports of toxicological effects following chemical exposure in absence of mechanistic experiments). CBI also discourages papers reporting on toxicological effects from materials, such as plant extracts or herbal medicines, that have not been chemically characterized.

Types of paper

Chemico-Biological Interactions will publish, (1) Papers reporting results of original mechanistic research; (2) Review articles; (3) Letters to the Editor; (4) Announcements and advertisements. Review Articles - Outlines of papers for these sections should be submitted to the Editor in Chief. Announcements and Advertisements - Organisers of relevant meetings may submit announcements through the Editor-in-Chief for publication free of charge as space permits. Advertising rates can be obtained upon request.

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 the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- 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 on [Ethics in publishing](#).

Studies in humans and animals

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with [The Code of Ethics of the World Medical Association](#) (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans. The manuscript should be in line with the [Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals](#) and aim for the inclusion of representative human populations (sex, age and ethnicity) as per those recommendations. The terms [sex and gender](#) should be used correctly.

Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the [ARRIVE guidelines](#) and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Research Council's [Guide for the Care and Use of Laboratory Animals](#) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. The sex of animals must be indicated, and where appropriate, the influence (or association) of sex on the results of the study.

Declaration of competing interest

Corresponding authors, on behalf of all the authors of a submission, must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. All authors, including those *without* competing interests to declare, should provide the relevant information to the corresponding author (which, where relevant, may specify they have nothing to declare). Corresponding authors should then use [this tool](#) to create a shared statement and upload to the submission system at the Attach Files step. **Please do not convert the .docx template to another file type. Author signatures are not required.**

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, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' 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 compliance, your article may be checked by [Crossref Similarity Check](#) and other originality or duplicate checking software.

Preprints

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#). Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Content should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader; contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition; and use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural assumptions. We advise to seek gender neutrality by using plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default/wherever possible to avoid using "he, she," or "he/she." We recommend avoiding the use of descriptors that refer to personal attributes such as age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition unless they are relevant and valid. When coding terminology is used, we recommend to avoid offensive or exclusionary terms such as "master", "slave", "blacklist" and "whitelist". We suggest using alternatives that are more appropriate and (self-) explanatory such as "primary", "secondary", "blocklist" and "allowlist". These guidelines are meant as a point of reference to help identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

Author contributions

For transparency, we encourage authors to submit an author statement file outlining their individual contributions to the paper using the relevant CRediT roles: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; Writing - review & editing. Authorship statements should be formatted with the names of authors first and CRediT role(s) following. [More details and an example](#).

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 uses the Elsevier Article Transfer Service to find the best home for your manuscript. This means that if an editor feels your manuscript is more suitable for an alternative journal, you might be asked to consider transferring the manuscript to such a journal. The recommendation might be provided by a Journal Editor, a dedicated [Scientific Managing Editor](#), a tool assisted recommendation, or a combination. If you agree, your manuscript will be transferred, though you will have the opportunity to make changes to the manuscript before the submission is complete. Please note that your manuscript will be independently reviewed 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 gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold 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, it is recommended to state this.

Open access

Please visit our [Open Access page](#) for more information.

Elsevier Researcher Academy

[Researcher Academy](#) is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy

offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

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 Author Services.

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.

Additional information

Manuscripts are accepted for review with the understanding that the same work has not been published, that it is not under consideration for publication elsewhere, and that its submission for publication has been approved by all of the authors and by the institution where the work was carried out. Further, it is understood that any person cited as a source of personal communications has approved such citation.

Chemico-Biological Interactions discourages papers that are descriptive in nature and that do not address toxicological mechanisms (e.g., reports of toxicological effects following chemical exposure in the absence mechanistic experiments). *Chemico-Biological Interactions* also discourages papers reporting on toxicological effects from materials, such as plant extracts or herbal medicines, which have not been chemically characterized.

It is a condition of publication that all manuscripts must be submitted in English to *Chemico-Biological Interactions* submission and review website

<https://www.editorialmanager.com/CHEMBIOINT/default.aspx>. Authors are requested to transmit the text and art of the manuscript in electronic form to this address. Each manuscript must also be accompanied by a cover letter outlining the basic findings of the paper and their significance. Minimal exceptions will be exercised. The Editor welcomes submissions by the authors of the names and addresses of up to five individuals who could expertly review the paper, and who are not from the same institutions as the authors. The Editor reserves the right to use these or other reviewers. Should you be unable to provide an electronic version, please contact the editorial office prior to submission at toxcon@earthlink.net.

PREPARATION

Queries

For questions about the editorial process (including the status of manuscripts under review) or for technical support on submissions, please visit our [Support Center](#).

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or layout that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References

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 article number or 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.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes. Divide the article into clearly defined sections.

Please ensure the text of your paper is double-spaced– this is an essential peer review requirement.

Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file. The corresponding caption should be placed directly below the figure or table.

Peer review

This journal operates a single anonymized review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. Editors are not involved in decisions about papers which they have written themselves or have been written by family members or colleagues or which relate to products or services in which the editor has an interest. Any such submission is subject to all of the journal's usual procedures, with peer review handled independently of the relevant editor and their research groups. [More information on types of peer review.](#)

REVISED SUBMISSIONS

Use of word processing software

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). See also the section on Electronic artwork.

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

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 details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

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. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. 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. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **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.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal as they help increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).

Highlights 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).

Abstract

A concise and factual abstract of approx. 200-300 words is mandatory. 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 $\times$ 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 Services](#) to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

Keywords

A list of 3-6 key words, which convey the meaning of the paper as a whole, necessary for correct indexing and subsequent retrieval, must be submitted with the manuscript also. In the event that key words are not supplied editorial discretion will be exercised in introducing appropriate words.

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.

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, it is recommended to include the following sentence:

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

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

Artwork

Electronic artwork General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.

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

Regardless of the application used, 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 the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- 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) in addition to color reproduction in print. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. 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 and shading in table cells.

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 highly encouraged.

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*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. 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. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Preprint references

Where a preprint has subsequently become available as a peer-reviewed publication, the formal publication should be used as the reference. If there are preprints that are central to your work or that cover crucial developments in the topic, but are not yet formally published, these may be referenced. Preprints should be clearly marked as such, for example by including the word preprint, or the name of the preprint server, as part of the reference. The preprint DOI should also be provided.

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](#). Using citation 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. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software](#).

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 and issue/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: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result' *List:*

Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, J. Sci. Commun. 163 (2010) 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

[2] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, 2018. The art of writing a scientific article. Heliyon. 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

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

Reference to a chapter in an edited book:

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

[5] Cancer Research UK, Cancer statistics reports for the UK.
<http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>, 2003 (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] [6] M. Oguro, S. Imahiro, S. Saito, T. Nakashizuka, Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1, 2015. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>. Reference to software:

[7] E. Coon, M. Berndt, A. Jan, D. Svyatsky, A. Atchley, E. Kikinzon, D. Harp, G. Manzini, E. Shelef, K. Lipnikov, R. Garimella, C. Xu, D. Moulton, S. Karra, S. Painter, E. Jafarov, S. Molins, Advanced Terrestrial Simulator (ATS) v0.88 (Version 0.88), Zenodo, March 25, 2020.
<https://doi.org/10.5281/zenodo.3727209>.

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 file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. 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.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article

and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal requires and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. When sharing data in one of these ways, you are expected to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data page](#).

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Research Elements

This journal enables you to publish research objects related to your original research – such as data, methods, protocols, software and hardware – as an additional paper in Research Elements.

Research Elements is a suite of peer-reviewed, open access journals which make your research objects findable, accessible and reusable. Articles place research objects into context by providing detailed descriptions of objects and their application, and linking to the associated original research articles. Research Elements articles can be prepared by you, or by one of your collaborators.

During submission, you will be alerted to the opportunity to prepare and submit a Research Elements article.

More information can be found on the [Research Elements page](#).

Data statement

To foster transparency, we require you to state the availability of your data in your submission if your data is unavailable to access or unsuitable to post. This may also be a requirement of your funding body or institution. You will have the opportunity to provide a data statement during the submission process. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

Additional information

It is understood that with submission of this article the authors have complied with the institutional policies governing the humane and ethical treatment of the experimental subjects, and that they are willing to share the original data and materials if so requested.

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. 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 [Author Services](#). Corresponding authors who have published their article gold 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](#).

© Copyright 2018 Elsevier | <https://www.elsevier.com>