

## OS CARDENÓLIDOS E OUTROS CONSTITUINTES DAS FOLHAS DE *ASCLEPIAS GLAUCOPHYLLA* (SCHLECHTER) (1)

*Isolou-se das folhas de Asclepias glaucophylla uma mistura de cardenólidos que se conseguiu resolver parcialmente nos seus componentes, com emprego de cromatografia de adsorção e repartição e na qual se identificaram: a uzarigenina, muito provavelmente a coroglaucigenina e um monoglicósido cujo açúcar é a glucose e de que as constantes físicas não correspondem a nenhuma das substâncias já descritas. Além de outros cardenólidos, isolaram-se ainda duas substâncias, uma com carácter fracamente polar e um composto poli-hidroxilado de polaridade elevada.*

J. M. NASCIMENTO  
Serviço de Química  
Laboratório Sanitas  
Lisboa

### 1 — INTRODUÇÃO

A *Asclepias glaucophylla* Schlechter (sinónimo *Gomphocarpus glaucophylla* Schlechter) é uma asclepiadácea selvagem da África Central e do Sul. Esta planta tem um porte de 90 a 120 cm, caule herbáceo e folhas verde-azuladas com 10 cm de comprimento e 3 a 5 cm de largo.

Todas as partes da planta são fortemente amargas e possuem látex abundante. A existência de cardenólidos e de outros esteróides já assinalados nas raízes, assim como o sabor amargo, são indicações da provável existência de compostos do mesmo tipo nas folhas.

Para estabelecer a presença e identificação dos cardenólidos ou de outros compostos fisiologicamente activos extraiu-se por lexiviação com solutos hidroalcoólicos 1,00 kg de folhas secas e pulverizadas após maceração em água durante dois dias a 35° (1). O extracto total obtido produziu uma cor violeta com o reagente de Kedde (2) e o ensaio de alcalóides com o reagente de Meyer (3) deu resultados negativos. O extracto total foi subdividido, como se descreve na parte experimental, em diferentes extractos secos.

### 2 — PARTE EXPERIMENTAL

#### 2.1 — GENERALIDADES

Todos os pontos de fusão foram determinados sobre bloco de Kofler e corrigidos. Os desvios máximos são

de  $\pm 2^\circ\text{C}$  para temperaturas até  $200^\circ\text{C}$  e  $\pm 3^\circ\text{C}$  para temperaturas superiores. As amostras de substância para determinação do poder rotatório e do espectro de ultravioleta e infravermelho foram secas durante 60 minutos a  $70^\circ\text{--}80^\circ\text{C}$  e à pressão de 0,1 mm Hg e para análise elementar, quando não se indicam expressamente as condições, secas durante 5 horas sobre  $\text{P}_2\text{O}_5$  a  $70^\circ\text{C}$  e 0,01 mm Hg e pesadas em barquinha. Para isolamento e purificação de substâncias utilizou-se a evaporação no vácuo, dissolução em Clf-Et (1:4) (2) ou outro solvente, lavagem 2 vezes com HCl 2 N, 2 vezes com  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2 N e 2 vezes com  $\text{OH}_2$ , secagem sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e evaporação no vácuo. A cromatografia de adsorção foi executada sobre  $\text{Al}_2\text{O}_3$  neutro ou gel de sílica pelo método de eluição fraccionada (4). A execução da cromatografia de repartição sobre «hyflo super-cel», a reacção de Kedde, as reacções coradas com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 84% (5) foram executadas segundo técnicas já descritas.

Os espectros de U.V. foram executados num espec-

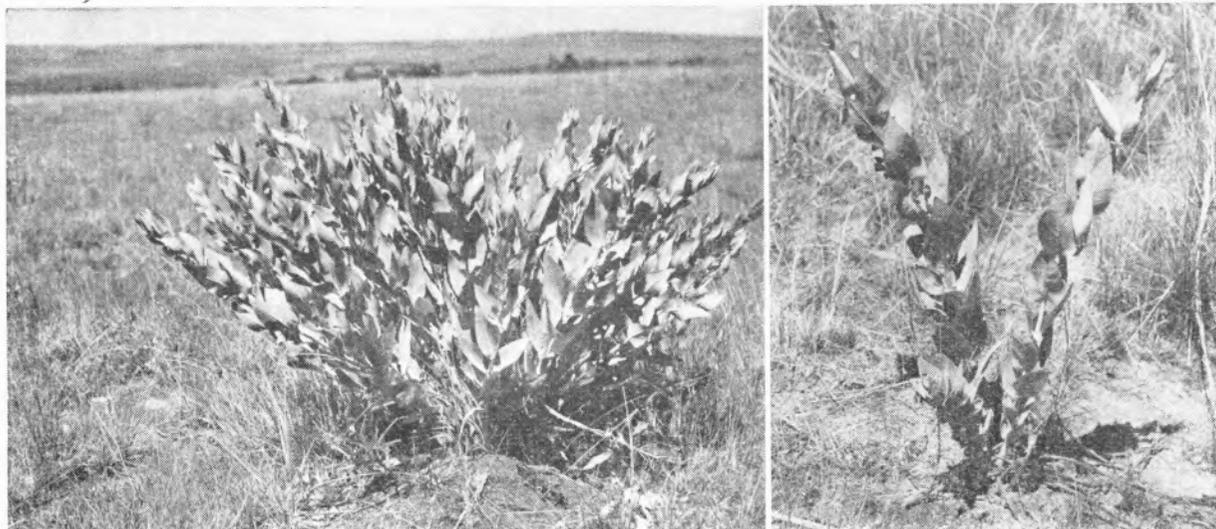
(1) O material de estudo foi colhido em 1956 pelo Dr. POLE EVANS nos arredores de Umtali, na Rodésia do Sul, seco *in loco* e enviado para Basileia para o laboratório do Prof. T. REICHSTEIN, que amavelmente o pôs à nossa disposição.  
(2) Utilizam-se as seguintes abreviaturas, para os solventes: Et-éter dietílico; Alc-etanol; Ac-acetona; Be-benzeno; Bu-n-butanol; Clf-clorofórmio; Me-metanol; M.e.c.-metiletilcetona; Ep-éter de petróleo; Pgl-propileno glicol; Pi-piridina; Fmd-formamida; AcOH-ácido acético.

Cr.P. significa ainda cromatografia em papel e A. M. águas-mães.

trofotómetro Beckmann DU e os espectros de I.V. num espectrofotómetro Perkin-Elmer de duplo feixe, modelo 21, com prisma de NaCl.

As microanálises foram executadas no laboratório de microanálises do Instituto de Química Orgânica da Universidade de Basileia, por E. Thommen.

2 dias a uma temperatura de 35-38°. Após este tempo, juntaram-se 3,5 l de álcool a 95 % e extraiu-se com solução hidroalcoólica, como habitualmente, até esgotar. Os extractos reunidos foram concentrados no vácuo num evaporador rápido a uma temperatura inferior a 45°, até um volume aproximado de 6 l.



*Asclepias glaucophylla* (Schlechter) do leste da Rodésia do Sul. (Foto do Dr. J. B. Pole-Evans)

## 2.2 — EXTRACÇÃO DAS FOLHAS

Pulverizou-se 1 kg de folhas secas num moinho de martelos, adicionaram-se ao pó 3,5 l de água destilada com 5 ml de tolueno e guardou-se na estufa durante

## 2.3 — ENSAIO DE ALCALÓIDES E CARDENÓLIDOS

50 ml deste extracto foram alcalinizados com  $K_2CO_3$  e extraídos 5 vezes com 10 ml de Clf. O extracto de Clf lavou-se 4 vezes com 10 ml de HCl 2 N,

Tabela I

Fr. (N.º)	Solvente	Resíduos				
		mg	Amorfo		Cristais	
			Kedde	CR.P	mg	P.F.
1-9	Ep. 5 % Be	189	—			
10-13	Be	473	—			
14-15	Be-Clf 1 %	268	—		188 H	56-64
16-18	Be-Clf 5 %	226	—			
19-20	Be-Clf 10 %	296	+	A		
21-22	Be-Clf 20 %	264	+	(A) B (B)		
23-24	Be-Clf 50 %	273	+	B <sub>1</sub> B (C)		
25-26	Clf	180	+	B <sub>1</sub> B (C)		
27	Me	209	+	B <sub>1</sub> B (C)		

Os parêntesis significam que a intensidade das manchas é fraca.

2 vezes com cerca de 5 ml de água e foi seco e evaporado. O resíduo apresentava reacção Kedde positiva. Os solutos de HCl e águas de lavagem foram adicionados, levados a pH 9-9,5 com  $K_2CO_3$  e extraídos 5 vezes com Clf. A solução de Clf foi seca com  $Na_2SO_4$  e evaporada. O resíduo não deu precipitado com o reagente de Meyer.

O soluto restante foi concentrado até cerca de 1,7 l, purificado com  $Pb(OH)_2$  segundo técnicas já descritas (5) e subdividido em extractos. Na tabela VII estão indicados os rendimentos dos extractos calculados a partir de 1,00 kg de folhas secas.

#### 2.4 — EXTRACTO DE ÉTER DE PETRÓLEO

Cromatografaram-se 3,17 g de extracto de éter de petróleo sobre 60 g de óxido de alumínio. Para eluição utilizaram-se 200 ml por fracção dos solventes indicados na tabela I.

#### 2.5 — EXTRACTO ETÉREO PURIFICADO

Cromatografou-se 1,71 g de extracto etéreo purificado sobre 45 g de óxido de alumínio. Para eluição utilizaram-se por fracção 150 ml dos solventes indicados na tabela II.

A Fr. 1 foi desprezada.

As Fr. 2 a 9 cristalizaram do Et-Ep, dando 72 mg de cristais puros de subst. A.

As A.M. das Fr. 2 a 9 e as Fr. 10 a 12 foram reunidas com as Fr. 1 a 14 da tabela III do extracto clorofórmico.

As Fr. 16 a 20 cristalizaram do Me-Et, dando 31 mg de cristais de subst. C.

As A.M. das Fr. 16 a 18 foram reunidas às Fr. 13 a 15, Fr. 21 e às Fr. 15 a 22 do extracto clorofórmico da cromatografia da tabela III.

As Fr. 22 a 23 foram reunidas com as do ext. Clf contendo C.

As Fr. 24 a 26 não foram mais trabalhadas.

Tabela II

Fr. (N.º)	Solvente	Resíduos					
		Amorfo			Cristais		
		mg	Kedde	CR.P	mg	P.f.	CR.P
1	Be	3	—		—		
2-5	Be-Clf 10 %	118	+	A	35	241-6	A
6-9	Be-Clf 30 %	246	+	A (B)	37	240-5	A
10-12	Be-Clf 50 %	159	+	A (B)			
13-15	Clf	220	+	A B			
16-18	Clf-Me 1 %	149	+	(A) (B <sub>1</sub> ) BC	4	240-5	C
19-20	Me 2 %	85	+	(B <sub>1</sub> ) C	27	248-52	C
21	Me 5 %	34	+	(B <sub>1</sub> ) C			
22	Me 10 %	20	+	C			
23	Me 25 %	16	+	C			
24-25	Mistura+AcOH 2 %	154	(+)	CD			
26		51	(+)	CD			

Designa-se como mistura a mistura em partes iguais de clorofórmio-metanol-acetato de etilo.

As Fr. 1-13 não foram mais trabalhadas.

Os cristais obtidos das Fr. 14-15 foram sublimados no vácuo a uma temperatura do banho 150°-60°C e a uma pressão de 1 mm Hg. O sublimado recristalizou-se da acetona, obtendo-se cristais lamelares de Pf 73°-75° (subst. H).

As Fr. 19-27 foram reunidas e recromatografadas de novo sobre óxido de alumínio, mas nenhuma fracção cristalizou e não foram mais trabalhadas.

#### 2.6 — EXTRACTO DE CLOROFÓRMIO

Cromatografaram-se 4,42 g de extracto de clorofórmio sobre 125 g de óxido de alumínio. Para eluição empregaram-se 400 ml por fracção de cada um dos solventes indicados na tabela III.

As Fr. 5 a 7 cristalizaram parcialmente, originando 7 mg de cristais de substância A.

As A.M. das Fr. 5 a 7 e as Fr. 1 a 14 foram reunidas

Tabela III

Fr. (Nr.)	Solvente	Resíduos				
		Amorfo			Cristais	
		mg	Kedde	CR.P	mg	P.f.
1-4	Be-Clf 10 %	48	+	A		
5-7	Be-Clf 30 %	102	+	A	7	245-50
8-11	Be-Clf 50 %	60	+	A		
12-14	Clf	365	+	A (B)		
15-16	Me 1 %	630	+	A B (C)		
17-18	Me 2 %	448	+	(A) B C		
19-22	Me 5 %	256	+	(A) (B) B C		
23-24	Me 10 %	135	+	(A) (B) (B) C		
25-26	Me 25 %	67	+	C (C <sub>1</sub> )		
27	Me	54	+	C (C <sub>1</sub> )		
28-29	Mistura-AcOH 5 %	1125	+	(C <sub>1</sub> ) D E		
30	Mistura-AcOH 5 %	475	+	D E		

com as A.M. das Fr. 2 a 9 e Fr. 10 a 12 do extracto etéreo e de novo submetidas à cromatografia sobre Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

Obtiveram-se das Fr. eluídas com Be-Clf 5 % 35 mg de cristais da substância A.

As Fr. 15 a 22 foram reunidas e cromatografadas sobre Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

Das Fr. eluídas com Clf-Me 2 % obtiveram-se 24 mg de substância C.

As Fr. que na cromatografia em papel mostraram apenas a presença de A foram adicionadas às A. M. de A. As Fr. contendo B<sub>1</sub> B e C foram reunidas.

#### 2.7 — EXTRACTO DE CLOROFÓRMIO-ÁLCOOL (2:1)

2.7.1 — *Ensaio de fermentação* — 50 mg de extracto clorofórmio-álcool dissolvem-se em 5 ml de água e são adicionados de 5 ml de soluto de takamilase «Park Davis». Adicionam-se 2 gotas de tolueno e deixa-se 2 dias em estufa a 37°C sob atmosfera de CO<sub>2</sub>. Após este tempo, dissolveu-se o soluto em 20 ml de álcool e filtrou-se sobre uma fina camada de Kieselgur (celite 535). O filtrado evaporou-se no vácuo quase à secura, adicionou-se 5 ml de água e extraiu-se 3 vezes com 5 ml de clorofórmio. Os ex-

Tabela IV

Fr. (Nr.)	Solvente	Resíduos					
		Amorfo			Cristais		
		mg	Kedde	CR.P	mg	P.f.	Kedde
1-4	Clf.	334	+	(A) (B) (B) C			
5-7	Clf. Me 1 %	224	+	C			
8-10	Clf. Me 2 %	1037	+	C			
11-12	Clf. Me 5 %	555	+	C	86	305-8	—
13-15	Clf. Me 10 %	952	+	C (C)	191	300-8	—
16-17	Clf. Me 20 %	576	+	(C) C <sub>1</sub>	102	310-15	—
18-19	Clf. Me 50 %	612	+	(C) C <sub>1</sub> D	232	300-8	—
20	Me	189	+	(C) (D) E	63	300-5	—
21-23	Me-AcOH 1 %	371	—		32	300-5	—

tractos de clorofórmio reuniram-se e evaporaram-se à secura. A cromatografia em papel mostrou as mesmas «manchas» que a substância não fermentada.

O extracto clorofórmio-álcool 2:1 submeteu-se em 2 porções de 6 g à cromatografia sobre 150 g de gel de sílica, utilizando-se 500 ml de solvente por fracção. Os resultados de um desses ensaios estão indicados na tabela IV.

Reuniram-se as fracções da cromatografia do extracto Clf Alc 2:1 contendo A, B, B<sub>1</sub>, C (3,57 g) — para serem submetidas à girardização.

As Fr. contendo C, C<sub>1</sub> 2,78 g foram reunidas e de novo cromatografadas sobre gel de sílica, mas nenhuma das fracções cristalizou.

À fase aquosa juntaram-se 6 ml de solução de HCl conc., deixou-se 22 horas a 18° e extraiu-se 4 vezes com 60 ml de clorofórmio de cada vez (I). Deixou-se 48 horas em repouso, extraiu-se de novo (II) e ainda uma terceira vez ao fim de 7 dias (III).

Resíduo I — 23 mg (Kedde+)  
 » II — 13 mg (Kedde+)  
 » III — 4 mg (Kedde+)

A girardização da fracção principal (3,37 g) originou uma fracção não cetónica de 1,19 g contendo (A), B, B<sub>1</sub>, C e uma fracção cetónica de 1,56 g. A girardização desta fracção cetónica deu de novo origem a 439 mg de substância não cetónica e 629 mg de compostos cetónicos.

Tabela V

Fr. (Nr.)	Volume eluído (ml)	Resíduos					
		Amorfo			Cristais		
		mg	Kedde	CR.P	mg	P.f.	Kedde
1-20	400	8	—				
21-45	880	1194	+	(A) B <sub>1</sub> B	21-H	56-60	—
46-50	100	45	+	B <sub>1</sub> B C			
51-85	680	151	+	C	5-C		+
86-130	880	696	+	C C <sub>1</sub>			
131-51	420	78	+	C <sub>1</sub>			
152-3	25	46	+	C <sub>1</sub>			

As fracções Kedde + reuniram-se de novo para serem submetidas à cromatografia de repartição sobre Kieselgur (hyflo super-cel).

### 2.7.2 — Girardização das fracções da cromatografia do extracto clorofórmio-álcool contendo A, B, B<sub>1</sub>, C

Dissolveram-se 200 mg de substância numa mistura de 2 ml de metanol e 4 ml de álcool absoluto, a que se juntaram 100 ml de reagente T de Girard (6). Após arrefecimento, juntaram-se 0,2 ml de ácido acético e deixou-se em repouso cerca de 18 horas. Adicionaram-se 50 ml de água gelada e extraiu-se 4 vezes com 30 ml de clorofórmio de cada vez. A solução secou-se e evaporou-se, obtendo-se um resíduo de 36 mg. A análise cromatográfica revelou a presença de 4 manchas Kedde (+) A, B, B<sub>1</sub>, C.

### 2.7.3 — Cromatografia das fracções submetidas à girardização

A cromatografia sobre Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> da fracção não-cetónica não originou quaisquer fracções cristalinas (isolaram-se apenas vestígios de C<sub>1</sub>) e estas juntaram-se de novo para serem submetidas à cromatografia de repartição.

As fracções cetónicas apresentavam na cromatografia em papel as mesmas «manchas» Kedde(+) e não foram mais trabalhadas.

### 2.7.4 — Cromatografia de repartição

O kieselgur foi lavado com água destilada quente e escurrido sobre filtro de Buchner até a água não apresentar reacção alcalina ao tornesol. Lavou-se ainda com os seguintes solventes: metanol, benzeno,

clorofórmio e de novo com metanol. Filtrou-se sobre filtro de Buchner e deixou-se 2 dias a 90°-100°C em estufa. 350 g de hyflo assim preparado agitaram-se durante 1 hora com igual quantidade de água e foram utilizados no enchimento de uma coluna de cromatografia de 45 mm de diâmetro interno e 90 cm de altura, segundo a técnica já descrita.

2,78 g de material contendo A, B, C<sub>1</sub> e C e C<sub>1</sub> proveniente da cromatografia sobre Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> do extracto clorofórmio-álcool 2:1 dissolveram-se em acetona e foram adicionadas de 20 g de hyflo-água 1:1, secando-se a mistura em seguida no vácuo a 20°. A mistura de material a cromatografar e hyflo adicionaram-se 40 ml de clorofórmio e despejou-se a suspensão na coluna comprimindo ligeiramente.

O eluente utilizado de início foi o clorofórmio até à fracção 85; em seguida empregou-se clorofórmio-metiletilcetona 1:1 e por fim butanol (Fr. 152 e 3) para a lavagem. O débito de solvente foi de 20 ml/hora aproximadamente.

Os resultados desta cromatografia encontram-se resumidos na tabela v.

As Fr. 1 a 20 foram desprezadas.

As Fr. 21 a 45 foram de novo cromatografadas sobre 30 g de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, obtendo-se por eluição com Be-Clf 30 % 110 mg de substância H cristalizada. As Fr. contendo só B<sub>1</sub> e B foram reunidas às Fr. 46 a 50 e submetidas à cromatografia preparativa em papel.

As Fr. 51 a 85 cristalizaram parcialmente, dando 5 mg de substância C pura. O amorfo foi reunido às A. M. das cristalizações anteriores de C para ser submetido a hidrólise ácida.

As Fr. 86 a 130 contendo C<sub>1</sub> e C não foram mais trabalhadas.

As Fr. 131 a 153 foram reunidas e cromatografadas sobre Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, mas nenhuma delas cristalizou.

#### 2.7.5 — Cromatografia preparativa sobre papel

76 mg de substância proveniente da cromatografia de repartição sobre hyflo foram dissolvidas em 2 ml de clorofórmio e colocados com micropipeta sobre 20 folhas de papel Whatman n.º 1 17×30 cm (0,1 ml por folha) impregnadas com Fmd-Ac (1:3) e cromatografadas no sistema Be-Clf (1:1) durante 2 horas. A localização das substâncias fez-se por revelação com reagente de Kedde das 2 tiras estreitas longitudinais retiradas dos bordos das folhas. As

zonas correspondentes a B e B<sub>1</sub> foram retiradas de cada uma das folhas, embebidas em água e desagregadas mecânicamente, adicionadas de igual volume de metanol, filtradas sobre Buchner e extraídas ainda 3 vezes com metanol. A solução do metanol-água foi concentrada no vácuo e o resíduo extraído com clorofórmio. A solução de clorofórmio lavou-se com água, carbonato de sódio 2 N, novamente com água e secou-se com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e evaporou-se à secura. O extracto da zona correspondente a B foi cromatografado sobre óxido de alumínio e deu 18 mg de resíduo Kedde (+), que na cromatografia sobre papel mostrou a presença de uma única mancha Kedde(+). Este material não se conseguiu cristalizar.

Procedeu-se de igual maneira para a zona correspondente a B<sub>1</sub> e obtiveram-se 26 mg de resíduo Kedde(+), que na cromatografia sobre papel mostrou apenas 1 mancha. Este material também se manteve amorfo.

#### 2.8 — EXTRACTO DE CLOROFÓRMIO-ÁLCOOL (3:2)

Cromatografaram-se 207 mg do extracto de clorofórmio-álcool 3:2 sobre 10 g de gel de sílica. Para eluição empregaram-se 25 ml por fracção de cada um dos solventes indicados na tabela VI.

Tabela VI

Fr. (Nr.)	Solvente	Resíduo		
		mg	Kedde	CR.P
1-2	Clf. Me 2 %	7	+	C, C <sub>1</sub>
3-4	Clf. Me 10 %	12	+	C, C <sub>1</sub>
5-6	Clf. Me 50 %	115	—	
7	Me	7	—	
8	Me AcH 1 %	18	—	

#### 2.8.1 — Ensaio de fermentação

50 mg de extracto clorofórmio-álcool 3:2 foram postos a fermentar com takamilase Park-Davis e procedeu-se como já se descreveu para o extracto de clorofórmio-álcool 2:1. O filtrado procedente da fermentação evaporou-se no vácuo e foi extraído 3 vezes com 5 ml de clorofórmio e ainda de novo 3 vezes com 5 ml da mistura clorofórmio-álcool 2:1. Os extractos de clorofórmio foram reunidos e evaporados à secura, dando um resíduo 6 mg Kedde (+). O resíduo aquoso era Kedde negativo.

O resíduo da extracção pelo clorofórmio e pelo clo-  
rofórmio-álcool 2:1 submetido à cromatografia apre-  
sentava as mesmas manchas que o extracto cloro-  
fórmio-álcool 3:2 não fermentado.

3 — DESCRIÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

3.1 — SUBSTÂNCIA A — UZARIGENINA. Cristalizada do  
Et-Ep, deu cristais prismáticos curtos de ponto de  
fusão 250°-5°C  $[\alpha]_D^{26} = 16,2 \pm 2^\circ$  (c = 1,37 em Me).  
Após secagem usual para análise, não deu perda de  
peso.

$C_{23}H_{34}O_4$  Calculado C 73,76 % H 9,15 % O 17,09 %  
(374,5) Encontrado C 73,33 % H 9,12 %

Após secagem usual para análise, deu 0,5 % de perda  
de peso

$C_{25}H_{36}O_5 + 1/2 OH_2$  Calculado C 70,58 % H 8,70 %  
(416,5) Encontrado C 70,64 % H 8,85 %

O R.f. na cromatografia em papel (figs. 2 e 3),  
assim como as reacções coradas com  $H_2SO_4$  84 %,  
são iguais às que se observam para a mono-O-aceti-  
luzarigenina.

3.2 — SUBSTÂNCIA B — COROGLAUCIGENINA (?) — Não  
se obtiveram cristais.

A reacção de Kedde é positiva e a reacção de Kiliani



Fig. 1

Be-Clf (7:5)/Fmd  
2 horas

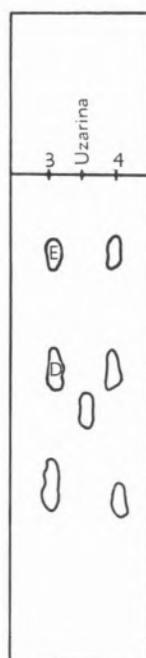


Fig. 2

Bu/H<sub>2</sub>O  
4 horas



Fig. 3

Ep/Etilcelosolve  
1 hora

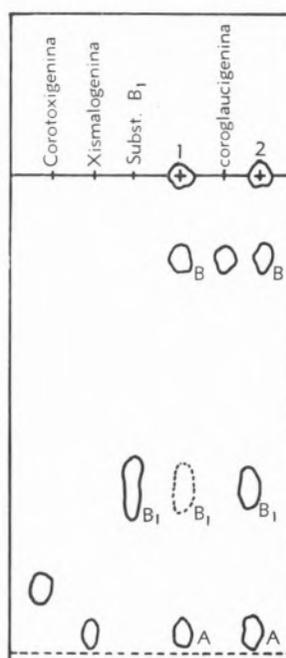


Fig. 4

Clf/Fmd  
1-1,5 horas



Fig. 5

Ep-Be 1:1/Fmd  
1-1/4 hora

A reacção de Kedde é positiva. A sucessão de cores  
com o  $H_2SO_4$  84 % e o Rf na cromatografia em papel  
(fig. 1) são iguais aos valores indicados para a uza-  
rigenina.

3.1.1 — Acetilação — Dissolveram-se 25 mg de substância A de P.f. 240-5°C em 2 ml de piridina e 1,5 ml de anidrido acético e deixaram-se em repouso à temperatura ambiente durante 24 horas. A extracção pela técnica usual deu 30 mg de resíduo incolor. Cristalizou-se do Me-Et, obtendo-se 23 mg de cristais prismáticos de P.f. 255-63°C.

para os glicósidos negativa. O R.f. na cromatografia em papel (fig. 4) é igual ao de uma amostra genuína de coroglaucigenina cristalizada.

3.2.1 — Microacetilação — A 10 mg de substância amorfa, cromatograficamente pura, adicionaram-se 50 mg de anidrido acético e 0,1 ml de piridina, deixando-se a mistura em repouso durante 24 horas. Evaporou-se a piridina no vácuo e dissolveu-se o resíduo em 1 ml de clorofórmio, que se lavou sucessivamente com 1 ml de  $Na_2CO_3$  2 N e 1 ml de água. A solução clorofórmica foi evaporada e o resíduo Kedde (+)

submeteu-se à cromatografia em papel. O R.f. da substância acetilada é igual ao de uma amostra genuína de acetato de coroglaucigenina (fig. 3).

3.2.2—*Substância B<sub>1</sub>*—Não se obtiveram cristais. A reacção de Kedde é positiva e a de Kiliani para os glicósidos é negativa. O R.f. da substância no sistema clorofórmio/formamida em relação à coroglaucigenina é de 4,2 (fig. 4).

3.3—*SUBSTÂNCIA C*—Cristalizada do Me-Et, deu cristais prismáticos curtos de ponto de fusão 251-53°C.

$$[\alpha]_D^{18} = +5,3 \pm 2^\circ \quad (c = 0,93 \text{ em Me})$$

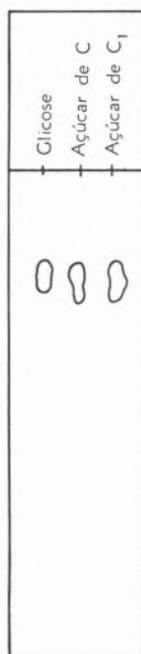


Fig. 6  
Bu/H<sub>2</sub>O  
4 horas



Fig. 7  
Be/Fmd  
1 hora

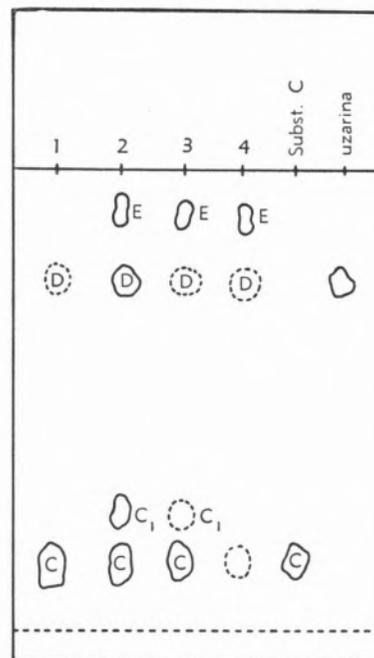


Fig. 8  
Mec/H<sub>2</sub>O  
1,5 horas

A substância foi aquecida durante 5 horas a 100° em vácuo de 0,01 mm Hg.

A perda de peso foi de 5,7 %.

C <sub>29</sub> H <sub>44</sub> O <sub>8</sub>	Calculado	C 66,90 %	H 8,52 %	O 24,58 %
(520,5)	Encontrado	C 66,53 %	H 8,35 %	O 24,38 %
C <sub>29</sub> H <sub>44</sub> O <sub>9</sub>	Calculado	C 64,90 %	H 8,41 %	O 26,11 %
(536,5)				

Ensaio segundo Kiliani positivo para os açúcares.

Reacção de Kedde positiva. O espectro de ultravioleta mostra um máximo no álcool

$$\lambda_{\text{max}} = 217 \text{ m}\mu \quad E_{1\%}^{1\text{cm}} = 350$$

A substância deu, com ácido sulfúrico concentrado, as seguintes cores:

0 min. — incolor 1 min. — amarelo-pálido  
5 min. — amarelo-canário 10 min. — amarelo-canário  
30 min. — amarelo-canário 1 hora — quase incolor  
2 horas — incolor

3.3.1—*Hidrólise ácida*—105 mg de substância impurificada e amorfa dissolveram-se em 2 ml de mis-

tura de Kiliani e aqueceram-se durante uma hora a 100° em banho de óleo. A solução diluiu-se com 5 ml de água e concentrou-se no vácuo até cerca de 2 ml. Após repetição desta operação por duas vezes, a solução aquosa ácida extraiu-se 4 vezes com 5 ml de clorofórmio de cada vez. Os extractos de clorofórmio deram depois da lavagem com água (2 ml), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2 N (2 vezes 10 ml) e de novo água (4 vezes 10 ml) 21 mg de resíduo seco. Este resíduo, Kedde positivo, foi submetido a cromatografia sobre óxido de alumínio, mas nenhuma das fracções cristalizou.

A cromatografia sobre papel de cada uma das fracções mostrou a existência de várias manchas reveladas pelo reagente de Kedde (fig. 5).

A solução aquosa de hidrólise e a primeira da lavagem foram reunidas, concentradas no vácuo e neutralizadas com  $\text{Ag}_2\text{CO}_3$  preparado de fresco. Após precipitação do fraco excesso de  $\text{Ag}^+$  com  $\text{H}_2\text{S}$ , filtrou-se através de uma pequena quantidade de carvão adsorvente e evaporou-se o resíduo no vácuo. Este resíduo deu reacção positiva com o reagente de Partridge para os açúcares e foi cromatografado sobre papel no sistema  $\text{Bu}/\text{OH}_2$ , originando uma mancha de igual R.f. ao da glucose (fig. 6).

3.3.2 — *Substância C<sub>1</sub>* — A substância  $\text{C}_1$  deu apenas vestígios de cristais do Me-Et com reacção Kedde positiva e de ponto de fusão  $275\text{--}82^\circ\text{C}$ .

A substância deu as seguintes cores com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado

0 min. — amarelo-pálido      2 min. — amarelo-pálido  
5 min. — lilás                  10 min. — violeta          20 min. — azul  
30 min. — azul-claro

3.3.3 — *Hidrólise ácida da substância C<sub>1</sub>* — 56 mg de substância  $\text{C}_1$  amorfa e impura, mas originando uma única mancha em cromatografia sobre papel, foram submetidos a hidrólise ácida nas condições que já foram indicadas para a substância C.

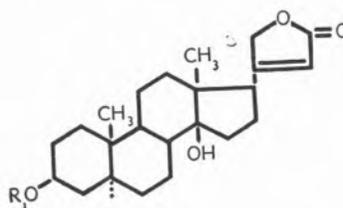
A solução aquosa foi purificada como já se indicou e deu em cromatografia sobre o papel uma mancha de R.f. igual ao da glucose (fig. 7).

#### 4 — PROPRIEDADES DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS — CARDENÓLIDOS

4.2 — SUBSTÂNCIA A — UZARIGENINA. A substância A isolou-se do extracto etéreo e do extracto clorofórmico. Mostrou, através do ponto de fusão, poder rotatório e análise elementar, ser idêntica à uzarigenina. As reacções coradas e R.f. em cromatografia no papel eram também idênticas a uma amostra genuína de uzarigenina. O derivado acetilado da substância A coincide no ponto de fusão, poder rotatório e R.f. na cromatografia em papel com a monoacetiluzarigenina.

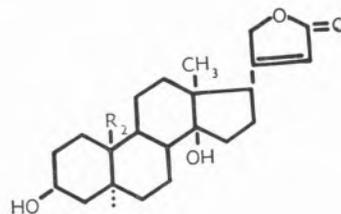
4.2 — SUBSTÂNCIA B — Esta substância obteve-se cromatograficamente pura, mas não se conseguiu cristalizar. Pelo seu comportamento em cromatografia de papel em diferentes sistemas, assim como o do derivado acetilado, parece tratar-se da coroglaucigenina, que se encontra frequentemente associada à uzarigenina nos extractos de plantas. O facto de não se obter a substância cristalizada deve ser devido à presença de substâncias Kedde (—), que dificultam a cristalização. É já bem conhecida a dificuldade na obtenção de cardenólidos cristalizados a partir dos extractos de folhas.

4.3 — SUBSTÂNCIA B<sub>1</sub> — Esta substância obteve-se cromatograficamente pura, mas não se conseguiu cristalizar. A sua identidade com a corotoxigenina, cuja



$\text{R}_1 = \text{H}$  Uzarigenina

$\text{R}_1 =$  Resto glucose — glucosido —  
— uzarina



$\text{R}_2 = \text{CH}_2\text{OH}$  coroglaucigenina

$\text{R}_2 = \text{CH}=\text{O}$  Corotoxigenina

existência seria de prever, foi excluída por comparação em cromatografia em papel com uma amostra pura deste composto.

Pelo comportamento manifestado perante a girarização, parece ser de excluir a existência de grupo aldeído.

4.4 — SUBSTÂNCIA C — A análise elementar deste glicósido está de acordo com a fórmula  $\text{C}_{29}\text{H}_{44}\text{O}_8$ , o que mostra tratar-se de um monoglicósido. A absorção

no U.V. possui um máximo a  $217 \text{ m}\mu$   $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 350$ , o que também concorda com a massa molecular de um monoglicósido considerado  $\log \epsilon = 4,17$ .

O espectro de U.V. exclui a presença de duplas ligações e grupos carbonilo além dos existentes no anel butenolídico.

O espectro de I.R. apresenta as 3 bandas características dos butenólidos a  $5,6 \mu$ ,  $5,75$  a  $5,78 \mu$  e  $6,15$  a  $6,20 \mu$ , assim como uma banda larga a  $3 \mu$ , devida à existência de grupos OH associados (fig. 9).

A hidrólise deste glicósido originou uma mistura de anidro-geninas, não podendo nenhuma delas identificar-se em cromatografia de papel com a  $\beta$ -anidrozuzarigenina (fig. 7). O açúcar obtido pela hidrólise possui um R.f. idêntico ao da glucose, o que é um

por acção do ácido sulfúrico sobre os glicósidos são muito dissemelhantes. A quantidade diminuta de substância isolada não permitiu mais que a determinação do ponto de fusão, comportamento cromatográfico e reacções coradas com  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

As figs. 1 a 8 representam exemplos dos cromatogramas esquematizados, mas conservando as distâncias relativas. Estes cromatogramas foram executados em papel Whatman n.º 1 impregnado com misturas de formamida e acetona (1:3) (figs. 1, 4, 5 e 6), água e acetona (1:3) (figs. 2, 6 e 8) e etilcelosolve e acetona (fig. 3).

A revelação dos cromatogramas fez-se para os butenólidos com o reagente de Kedde e para os açúcares com o reagente de Partridge (7).

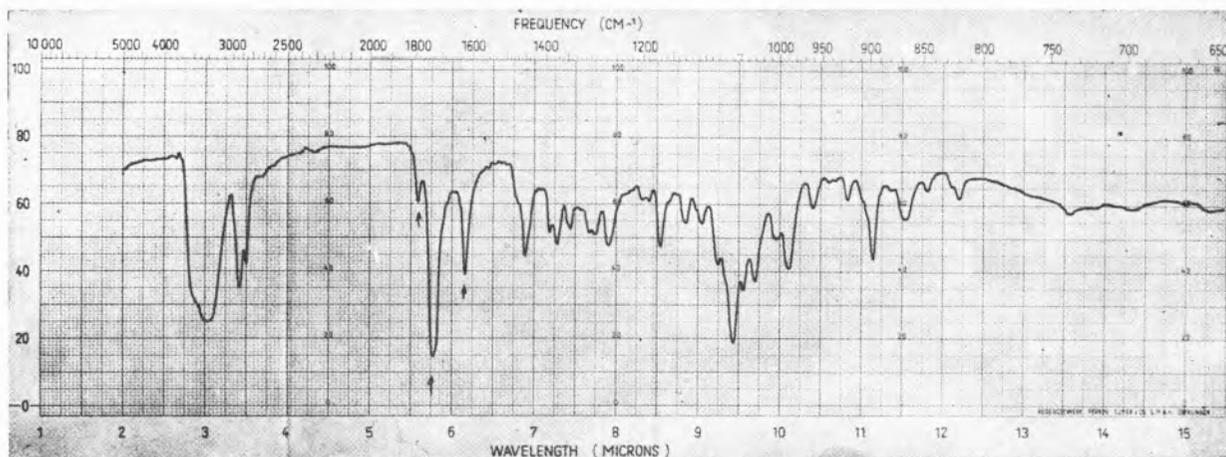


Fig. 9 — Espectro de absorção de I.V. da substância C (1 mg de sólido em cerca de 300 mg de KBr).

pouco surpreendente, pois um cardenólido cujo açúcar é a glucose deve ter no mínimo 9 átomos de oxigénio, a não ser que não possua grupo OH em  $\text{C}_{14}$ . A existência de uma hexametilose em vez de glucose é também de afastar, pois estes açúcares têm R.f. em cromatografia no papel muito diferentes do que se observa para a glucose. Pelo exame dos glicósidos já descritos, não pudemos encontrar nenhum cujas constantes físicas lhe correspondam. Parece, pois, tratar-se de substância ainda não referida na literatura.

4.5 — SUBSTÂNCIA  $\text{C}_1$  — A substância  $\text{C}_1$  isolou-se em quantidades vestigiais e mostrou, através de hidrólise ácida a cromatografia em papel, possuir açúcar de R.f. igual ao da glucose e ao açúcar da substância C. A genina de  $\text{C}_1$  deve ter uma estrutura bastante diferente da genina de C, pois as cores observadas

## 5 — RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela VII indica os rendimentos em extractos secos, assim como as reacções características dos cardenólidos (Kedde) e dos glicósidos (Kiliani) (8).

Tabela VII

Extracto	Rendimento		Kedde	Kiliani
	g	%		
Etéreo bruto	5,72	0,57	+	—
» purificado	1,73	0,17	+	—
» clorofórmio	4,53	0,45	+	(+)?
Clorofórmio-álcool 2:1	12,1	1,21	+	+
Clorofórmio-álcool 3:2	25,3	2,53	+	+

(1) Fracção metanólica da repartição entre metanol aquoso a 70% e éter de petróleo.

O extracto etéreo mostrou em cromatografia de papel, e depois de separação parcial por cromatografia de adsorção, «manchas» reveladas pelo reagente de Kedde que foram designadas pelas letras A, B<sub>1</sub>, B, C (D).

As manchas de A e B eram bem nítidas, mas as outras só puderam ser detectadas depois de enriquecimento parcial das substâncias correspondentes por cromatografia preparativa (1 em figs. 1, 4 e 8). O extracto etéreo solúvel no éter de petróleo que apresentava reacção Kedde (+) foi cromatografado sobre óxido de alumínio. No decurso desta operação isolou-se uma substância Kedde (-) designada por H. Da fracção solúvel no metanol obtiveram-se cristalizadas as substâncias A e C, que apresentaram reacção de Kedde positiva.

A substância A foi identificada com a uzarigenina (vd. 3.1) e a substância C (vd. 3.3) mostrou ser um glicósido de genina não identificada.

*Extracto clorofórmico* — Como resultado da cromatografia sobre alumina do extracto de clorofórmio (vd. 2.6), obtiveram-se apenas cristais de substância A já isolada do extracto etéreo. O material amorfo originou em cromatografia sobre papel (2 em figs. 4 e 8) as manchas de A, B<sub>1</sub>, B, C, C<sub>1</sub>, D, E.

*Extracto clorofórmio-álcool 2:1* — Um ensaio com takediástase (vd. 3.7) mostrou não haver fermentação apreciável das substâncias Kedde (+), pelo que se submeteu todo o extracto à cromatografia sobre Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: obteve-se apenas uma substância cristalizada Kedde (-) designada por G. Na fracção amorfa encontraram-se em cromatografia sobre o papel as mesmas substâncias já detectadas no extracto clorofórmico (A), (B), (B<sub>1</sub>) C, C<sub>1</sub>, D e E (3 em figs. 2 e 8).

*Extracto clorofórmio-álcool 3:2* — Este extracto (vd. 2.8) era muito fracamente Kedde (+) e mostrou por cromatografia em papel não possuir substâncias Kedde (+) diferentes do extracto clorofórmio-álcool 2:1. Por ensaio de microfermentação, não se verificou hidrólise fermentativa sensível das substâncias Kedde (+), e por isso este extracto não foi mais trabalhado. Com vista à separação dos compostos com função aldeído, procedeu-se à girardização do extracto clorofórmio-álcool 2:1 (vd. 2.7.2), mas não foi possível obter-se qualquer separação eficiente. Isolaram-se apenas vestígios da substância C<sub>1</sub> cristalizada. As

fracções amorfas foram submetidas à cromatografia de repartição sobre celite, o que permitiu obter-se novas porções cristalizadas da substância H e da substância C.

As fracções amorfas dos diferentes extractos etéreo, clorofórmio e clorofórmio-álcool 2:1 contendo principalmente B<sub>1</sub> e B foram cromatografadas preparativamente sobre o papel (vd. 2.7.3), mas não se conseguiu obter nenhuma destas substâncias cristalizadas.

As folhas de *Asclepias glaucophylla* mostraram ter uma composição em butenólidos e outros esteróides muito diferente da existente nas raízes (9).

Não se encontraram quaisquer substâncias do tipo da sarcostina, que tão abundantemente existem nas raízes, nem se observou identidade dos butenólidos. O asclepósido (uzarigenina-β-D-alometilósido), assim como a substância M, não existem nas folhas, mas, em contrapartida, isolaram-se duas substâncias com grupos butenolídicos C e C<sub>1</sub> que não se encontram nas raízes.

#### SUMMARY

*A mixture of cardenolides was isolated from the leaves of Asclepias glaucophylla and was partially broken up in its components through adsorption and distribution chromatography. In this mixture were identified: uzarigenine, very likely a coroglaucigenin, and a monoglucoside, whose sugar is glucose and whose physical characteristics find no correspondent in any of the previously described substances. Besides other cardenolides, two further substances were isolated, one scantily polar in nature, and the other a high polarity poly-hydroxilated compound.*

#### BIBLIOGRAFIA

1. Bally, P. R. O., Mohr, K. e Reichstein, T., *Helv. Chim. Acta*, **34**, 1740 (1951).
2. Kedde, D. L., *Pharm. Tijdschr. Belg.*, **169** (1947).
3. Paech, K. e Tracey, M. V., «Modern Methoden der Pflanzenanalyse», vol. 4, Springer-Verlag, Wien, 1955, p. 373.
4. Reichstein, T. e Shoppee, C. W., *Discussions Faraday Soc.*, **7**, 305 (1949).
5. Von Euw, J. e Reichstein, T., *Helv. Chim. Acta*, **31**, 883 (1948).
6. Girard, A. e Sandulesco, G., *Helv. Chim. Acta*, **19**, 1095 (1936).
7. Partridge, S. M., *Nature*, **158**, 270 (1946).
8. Kiliani, H., *Ber.*, **63**, 2866 (1936).
9. Nascimento, J. M. et al., *Helv. Chim. Acta*, **47**, 1775 (1964).