

## Estudo fitoquímico e bioatividade de *Eleutherine bulbosa* (MILLER) Urb

Phytochemical study and bioactivity of *Eleutherine bulbosa* (MILLER) Urb

Estudio fitoquímico y bioactividad de *Eleutherine bulbosa* (MILLER) Urb

Recebido: 13/10/2022 | Revisado: 24/10/2022 | Aceitado: 25/10/2022 | Publicado: 30/10/2022

**Yuri de Souza Andrade Pastor Almeida**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5523-7377>  
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Brasil  
E-mail: yspastor@gmail.com

**Maria Teresa Fachin Espinar**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5414-0509>  
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Brasil  
E-mail: matefa5@hotmail.com

**Elen Suzany Pereira Aranha**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8758-5464>  
Universidade Federal do Amazonas, Brasil  
E-mail: elenn\_suzany@yahoo.com.br

**Marne Carvalho de Vasconcellos**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7785-4029>  
Universidade Federal do Amazonas, Brasil  
E-mail: marnevasconcellos@yahoo.com.br

**Cecilia Veronica Nunez**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3400-9508>  
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Brasil  
E-mail: cvnunez@gmail.com

### Resumo

A espécie *Eleutherine bulbosa* Miller (Urb.) apresenta uma vasta riqueza de substâncias isoladas, contudo, existem poucos trabalhos de indivíduos do bioma amazônico, podendo apresentar substâncias novas ou potenciais biológicos diferenciados. Portanto, o objetivo do presente estudo foi realizar a análise fitoquímica de *E. bulbosa* coletada na região de Altamira-PA, no bioma amazônico, e avaliar o potencial biológico de seus extratos. As folhas, flores e bulbos foram secos e posteriormente moídos. O material vegetal foi então submetido a extração com solventes orgânicos, e seus extratos analisados por CCDC. Por meio da análise de RMN foi possível caracterizar 5 substâncias: eleuterine (1), eleuterinol-8-*O*-β-glicosídeo (2), eleuterol (3), isoeleuterine (4) e eleuterinol (5). Os extratos e as substâncias foram submetidos a teste antitumoral, contudo, somente as amostras que apresentaram massa suficiente para teste foram avaliadas. O extrato hexânico do bulbo se mostrou significativo no teste antitumoral, causando morte celular de 50-60% contra as linhagens tumorais testadas. No ensaio antimicrobiano, eleuterol e isoeleuterine apresentaram potencial inibitório frente à *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas fluorescens*. Eleuterina, eleuterinol e isoeleuterina se mostraram importantes marcadores químicos desta espécie, por sua predominância na planta. Os resultados obtidos indicam a ação antimicrobiana e antitumoral de extrato hexânico da planta. Contudo, estudos mais aprofundados com as substâncias isoladas e extratos são necessários. Ainda, os resultados obtidos podem ser utilizados em futuros estudos comparativos da espécie e gêneros da tribo, aliados à dados morfológicos e filogenia, para a solução de problemas taxonômicos.

**Palavras-chave:** *Eleutherine*; Antimicrobiano; Antitumoral; Quinonas; Amazônia.

### Abstract

The species *Eleutherine bulbosa* Miller (Urb.) has a vast wealth of isolated substances, however, there are few studies of individuals from the Amazon biome, which may present new substances or differentiated biological potentials. Therefore, the aim of the present study was to carry out a phytochemical analysis of *E. bulbosa* collected in the region of Altamira-PA, in the Amazon biome, and evaluate the biological potential of its extracts. The leaves, flowers and bulbs were dried and then ground. The plant material was then subjected to extraction with organic solvents, and its extracts analyzed by TLC. Through NMR analysis, it was possible to characterize 5 substances: eleutherin (1), eleutherinol-8-*O*-β-glycoside (2), eleutherol (3), isoeleutherin (4) and eleutherinol (5). The extracts and substances were submitted to antitumor test, however, only the samples that presented sufficient mass for testing were submitted. The hexane extract of the bulb proved to be significant in the antitumor test, causing 50-60% cell death against the tumor strains tested. In the antimicrobial assay, eleuterol and isoeleuterine showed inhibitory action against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas fluorescens*. Eleutherin, eleutherinol and isoeleutherin proved to be important chemical markers of this species, due to their predominance in the plant. Through the results, it is concluded that the plant in question has antimicrobial and antitumor action, however, deeper studies with the isolated substances

and extracts are necessary. Still, the results obtained can be used in future comparative studies of the species and genera of the tribe, combined with morphological and phylogeny data, to solve taxonomic problems.

**Keywords:** *Eleutherine*; Antimicrobial; Antitumor; Quinones; Amazon.

### Resumen

La especie *Eleutherine bulbosa* Miller (Urb.) posee una gran riqueza de sustancias aisladas, sin embargo, existen pocos estudios de individuos del bioma amazónico, que puedan presentar nuevas sustancias o potencialidades biológicas diferenciadas. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue realizar un análisis fitoquímico de *E. bulbosa* colectada en la región de Altamira-PA, en el bioma amazónico, y evaluar el potencial biológico de sus extractos. Las hojas, flores y bulbos se secaron y luego se molieron. El material vegetal fue luego sometido a extracción con solventes orgánicos, y sus extractos analizados por TLC. A través del análisis de RMN fue posible caracterizar 5 sustancias: eleuterina (1), eleuterinol-8-O- $\beta$ -glucósido (2), eleuterol (3), isoeleuterina (4) y eleuterinol (5). Los extractos y sustancias se sometieron a prueba antitumoral, sin embargo, solo se sometieron las muestras que presentaron masa suficiente para la prueba. El extracto de hexano del bulbo demostró ser significativo en la prueba antitumoral, provocando un 50-60% de muerte celular frente a las cepas tumorales probadas. En el ensayo antimicrobiano, el eleuterol y la isoeleuterina mostraron potencial inhibidor contra *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas fluorescens*. Eleuterina, eleuterinol e isoeleuterina demostraron ser importantes marcadores químicos de esta especie, debido a su predominio en la planta. A través de los resultados se concluye que la planta en cuestión tiene acción antimicrobiana y antitumoral, sin embargo, son necesarios estudios más profundos con las sustancias aisladas y extractos. Aún así, los resultados obtenidos pueden ser utilizados en futuros estudios comparativos de las especies y géneros de la tribu, combinados con datos morfológicos y filogenéticos, para resolver problemas taxonómicos.

**Palabras clave:** *Eleutherine*; Antimicrobiano; Antitumoral; Quinonas; Amazonas.

## 1. Introdução

A Floresta Amazônica é conhecida pela sua vasta biodiversidade, abrigando cerca de 14000 espécies vegetais (Cardoso, et al., 2017). A utilização das plantas, no tratamento e cura de diversas doenças, é uma prática milenar e, até hoje, se mostra como principal recurso terapêutico de muitos grupos e comunidades tradicionais. As informações populares sobre o uso dessas plantas conduziram ao longo dos anos a uma gama de informações de grande validade com relação à eficiência e aos efeitos medicinais das plantas (Ottobelli, et al., 2011). Dentre as famílias vegetais encontradas na região Amazônica, com uso popular, tem-se Iridaceae, considerada por Reeves e colaboradores (2001) como uma das maiores famílias das Liliaceae e provavelmente uma das mais estudadas entre as monocotiledôneas. Das diversas espécies estudadas da família Iridaceae, encontra-se a espécie *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb., reconhecida por diversos potenciais terapêuticos e vasta riqueza de substâncias isoladas até hoje em diversos estudos e revisões sobre a espécie e sinônimas (Kamarudin et al., 2021; Shi, et al., 2019; Couto et al., 2016; Insanu, Kusmardiyani & Hartati, 2014). Registros de estudos etnobotânicos revelam o amplo uso de *Eleutherine bulbosa* na medicina popular no combate a doenças do trato digestivo, como diarreia, dor de estômago, entre outros (Vásquez, Mendonça & Noda, 2014; Oliveira neto et al., 2007; Martins et al., 2005).

As principais substâncias da espécie e sinônimas como eleuterol, isoeleuterol, eleuterina, isoeleuterina (Hara et al., 1997) e hongconin (Zhengxiong et al., 1986), além de seus derivados como a eleuterinona (Komura et al., 1983) e seus glicosídeos (Shibuya et al., 1997), já foram isolados e identificados dos bulbos de plantas pertencentes a esse gênero, observando-se a presença predominante de naftalenos, antraquinonas e naftoquinonas (Kamarudin et al., 2021). Além disso, os extratos contendo tais substâncias apresentam importante atividade biológica comprovada, como por exemplo, atividades antimicrobianas, antitumorais e antiprotozoários (Borges et al., 2020; Santos et al., 2020; Waode et al., 2020; Vale et al., 2020; Lestari, Karika & Marliana, 2019; Waode et al., 2019; Fitri et al., 2014).

Além de quinonas, *E. bulbosa* apresenta em suas partes vegetativas a concentração de outras substâncias de interesse. Em outro estudo, testes biológicos para análise de compostos fenólicos, flavonoides e a capacidade antioxidante dos mesmos, revelando grande quantidade destes compostos, principalmente nas flores, e sua correlação direta com potencial antioxidante *in vitro* (Shi et al., 2019).

Contudo, apesar de já existirem diversos estudos realizados com a espécie e suas sinônimas, poucos são os estudos realizados com espécies da Amazônia brasileira, assim, este trabalho teve como finalidade avaliar mais profundamente os potenciais dos extratos e das substâncias isoladas de um indivíduo de *Eleutherine bulbosa* do bioma amazônico, e verificar as substâncias produzidas pelo mesmo a fim de contribuir mais com o estudo da espécie (Malheiros, Mello & Barbosa, 2015; Ribeiro, 2013; Nascimento et al., 2012).

Neste estudo, foi possível o isolamento e a caracterização de cinco substâncias conhecidas. As amostras com maior quantidade de massa disponível foram submetidas a ensaio antitumoral. A caracterização das substâncias e os resultados dos ensaios biológicos são descritos neste estudo.

## 2. Metodologia

A pesquisa em questão envolveu etapas de pesquisa de campo para coleta do material a ser estudado, e posteriormente, etapa laboratorial para análise qualitativa do material quanto a presença de metabólitos de interesse e o potencial biológico dos mesmos. Por fim, foi realizada uma análise quantitativa envolvendo isolamento e caracterização das substâncias presentes no material, seguindo as normas de metodologia científica e padrão de bioprospecção (Pereira et al., 2018; Galves, Oliveira & Correia, 2021).

### Coleta

A coleta do material vegetal foi realizada na Volta Grande do Xingu (Jurucúá) em 11/11/2008, no município de Altamira, PA. A exsiccata foi depositada no herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA sob o nº 259.172. A coleta foi registrada no SISGEN com o número: A8EF50F.

### Preparo do material vegetal

Os materiais vegetais da espécie *Eleutherine bulbosa* foram separados e secos em temperatura ambiente e posteriormente moídos em moinho de facas (Tecnal, modelo Willye TE-650). As massas de 156,21 g de bulbos secos, 20,46 g de folhas secas e 2,15 g de flores secas foram submetidos à extração com hexano ou diclorometano (DCM), usando ultrassom por 20 minutos, filtrado e o procedimento repetido mais 3 vezes. O material vegetal foi seco e extraído com metanol (MeOH) com o mesmo procedimento e também por 3 vezes e por fim o material vegetal foi extraído com H<sub>2</sub>O. Os extratos hexânicos, diclorometânicos e metanólicos foram concentrados em rotaevaporador, e os aquosos em liofilizador. Para a evaporação dos solventes, foi utilizado evaporador rotativo a vácuo (FISATOM). Os extratos foram armazenados em freezer até a utilização.

### Análise cromatográfica, fracionamento e caracterização estrutural

Para a Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC), foram utilizadas cromatofolhas de sílica gel 60, com indicador de fluorescência UV 254 nm, com 0,20 mm de espessura (MACHEREY – NAGEL - MN). Para as revelações das substâncias, reveladores químicos e físicos foram aplicados nas cromatoplasmas de sílica como método colorimétrico para revelar diversas classes químicas, de acordo com Wagner, Bladt & Zgainski (1984). Foram utilizados reveladores químicos como solução de sulfato de cério IV (VETEC), solução de cloreto férrico (VETEC), solução de anisaldeído sulfúrico, vapores de Iodo, solução metanólica de KOH a 10% e reagente de Dragendorff para a revelação de alcaloides, e reveladores físicos como irradiação no UV (254 e 365 nm).

O extrato hexânico foi submetido a análise por CCDC e revelação de constituintes químicos com KOH e vapor de iodo, bem como reveladores UV na faixa de 254 nm e e 365 nm. O extrato em questão não foi submetido a fracionamento em coluna cromatográfica.

O extrato metanólico do bulbo foi submetido à partição, onde 10 g de extrato bruto metanólico foram solubilizados em 500 mL de solução de MeOH e água destilada (7:3), transferidos para um funil de separação de 2 L e extraídos três vezes com 500 mL de cada um dos solventes utilizados na partição, totalizando 1,5 L de cada solvente utilizado no processo. A partição foi realizada com diclorometano (DCM) e acetato de etila (AcOEt). A fase DCM foi fracionada em coluna cromatográfica aberta utilizando Florisil como fase estacionária e eluição com gradiente de sistemas DCM 100%, DCM/MeOH e MeOH 100%.

A massa de amostra utilizada foi de 2 g para 100 g de Florisil, numa proporção de 1 g de amostra para 50 g de Florisil (1:50), e foi preparada pastilha com Florisil para a inserção do material na coluna. Das frações geradas, 4 frações foram separadas e fracionadas utilizando sílica gel como fase estacionária, e gradiente de sistemas que variaram de Hex/DCM, DCM/MeOH e MeOH 100%. As substâncias foram identificadas/elucidadas por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  (mono e bidimensionais), e análise em Espectrometria de Massas. As análises dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram realizadas em equipamento de 300 MHz (BRUKER Fourier 300) e as de Massas por Ionização por Eletrospray (ESI) em instrumento micrOTOF-Q (BRUKER). O processamento dos espectros de RMN das substâncias foi realizado utilizando o programa ACD/ChemSketch (ACD LABS).

#### **Ensaio antimicrobiano – Concentração inibitória mínima (MIC)**

Neste estudo foram realizados ensaios microbianos para as seguintes bactérias: *Aeromonas hydrophila* (ATCC 7966), *Edwardsiella tarda* (ATCC 15947), *Escherichia coli* (ATCC 11775), *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 13525), *Serratia marcescens* (ATCC 13880), *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Enterobacter cloacae* (ATCC 13047), *Morganella morganii* (ATCC 8019), *Propionibacterium acnes* (ATCC 6919), *Yersinia enterocolitica* (ATCC 9610), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606), cedidas pela Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária – CRMVS, FIOCRUZ-INCQS, Rio de Janeiro, RJ.

A atividade antibacteriana foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo para avaliar a concentração inibitória mínima (CIM) segundo orientações propostas por CLSI (2002), a partir da concentração de 1000  $\mu\text{g/mL}$  a 7,8  $\mu\text{g/mL}$ , e das substâncias a partir da concentração de 500 a 3,9  $\mu\text{g/mL}$ . Cada microplaca foi avaliada através da leitura espectrofotométrica em 625 nm. Os dados obtidos foram processados utilizando-se o programa estatístico Origin 8.

#### **Ensaio antitumoral**

Foram utilizadas linhagens de células neoplásicas: HCT116 (carcinoma colorretal humano), MCF-7 (carcinoma de mama), SK-Mel-28 (melanoma humano) e uma linhagem não neoplásica: MRC-5 (fibroblasto de pulmão humano). Estas foram cultivadas em meio DMEM, suplementadas com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de  $\text{CO}_2$ . As amostras foram dissolvidas em DMSO na concentração estoque de 5 mg/mL para substâncias isoladas e de 20 mg/mL para os extratos brutos, e posteriormente separadas para teste nas concentrações de 50  $\mu\text{g/mL}$  para extratos brutos e 20  $\mu\text{M}$  para substâncias isoladas.

#### **Teste do Alamar blue**

O teste do Alamar Blue foi realizado conforme metodologia descrita por Ahmed, Gogal, Walsh, (1994) com o intuito de analisar a viabilidade celular das células testadas na presença de diferentes concentrações das substâncias e dos

extratos testados. Células cultivadas em garrafa de cultura com meio DMEM foram contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas em placas de 96 poços. A cada poço foram adicionadas  $1 \times 10^4$  células em 200  $\mu$ L de meio de cultura. A placa foi incubada por 24 h em estufa a 37 °C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após este tempo, as células foram tratadas por 72 h. Como controle positivo, foi utilizada a Doxorubicina a 5  $\mu$ g/mL. O grupo controle recebeu no poço a mesma quantidade de DMSO da maior concentração das substâncias e extratos. Após 24 h de tratamento, 10 mL da solução de uso de Alamar Blue (solução estoque a 0,4% 1:5 em meio de cultura sem soro fetal bovino) foi adicionada em cada poço da placa. Após 3 h de exposição ao Alamar Blue, a placa foi retirada da estufa meia hora antes do término e a fluorescência foi medida usando-se um leitor de placas de Elisa (Beckman e Coulter®). Os resultados foram analisados segundo suas médias e respectivos erros-padrão.

### 3. Resultados e Discussão

#### Caracterização das substâncias

O extrato hexânico apresentou a precipitação de uma substância cristalizada mediante evaporação, que foi submetida então a análise de CCDC. A análise em CCDC indicou a presença de um constituinte majoritário, isolado, revelado com KOH e com o vapor de iodo, que apresentou intensa fluorescência sob irradiação UV, especificamente no comprimento de onda 254 nm, indicando se tratar de uma substância aromática, possivelmente da classe das antraquinonas. Devido a facilidade na obtenção desta amostra, não houve necessidade de realizar fracionamento em coluna cromatográfica, sendo enviada então a análise por RMN. A substância em questão foi nomeada de **substância 1**.

A substância **1** foi isolada como cristais amorfos de cor amarela, sua fórmula molecular de C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>O<sub>4</sub> foi estabelecida com base nos seus dados de espectrometria de massas por ESI/MS [M]<sup>+</sup>, 273,11 *m/z*. No espectro de RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz) da substância **1**, foram observados sinais típicos de hidrogênios de metilas em  $\delta$  1,33 (3H, d, *J* = 6,05) e  $\delta$  1,51 (3H, d, *J* = 6,6), dois sinais de hidrogênios referentes a um metileno em  $\delta$  2,17 (ddd, *J* = 18,25; 10,24; 3,8, 1H) e  $\delta$  2,72 (dt, *J* = 18,25; 2,5, 1H). Um sinal de singleto em  $\delta$  3,97 (3H) indicativo de metoxila (O-CH<sub>3</sub>), substituinte comumente presente nas substâncias isoladas desta espécie. Os sinais em  $\delta$  7,24 (d, *J* = 7,54),  $\delta$  7,61 (t, *J* = 8,0) e  $\delta$  7,68 (d, *J* = 7,54) são sinais característicos de hidrogênios ligados a anel aromático. Nos espectros de <sup>13</sup>C e DEPT 135° observaram-se três carbonos metílicos (CH<sub>3</sub>), sendo um ligado a oxigênio (metoxila), um carbono metilênico (CH<sub>2</sub>), cinco carbonos metínicos e sete carbonos quaternários (C), totalizando 16 carbonos na estrutura. No mapa de contorno COSY e no mapa de contorno HMBC pôde-se observar as correlações de carbono e hidrogênio típicas de anéis ou ciclos, em específico as correlações entre os sinais  $\delta$  7,24 (d, *J* = 7,54),  $\delta$  7,61 (t, *J* = 8,0) e  $\delta$  7,68 (d, *J* = 7,54). Por estes dados e em comparação com dados da literatura (Hara et al., 1997; Kusuma et al., 2010; Malheiros, 2008; Shibuya et al., 1997), a substância **1** foi identificada como sendo a naftoquinona **eleuterina** em mistura.

A análise por CCDC das fases geradas a partir da partição do extrato metanólico, indicou a presença de classes de terpenos, flavonoides (na revelação com cloreto de alumínio) e antraquinonas. A fase DCM se mostrou a mais interessante que a fase acetato de etila (AcOEt) por apresentar uma maior variedade de substâncias reveladas por reveladores químicos e fluorescência em UV, sendo, portanto, selecionada para fracionamento. Após o fracionamento da fase DCM, suas frações foram fracionadas em coluna, o que permitiu o isolamento das substâncias **2-5**, posteriormente enviadas para análise em RMN e caracterizadas a seguir.

A substância **2** foi isolada como um sólido marrom amarelado. Sua fórmula molecular de C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>O<sub>9</sub> foi estabelecida com base nos seus dados de espectrometria de massas por ESI/MS [M+H]<sup>+</sup>, 419,1337 *m/z*. No espectro de RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz) da substância **2**, foram observados sinais típicos de hidrogênios de metilas (CH<sub>3</sub>) região entre  $\delta$  0,81 e  $\delta$  2,73, sinais de hidrogênios de metilenos em  $\delta$  3,50 e 3,70 e sinais de metinos (CH) na região entre  $\delta$  3,24 e 3,38, estes sendo hidrogênios

típicos de açúcares. O duplete em  $\delta$  4,99 (1H,  $J = 7,26$  Hz) demonstra a presença de hidrogênio próximo a oxigênio. Na região entre  $\delta$  6,21 e 7,31, há sinais típicos de hidrogênios ligados a anéis aromáticos. Os demais hidrogênios não foram considerados como sendo da substância, tal como o sinal em  $\delta$  1,20, típico de metilas de graxas ou lipídios, comumente isoladas de materiais extraídos com solventes mais apolares como hexano e diclorometano. No espectro de  $^{13}\text{C}$  foram observados sinais de dois carbonos metílicos ( $\text{CH}_3$ ), um sinal de carbono metilênico ( $\text{CH}_2$ ), dez sinais carbonos metínicos ( $\text{CH}$ ) e oito sinais de carbonos quaternários (C), totalizando 21 carbonos na estrutura. A análise das correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC, permitiu correlacionar os deslocamentos químicos que confirmaram a presença de anéis aromáticos na estrutura, além de correlações que demonstraram a presença de hidrogênios típicos de açúcares, mais especificamente da região entre  $\delta$  3,24 e  $\delta$  3,38 do espectro de  $^1\text{H}$ . Por estes dados, e em comparação com dados da literatura (Gallo et al., 2010), a substância **2** foi identificada como sendo o policetídeo **eleuterinol-8-O- $\beta$ -glicosídeo**. Esta substância foi previamente isolada somente por Gallo e colaboradores (2010), tornando este o segundo relato do isolamento deste policetídeo na literatura. Ainda, não há também relatos de ensaios biológicos com esta substância.

A substância **3** em análise por espectrometria de massas por ESI/MS  $[\text{M}+\text{H}]^+$  revelou íon pico molecular majoritário de 245,0813  $m/z$ , com fórmula molecular de  $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{O}_4$ . No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz) pôde-se observar um duplete em  $\delta$  1,74 (3H,  $J = 6,5$ ) típico de hidrogênio de metila, além de um sinal intenso de singlete em  $\delta$  4,12, característico de metilas ligadas à oxigênio. Na região entre  $\delta$  5,70 e  $\delta$  7,88, verificou-se a presença de sinais típicos de hidrogênios ligados a carbonos de anéis aromáticos. Através das análises dos espectros de  $^{13}\text{C}$ , pôde-se definir que a substância em questão possui sinais de dois carbonos metílicos ( $\text{CH}_3$ ), cinco sinais carbonos metínicos ( $\text{CH}_2$ ) e 7 sinais de carbonos quaternários (C), totalizando 14 carbonos na estrutura. No mapa de contorno do COSY e no mapa de contorno do HMBC, pôde-se correlacionar os deslocamentos químicos que confirmaram a presença de anéis aromáticos na estrutura, além de correlações que demonstraram carbonos quaternários ligados a oxigênio. Por estes dados e em comparação com dados da literatura (Ieyama; Gunawan-Puteri; Kawabata, 2011; Shibuya et al., 1997), a substância **3** foi identificada como sendo o naftaleno eleuterol.

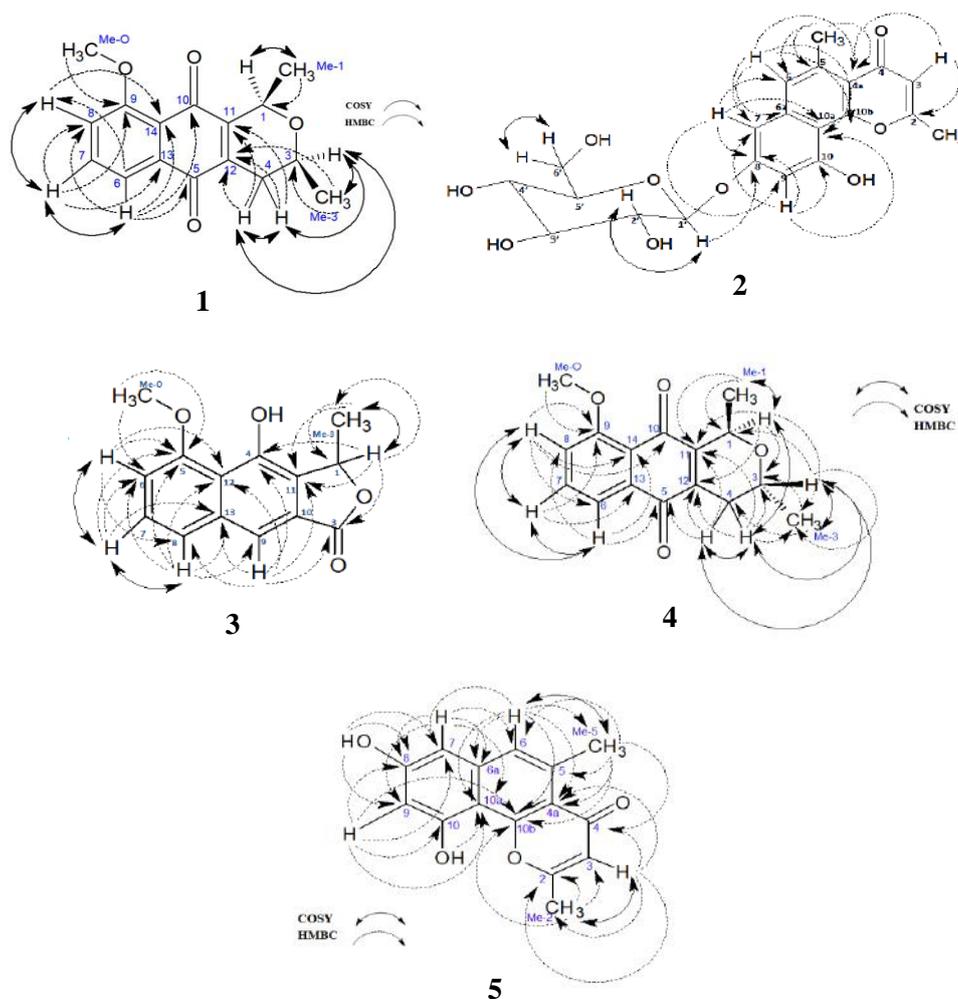
A substância **4** em análise por espectrometria de massas por ESI/MS  $[\text{M}]^+$  revelou íon pico molecular majoritário de 273,11  $m/z$ , com fórmula molecular de  $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_4$ . Os dados espectrais desta substância possuem grande semelhança com a substância eleuterine. No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz) foram observados sinais típicos de hidrogênios de metilas nos sinais em  $\delta$  1,34 (3H, d,  $J = 6,05$ ) e  $\delta$  1,54 (3H, d,  $J = 6,71$ ), onde comprova-se a diferença na estrutura da eleuterine pela constante de acoplamento da metila em  $\delta$  1,54. Foi possível visualizar também sinais de hidrogênios de metilenos em  $\delta$  2,23 (ddd,  $J = 19,0; 10,2; 1,8$ ) e 2,69 (dd,  $J = 19,0; 3,3$ ). O sinal de singlete em  $\delta$  4,01 (3H) representa um sinal bem característico de metoxila. Os sinais em  $\delta$  7,28 (d,  $J = 8,0$ ),  $\delta$  7,64 (t,  $J = 8,0$ ) e  $\delta$  7,73 (dd,  $J = 8,0; 1,0$ ) são sinais típicos de hidrogênios ligados a anel aromático. Através das análises dos espectros de  $^{13}\text{C}$  pôde-se definir que a substância em questão possui três carbonos metílicos ( $\text{CH}_3$ ), sendo um ligado à oxigênio (metoxila), um carbono metilênico ( $\text{CH}_2$ ), cinco carbonos metínicos e sete carbonos quaternários (C), totalizando 16 carbonos na estrutura. Através das análises dos mapas de contorno COSY e HMBC puderam-se observar as correlações de carbono e hidrogênio típicas de anéis ou ciclos, em específico as correlações entre os sinais  $\delta$  7,28 (d,  $J = 8,0$ ),  $\delta$  7,64 (t,  $J = 8,0$ ) e  $\delta$  7,73 (dd,  $J = 8,0; 1,0$ ). Por estes dados e em comparação com dados da literatura (Gallo et al., 2010; Hara et al., 1997; Kusuma et al., 2010; Malheiros, 2008; Shibuya et al., 1997), a substância **4** foi identificada como sendo a naftoquinona isoeleuterine.

A substância **5** através da análise por espectrometria de massas por ESI/MS  $[\text{M}]^+$  revelou íon pico molecular majoritário de 257,0806  $m/z$ , com fórmula molecular de  $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_4$ . No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz) foram observados sinais típicos de hidrogênios de metilas nos sinais em  $\delta$  2,37 (3H, s) e  $\delta$  2,70 (3H, s), bem como sinais característicos de hidrogênios ligados a anéis aromáticos em  $\delta$  6,18 (s), 6,55 (d,  $J = 2,2$ ), 6,58 (d,  $J = 2,2$ ) e 7,19 (s). Foi possível visualizar

também sinais de hidrogênios bem desprotegidos em  $\delta$  10,11 (s) e 10,21 (s), característicos de hidroxilas ligadas à anéis aromáticos. Através das análises dos espectros de  $^{13}\text{C}$  pôde-se definir que a substância em questão possui dois carbonos metílicos ( $\text{CH}_3$ ), quatro carbonos metínicos ( $\text{CH}$ ) e nove carbonos quaternários ( $\text{C}$ ), totalizando 15 carbonos na estrutura. Através das análises dos mapas de contorno COSY e HMBC pôde-se observar as correlações de carbono e hidrogênio que possibilitaram a interpretação da estrutura, como por exemplo, as correlações dos hidrogênios em  $\delta$  10,11 (s) e 10,21 (s) com os carbonos ligados aos hidrogênios em  $\delta$  6,18 (s), 6,55 (d,  $J = 2,2$ ), 6,58 (d,  $J = 2,2$ ) e 7,19 (s), comprovando a proximidade entre eles e a formação de um padrão de interação cíclico. Por estes dados, e em comparação com dados da literatura (Gallo et al., 2010; Hara et al., 1997; Kusuma et al., 2010; Malheiros, 2008; Shibuya et al., 1997), a substância 5 foi identificada como sendo a naftopirona eleuterinol.

A partir dos dados obtidos das análises de RMN monodimensionais (carbono e hidrogênio) e bidimensionais (COSY e HMBC), aliadas a informações contidas na literatura, foi possível a montagem gráfica de cada molécula citada anteriormente utilizando o programa ACD/ChemSketch, demonstradas na Figura 1 abaixo. Na figura, cada número representa as respectivas substâncias descritas anteriormente neste tópico, numeradas de 1-5.

**Figura 1** – Estruturas químicas das substâncias 1-5.



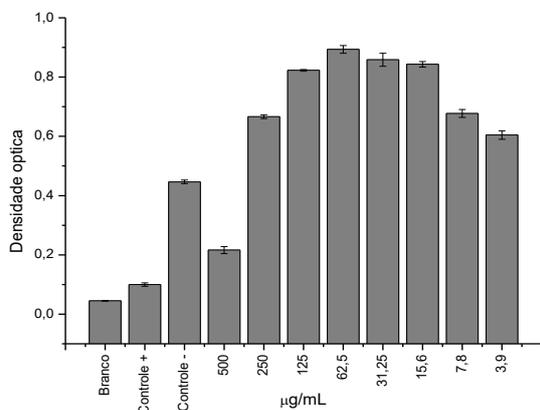
Fonte: ACD/ChemSketch.

### **Ensaio antimicrobiano – Concentração inibitória mínima (MIC)**

No ensaio antimicrobiano, apenas 2 das 5 substâncias apresentaram CIM de pelo menos 50% de inibição, contra *S. aureus* e *P. fluorescens*: eleuterol e isoeleuterine. Para o eleuterol, observou-se que houve uma inibição de 51,59% na concentração de 500 µg/mL contra *S. aureus* (Figura 2), e de 65,43% na concentração de 500 µg/mL, contra *P. fluorescens* (Figura 3). Já para a isoeleuterine, observou-se que houve uma inibição de 49,13% na concentração de 500 µg/mL contra *S. aureus* (Figura 4), quando comparado com o crescimento do controle negativo, e de 81,23% na concentração de 500 µg/mL contra *P. fluorescens* (Figura 5). Ambas as substâncias apresentaram praticamente o mesmo potencial frente a *S. aureus*, já frente a *P. fluorescens*, isoeleuterine apresentou inibição mais elevada que eleuterol. Isto pode ser justificado pelo fato que as atividades biológicas das naftoquinonas estão diretamente relacionadas com os seus aspectos estruturais, sendo ativas ou inativas, por exemplo, pela simples retirada de um metileno (Araújo, Alencar & Rolim-Neto, 2002). Com isso, é provável que a mudança na posição do hidrogênio e da metila do C-3 da estrutura de ambos influencie no potencial antimicrobiano.

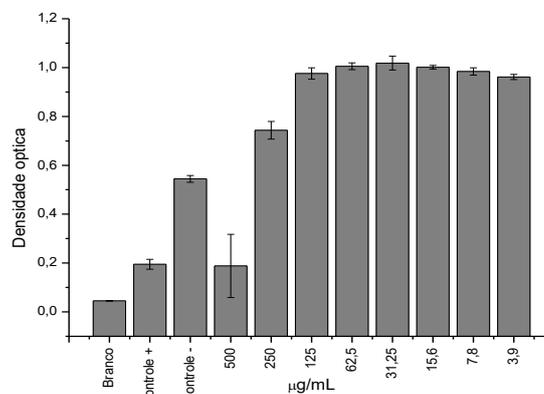
Ainda, é interessante pontuar que, em outro estudo, o potencial inibitório contra *S. aureus* foi confirmado utilizando o extrato diclorometânico do bulbo (Borges et al., 2020), enquanto que neste estudo, eleuterol, que apresentou potencial inibitório contra *S. aureus*, foi extraído do extrato diclorometânico do bulbo também, indicando que esta substância, em sinergia com outras presentes no extrato, seja a principal responsável por tal potencial antimicrobiano.

**Figura 2** - Crescimento bacteriano (média e desvio padrão) em diferentes concentrações para a substância eleuterol frente a *S. aureus*.



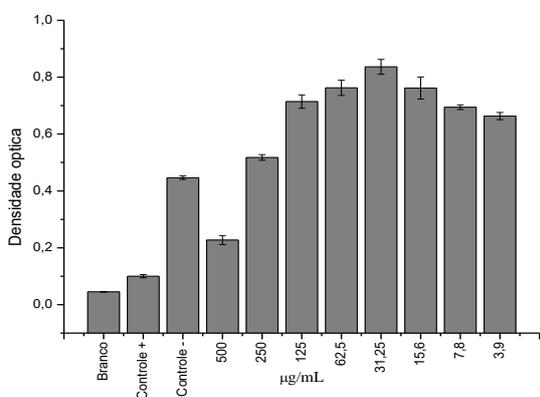
Fonte: Programa estatístico Origin 8.

**Figura 3** - Crescimento bacteriano (média e desvio padrão) em diferentes concentrações para a substância eleuterol frente a *P. fluorescens*.



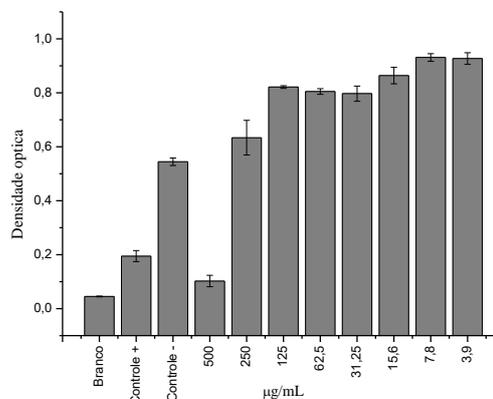
Fonte: Programa estatístico Origin 8.

**Figura 4** - Crescimento bacteriano (média e desvio padrão) em diferentes concentrações para a substância isoeleuterine frente a *S. aureus*.



Fonte: Programa estatístico Origin 8.

**Figura 5** - Crescimento bacteriano (média e desvio padrão) em diferentes concentrações para a substância isoeleuterine frente a *P. fluorescens*.



Fonte: Programa estatístico Origin 8.

Ao observar os gráficos, é interessante focar nos menores valores de densidade óptica, em 500 µg/mL e compará-los com os grupos controle, para ficar claro o potencial inibitório das substâncias testadas.

## Ensaio antitumoral

Na avaliação antitumoral, todos os extratos foram testados juntamente com a substância eleuterina (1) quanto ao seu potencial antitumoral, por apresentarem massa suficiente para o teste. Nenhuma das amostras mostrou uma citotoxicidade significativa frente às linhagens tumorais, com exceção do extrato hexânico do bulbo, como demonstrado na Tabela 1. Todas as linhagens apresentaram entre 10-30% de morte celular após 24 h de reação com os extratos e a substância, contudo, o extrato hexânico do bulbo apresentou uma porcentagem de letalidade de 50-60% contra as linhagens MCF-7, MRC-5 e SK-

Mel-28, valores que se aproximam dos apresentados pela doxorubicina, o que torna este extrato um extrato interessante para análise das substâncias presentes e estudos de sinergia com substâncias para explorar seu potencial de uma maneira mais profunda. Ainda, é interessante ressaltar que a naftoquinona eleuterina apresentou uma porcentagem de letalidade de aproximadamente 10-30% contra todas as linhagens, sendo ela originária do extrato hexânico do bulbo que apresentou uma letalidade de 50-60%, demonstrando que eleuterina não é a principal responsável pela atividade antitumoral, podendo ser que ela contribua para este potencial quando em sinergia com outras substâncias. Com isso, torna-se importante fracionar o extrato hexânico para isolar as substâncias responsáveis por esta atividade.

As quinonas são conhecidas por apresentarem alta citotoxicidade, e com isso serem responsáveis por intensa atividade antitumoral, devido a suas estruturas químicas apresentarem unidade quinonoídica capaz de gerar intermediários alquilantes, conhecidos por serem agentes antineoplásicos biorredutores, através da ativação por redução de suas carbonilas quinonoídicas (Brand & Fisher, 1990; Gaudiano & Koch, 1991; Salmon-Chemin et al., 2001; Silva, Ferreira & Souza, 2003; Lin et al., 1984).

Kusuma e colaboradores (2010) realizaram teste antitumoral com a naftoquinona eleuterina isolada de *E. americana* cultivada na Indonésia, contra células de melanoma B16, obtendo resultados positivos com inibição de 87% das células tumorais nas concentrações de 50 e 25 µg/mL. (Krishnan & Bastow, 2000) descreveram atividade antitumoral de eleuterina, isolada também de *E. americana*, ao relatar a capacidade da substância de inibir a ação da topoisomerase II, uma importante enzima na replicação do DNA que ao ser inibida em células tumorais, impede que as mesmas continuem a se replicar, impedindo então a proliferação e crescimento do tumor.

**Tabela 1** – Determinação da morte celular de linhagens de células tumorais frente à extratos de *Eleutherine bulbosa* e à naftoquinona eleuterina.

EXTRATO/ SUBSTÂNCIA	MORTE CELULAR (%)			
	LINHAGENS DE CÉLULAS			
	MCF-7	MRC-5	HCT116	SK-MEL-28
Bulbo – Hexano	50,23	59,61	42,63	53,58
Bulbo – MeOH	27,15	34,25	10,93	22,74
Folha – DCM	18,83	12,72	14,39	23,29
Folha – MeOH	19,53	25,01	21,22	22,60
Folha – H <sub>2</sub> O	23,63	26,38	25,23	13,65
Flor – MeOH	23,27	30,00	18,04	9,73
Flor – H <sub>2</sub> O	17,68	17,93	20,81	13,68
Eleuterina	30,10	33,81	11,47	15,29
Doxorrubicina (controle positivo)	62,76	67,11	62,56	66,08
DMSO (controle negativo)	0	0	0	0

Fonte: programa Graph Prism (versão 5).

Na tabela acima, é importante focar na porcentagem de morte celular de cada substância e comparar com o controle positivo, e assim, é possível observar que o extrato hexânico do bulbo apresentou um potencial antitumoral bem próximo aos valores do controle positivo, destacando o seu potencial e tornando-o extremamente interessante para estudos posteriores.

#### 4. Conclusão

A análise fitoquímica de *Eleutherine bulbosa* coletada no bioma amazônico, revelou a presença quinonas e derivados de quinonas. Foi possível o isolamento e caracterização de cinco substâncias: eleuterina, eleuterol, eleuterinol-8-*O*-β-glicosídeo, isoeleuterina e eleuterinol. O ensaio antitumoral revelou que o extrato hexânico do bulbo conseguiu matar 50-60% das células tumorais de MCF-7, MRC-5 e SK-Mel-28, sendo promissor para posteriores ensaios a fim de explorar seu potencial. Os extratos de folhas, flores e bulbo, juntamente com a naftoquinona eleuterina, não apresentaram potencial antitumoral frente às linhagens tumorais testadas. O ensaio antimicrobiano revelou que das substâncias isoladas, apenas eleuterol e isoeleuterina apresentaram ação antimicrobiana, com CIM de 500 µg/mL contra *S. aureus* e *P. fluorescens*.

Os resultados deste estudo contribuiram para o conhecimento químico e potencial biológico de *Eleutherine bulbosa* do bioma amazônico, contudo, em estudos posteriores faz-se necessário o teste das substâncias isoladas e em sinergia com outras substâncias, contra diferentes linhagens tumorais e cepas bacterianas para explorar ainda mais o potencial desta espécie. Esses dados aqui podem ser usados em futuros trabalhos comparativos da química da espécie e gêneros inclusos em sua tribo, para estudos quimiotaxonômicos, aliados com dados de morfologia e genética para a solução de problemas taxonômicos.

## Referências

- Ahmed, S. a, Gogal, R. M., & Walsh, J. E. (1994). A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H] thymidine incorporation assay. *Journal of Immunological Methods*, 170(703), 211–224. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(94\)90396-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(94)90396-4).
- Araújo, E. L., Alencar, J. R. B., & Rolim Neto, P. J. (2002). Lapachol: segurança e eficácia na terapêutica. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 12, 57–59. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2002000300028>.
- Borges, E. S., Galucio, N. C. da R., Veiga, A. S. S., Busman, D. V., Lins, A. L. F. de A., Bahia, M. de O., Rissino, J. D., Correa, R. M. dos S., Burbano, R. M. R., Marinho, A. M. R., Casique, J. V., Percário, S., & Dolabela, M. F. (2020). Botanical studies, antimicrobial activity and cytotoxicity of *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. *Research, Society and Development*, 9(11), e3369119992. <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i11.9992>.
- Brand, D. J., & Fisher, J. F. (1990). Reductive transformations of 10-deoxydaunomycinone. *The Journal of Organic Chemistry*, 55(2), 2518–2530. <https://doi.org/10.1021/jo00295a052>.
- Cardoso, D., Särkinen, T., Alexander, S., Amorim, A. M., Bittrich, V., Celis, M., ... & Forzza, R. C. (2017). Amazon plant diversity revealed by a taxonomically verified species list. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(40), 10695–10700. <https://doi.org/10.1073/pnas.1706756114>.
- Couto, C. L. L., Moraes, D. F. C., Cartágenes, M. do S. S., Amaral, F. M. M. do, & Guerra, R. N. (2016). *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb.: A review study. *Journal of Medicinal Plants Research*, 10(21), 286–297. <https://doi.org/10.5897/JMPR2016.6106>
- Fitri, Y., & Rosidah, E. S. (2014). Effects of inhibition cell cycle and apoptosis of sabrang onion extract (*Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb.) on breast cancer cells. *International Journal of PharmTech Research*, 6(4), 1392–1396. <https://doi.org/10.20902>
- Gallo, F. R., Palazzino, G., Federici, E., Iurilli, R., Galeffi, C., Chifundera, K., & Nicoletti, M. (2010). Polyketides from *Eleutherine bulbosa*. *Natural Product Research*, 24(16), 1578–1586. <https://doi.org/10.1080/14786419.2010.500007>
- Galves, J., Oliveira, D. A., & Correia, K. B. (2021). Bioprospecção na Amazônia: um mapeamento sistemático dos recursos biológicos e genéticos. Em *Sustentabilidade informacional em ecossistemas de conhecimentos*. Manaus: EDUA. [http://repositorioinstitucional.uea.edu.br/bitstream/riuea/3303/2/Sustentabilidade\\_informacional%20%282%29.pdf](http://repositorioinstitucional.uea.edu.br/bitstream/riuea/3303/2/Sustentabilidade_informacional%20%282%29.pdf)
- Gaudiano, G., & Koch, T. H. (1991). Redox chemistry of anthracycline antitumor drugs and use of captodative radicals as tools for its elucidation and control. *Chemical Research in Toxicology*, 4(16), 2–16. <https://doi.org/10.1021/tx00019a001>
- Hara, H., Maruyama, N., Yamashita, S., Hayashi, Y., Lee, K.-H., Bastow, K. F., Chairul, R. M., & Imakura, Y. (1997). Elecanacin, a novel new naphthoquinone from the bulb of *Eleutherine americana*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 45(10), 1714–1716. <https://doi.org/10.1248/cpb.45.1714>
- Ieyama, T., Gunawan-puteri, M. D. P. T., & Kawabata, J. (2011).  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors from the bulb of *Eleutherine americana*. *Food Chemistry*, 128(2), 308–311. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.021>
- Insanu, M., Kusmardiyani, S., & Hartati, R. (2014). Recent Studies on Phytochemicals and Pharmacological Effects of *Eleutherine Americana* Merr. *Procedia Chemistry*, 13, 221–228. <https://doi.org/10.1016/j.proche.2014.12.032>
- Kamarudin, A.A.; Sayuti, N.H.; Saad, N.; Razak, N.A.A.; \* Esa, N.M.(2021). *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. Bulb: Review of the Pharmacological Activities and Its Prospects for Application. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 6747. <https://doi.org/10.3390/ijms22136747>.
- Komura, H., Mizukawa, K., Minakata, H., Huang, H., Qin, G., & Xu, R. (1983). New Anthraquinones from *Eleutherine americana*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 31(11), 4206–4208. <https://doi.org/10.1248/cpb.31.4206>
- Krishnan, P., & Bastow, K. F. (2000). Novel mechanisms of DNA topoisomerase II inhibition by pyranonaphthoquinone derivatives-eleutherin, alpha lapachone, and beta lapachone. *Biochemical Pharmacology*, 60(00), 1367–1379. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(00\)00437-8](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(00)00437-8)
- Kusuma, I. W., Arung, E. T., Rosamah, E., Purwatiningsih, S., Kuspradini, H., Syafrizal, Astuti, J., Kim, Y. U., & Shimizu, K. (2010). Antidermatophyte and antimelanogenesis compound from *Eleutherine americana* grown in Indonesia. *Journal of Natural Medicines*, 64(2), 223–226. <https://doi.org/10.1007/s11418-010-0396-7>
- Lestari, D.; Kartika, R.; & Marlina, E. (2019) Antioxidant and anticancer activity of *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb on leukemia cells L1210. *Journal of Physics: Conference Series, The 2nd International Conference on Mathematics, Science and Computer Science*, series 1277, Novotel Balikpapan Hotel, Balikpapan, Indonesia. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1277/1/012022>.
- Lin, T.-S., Antonini, I., Cosby, L. A., & Sartorelli, A. C. (1984). 2,3-Dimethyl-1,4-naphthoquinone Derivatives as Bioreductive Alkylating Agents with Cross-Linking Potential. *Journal of Medicinal Chemistry*, 27(6), 813–815. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Malheiros, L. C. D. S. (2008). “Isoeleuterol e Isoeuterina : Potenciais marcadores químicos da tintura de *Eleutherine plicata* Herb (Iridaceae) e atividades microbiológica e antioxidante .” *Universidade Federal do Pará*. <http://repositorio.ufpa.br:8080/jspui/handle/2011/3030>
- Malheiros, L. C. da S., Mello, J. C. P. de, & Barbosa, W. L. R. (2015). *Eleutherine plicata* – Quinones and Antioxidant Activity. In A. V. Rao & L. G. Rao (Eds.), *Phytochemicals - Isolation, Characterisation and Role in Human Health* (pp. 323–338). InTech - Open science, open minds. <https://doi.org/10.5772/59865>
- Martins, A. G., Rosário, D. L. do, Barros, M. N. de, & Jardim, M. A. G. (2005). Levantamento etnobotânico de plantas medicinais, alimentares e tóxicas da Ilha do Combu, Município de Belém, Estado do Pará, Brasil. *Revista Brasileira de Farmácia*, 86(1), 21–30. <http://repositorio.museu-goeldi.br/handle/mgoeldi/184>.

- Nascimento, M. S., Vieira, J. M. S., Malheiros, L. C. S., Júnior, J. O. C. S., Rodrigues, L. C. S., & Barbosa, W. L. R. (2012). Characterisation of isoeleutherine in aqueous extract of *Eleutherine plicata* herb, Iridaceae, active against entamoeba histolytica/ *Entamoeba dispar* in-vitro. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 3(4), 1096–1100. [http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.3\(4\).1096-00](http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.3(4).1096-00)
- Oliveira Neto, A. R., Pinto, M. A., Silva, I. R., Moraes, S. C., & Gomes, M. L. (2007). O uso de *Eleutherine plicata* no tratamento de doenças gastrointestinais na amazônia paraense. In *Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil* (pp. 1–2). Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil. <http://www.seb-ecologia.org.br/revistas/indexar/anais/viiiiceb/pdf/633.pdf>
- Ottobelli, I., Facundo, V. A., Zuliani, J., Luz, C. C., Brasil, H. O. B., Militão, J. S. L. T., & Braz-Filho, R. (2011). Estudo químico de duas plantas medicinais da amazônia: *Philodendron scabrum* k. Krause (Araceae) e *Vatairea guianensis* aubl. (Fabaceae). *Acta Amazonica*, 41(3), 393–400. <https://doi.org/10.1590/S0044-59672011000300009>
- Pereira, A. S., Shitsuka, D. M., Parreira, F., & Shitsuka, R. (2018). *Metodologia da pesquisa científica*. Santa Maria: UAB/NTE/UFSM. [https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/15824/Lic\\_Computacao\\_Metodologia-Pesquisa-Cientifica.pdf?sequence=1](https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/15824/Lic_Computacao_Metodologia-Pesquisa-Cientifica.pdf?sequence=1)
- Reeves, G., Chase, M. W., Goldblatt, P., Rudall, P., Fay, M. F., Cox, A. V., Lejeune, B., & Souza-chies, T. (2001). Molecular systematics of Iridaceae: evidence from four plastid dna regions. *American Journal of Botany*, 88(11), 2074–2087. <https://doi.org/10.2307/3558433>
- Ribeiro, C., Souza, K., Ribeiro, T., Vieira, A., Mendonça, L., Barbosa, W., & Vieira, J. (2013). Avaliação da atividade antimicrobiana de plantas utilizadas na medicina popular da amazônia. *Infarma - Ciências Farmacêuticas*, 21(1/2), 45–49. Recuperado de <http://revistas.cff.org.br/?journal=infarma&page=article&op=view&path%5B%5D=172&path%5B%5D=162>
- Salmon-Chemin, L., Buisine, E., Yardley, V., Kohler, S., Debreu, M. A., Landry, V., Sergheraert, C., Croft, S. L., Krauth-Siegel, R. L., & Davioud-Charvet, E. (2001). 2- and 3-substituted 1,4-naphthoquinone derivatives as subversive substrates of trypanothione reductase and lipoamide dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*: Synthesis and correlation between redox cycling activities and in vitro cytotoxicity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 44(4), 548–565. <https://doi.org/10.1021/jm001079i>
- Santos, D. L., Silva, G. de N. F. da, Moraes, J. S., Souza, K. O. da, Rodrigues, E. M. da S., Fecury, A. A., Dendasck, C. V., Dias, C. A. G. de M., Pinheiro, M. da C. N., Moreira, E. C. de M., Araújo, M. H. M. de, da Silva, I. R., & Oliveira, E. de. (2020). Traditional herbal medicine in a community in northeastern Pará: the use of *Eleutherine plicata* Herb. in the treatment of Amebiasis. *Research, Society and Development*, 9(7), e620974539. <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i7.4539>
- Shi, P., Du, W., Wang, Y., Teng, X., Chen, X., Ye, L. (2019). Total phenolic, flavonoid content, and antioxidant activity of bulbs, leaves, and flowers made from *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. *Food Sci Nutr*. 2019; 7: 148– 154. <https://doi.org/10.1002/fsn3.834>.
- Shibuya, H., Fukushima, T., Ohashi, K., Nakamura, A., Riswan, S., & Kitagawa, I. (1997). Indonesian Medicinal Plants. XX. Chemical Structures of Eleuthosides A, B, and C, Three New Aromatic Glucosides from the Bulbs of *Eleutherine palmifolia* (Iridaceae). *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 45(7), 1130–1134. <https://doi.org/10.1248/cpb.45.1130>
- Silva, M. N. da, Ferreira, V. F., & Souza, M. C. B. V. de. (2003). Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na  $\beta$ -lapachona e derivados. *Química Nova*, 26(3), 407–416. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000300019>
- Vale, V.V.; Cruz, J.N.; Viana, G.M.; Póvoa, M.M.; Brasil, D.D.; Dolabela, M.F. (2020). Naphthoquinones isolated from *Eleutherine plicata* herb: In vitro antimalarial activity and molecular modeling to investigate their binding modes. *Med. Chem. Res.*, 3, 487–494. <https://doi.org/10.1007/s00044-019-02498-z>.
- Vásquez, S. P. F., Mendonça, M. S. De, & Noda, S. do N. (2014). Etnobotânica de plantas medicinais em comunidades ribeirinhas do Município de Manacapuru, Amazonas, Brasil. *Acta Amazonica*, 44(4), 457–472. <https://doi.org/10.1590/1809-4392201400423>
- Wagner, H., Bladt, S., & Zgainski, E. M. (1984). *Plant drug analysis*. New York: Springer Verlag. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-662-02398-3>
- Waode, M.; Widanarni; Yuhana M.; Setiawati M.; Setiawati, M.; & Wahyudi, A. T. (2019) Phytochemical analysis and antibacterial activities of *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. extract against *Vibrio parahaemolyticus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 9 (9), 397-404. <https://doi.org/10.4103/2221-1691.267669>
- Waode, M.; Widanarni; Yuhana M.; Setiawati M.; Setiawati, M.; & Wahyudi, A. T. (2020). Effect in white shrimp *Litopenaeus vannamei* of *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. Powder on immune genes expression and resistance against *Vibrio parahaemolyticus* infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 102, 218-227. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.03.066>.
- Zhengxiong, C., Huizhu, H., Chengrui, W., Yuhui, L., Jianmi, D., Sankawa, U., Noguchi, H., & Iitaka, Y. (1986). Hongconin, a New Naphtalene Derivative from Hong-Cong, the Rhizome of *Eleutherine americana* Merr. et Heyne (Iridaceae). *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 34(7), 2743–2746. <https://doi.org/10.1248/cpb.34.2743>