

Artigo

Desenvolvimento e Validação de um Método Sensível de CLAE-UV-DAD para Determinação de Diosgenina em Plantas de Espécies do Gênero *Dioscorea*

da Silva, L. R. G.; Cheibub, A. M. S. S.; Valverde, A. L.; Netto, A. D. P.*

Rev. Virtual Quim., 2019, 11 (4), 1302-1317. Data de publicação na Web: 19 de agosto de 2019

<http://rvq.sbq.org.br>

Development and Validation of Sensitive HPLC-UV-DAD Method for Determination of Diosgenin in Plants of Species of *Dioscorea* Genus

Abstract: Diosgenin is an important sapogenin used in the pharmaceutical industry as raw material for synthesizing steroidal hormones. In addition, the bioactivity of this metabolite has been evaluated in several molecular targets, making diosgenin promising as a new drug. In this study, a HPLC-UV-DAD method for determination of diosgenin was developed. The method was validated and considered suitable, because it showed good sensitivity and linearity in the concentration range of 0.25 a 10.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, the method showed good repeatability (CV% 1.0-3.3), good intermediate precision (CV% 0.9-3.7) and recovery values (93.1-97.7 %) close to 100 %. The good sensitivity of the method can also be verified by the limits of detection and quantification, which were respectively 3.0 e 8.0 mg of diosgenin per kg dry flour of sample, better than several methods previously cited in the literature that employed the same analytical technique. Samples *Dioscorea bulbifera* and *Dioscorea trifida* were evaluated by the proposed method, but, free diosgenin was not found in the conditions of analysis.

Keywords: Diosgenin; Dioscorea; sapogenin; HPLC; analytical method validation.

Resumo

Diosgenina é uma sapogenina importante usada na indústria farmacêutica como matéria-prima para síntese de hormônios esteroidais. Além disto, a bioatividade deste metabólito secundário tem sido avaliada em diversos alvos moleculares, tornando a diosgenina promissora como novo fármaco. Um método de CLAE-UV-DAD para determinação de diosgenina foi desenvolvido neste trabalho. O método foi validado e considerado adequado, demonstrando boa sensibilidade e linearidade no intervalo de concentração de 0,25 a 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, apresentou boa repetibilidade (CV% 1,0-3,3), boa precisão intermediária (CV% 0,9-3,7) e valores de recuperação (93,1-97,7 %) próximos a 100 %. A boa sensibilidade do método também pode ser verificada pelos limites de detecção e de quantificação, respectivamente 3,0 e 8,0 mg de diosgenina por kg de farinha seca de amostra, melhores do que outros reportados anteriormente na literatura que usaram a mesma técnica analítica. Amostras de *Dioscorea bulbifera* e *Dioscorea trifida* foram avaliadas pelo método proposto, entretanto, diosgenina não foi encontrada nas condições de análise.

Palavras-chave: Diosgenina; Dioscorea; sapogenina; CLAE; validação de método analítico.

* Universidade Federal Fluminense, Instituto de Química, Departamento de Química Analítica, Campus Valonguinho, CEP 24020-150, Niterói-RJ, Brasil.

✉ annibal@vm.uff.br

DOI: [10.21577/1984-6835.20190090](https://doi.org/10.21577/1984-6835.20190090)

Desenvolvimento e Validação de um Método Sensível de CLAE-UV-DAD para Determinação de Diosgenina em Plantas de Espécies do Gênero *Dioscorea*

Larissa Ramos Guimarães da Silva,^{a,b,c} Ana Maria de Souza Santos Cheibub,^{a,b} Alessandra Leda Valverde,^{a,c} Annibal Duarte Pereira Netto^{a,b,*}

^a Universidade Federal Fluminense, Instituto de Química, Programa de Pós-Graduação em Química, Outeiro de São João Batista s/n, campus do Valonguinho, Centro, CEP 24020-141, Niterói-RJ. Brasil

^b Universidade Federal Fluminense, Instituto de Química, Departamento de Química Analítica, Laboratório de Química Analítica Fundamental e Aplicada, Outeiro de São João Batista, s/n, campus do Valonguinho, Centro, CEP 24020-141, Niterói-RJ Brasil

^c Universidade Federal Fluminense, Instituto de Química, Departamento de Química Orgânica, Laboratório de Produtos Naturais, Outeiro de São João Batista, s/n, Valonguinho, Centro, Niterói-RJ, CEP 24020-141. Brasil.

* annibal@vm.uff.br

Recebido em 22 de fevereiro de 2019. Aceito para publicação em 25 de junho de 2019

1. Introdução

2. Materiais e Métodos

- 2.1. Padrão e solventes
- 2.2. Amostras
- 2.3. Processamento do material vegetal
- 2.4. Metodologia de extração de diosgenina
- 2.5. Método cromatográfico de CLAE-UV-DAD
- 2.6. Validação do método analítico

3. Resultados e Discussão

- 3.1. Desenvolvimento do método para determinação de diosgenina
- 3.2. Validação do método
- 3.3. Aplicação do método às amostras para avaliação do conteúdo de diosgenina livre

4. Conclusão

1. Introdução

Diosgenina (1) (Figura 1) é uma sapogenina esteroidal presente em espécies de plantas dos gêneros *Dioscorea*,^{1,2} *Costus*,³ *Trigonella*,⁴ *Agave*,⁵ *Smilax*⁶ e *Yucca*.^{7,8} Este metabólito

secundário é geralmente encontrado formando saponinas,^{9,10} porém, pode estar presente em forma livre.¹¹⁻¹³ A diosgenina é a principal matéria-prima utilizada para síntese de diversos hormônios esteroidais na indústria farmacêutica (Figura 1) e, a partir dela são sintetizados hormônios sexuais: testosterona (2), um hormônio masculino, e;

mestranol (3), estradiol (4) e progesterona (5), entre outros hormônios femininos, os quais são usados em terapias de reposição hormonal e contraceptivos.¹⁴ Além disso, é possível sintetizar também hidrocortisona (6), usada no tratamento de doenças inflamatórias¹⁵ e insuficiências adrenocorticais.¹⁶

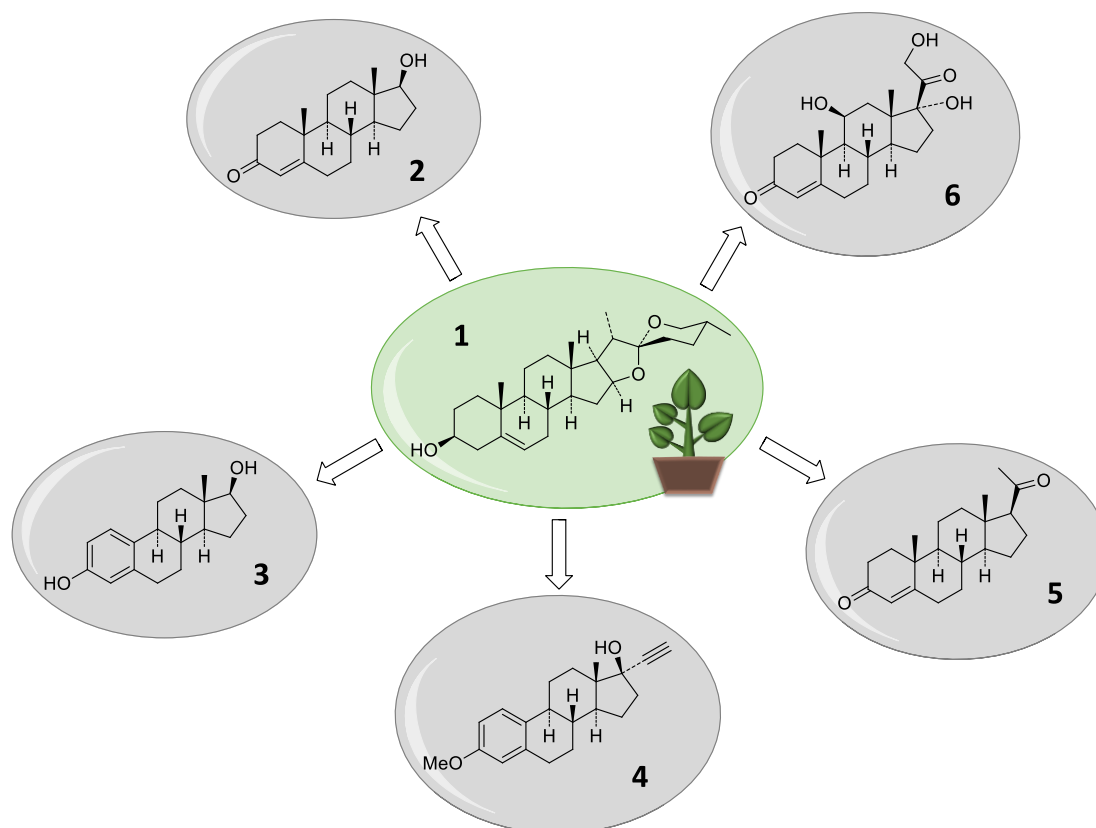


Figura 1. Diosgenina (1) como matéria-prima para síntese de testosterona (2), mestranol (3), estradiol (4), progesterona (5) e hidrocortisona (6)

Além da aplicação industrial, a diosgenina tem sido alvo de diversos estudos de atividade biológica, *in vitro* e *in vivo*, os quais têm demonstrado o potencial que esta substância e seus derivados têm na produção de novos fármacos.¹⁷ Os efeitos anticancerígenos, quimiopreventivos e antiproliferativos da diosgenina têm sido demonstrados em diversos estudos pré-clínicos em várias linhagens de células humanas cancerosas: câncer de próstata (células PC-3 e DU-145),¹⁸ câncer de mama (células MCF-7),¹⁹⁻²¹ câncer de cólon (células HCT-116 e HT-29),²² câncer

de estômago (células BGC-823),²³ câncer de pulmão (células A549),²⁴ entre outras. Ademais, outras atividades como anti-inflamatória,²⁵ antidislipidêmica,^{26,27} anti-infecciosa^{17,28} e neuroprotetora²⁹ já foram descritas.

Desde que a diosgenina foi isolada e se destacou por ser matéria-prima na produção de hormônios esteroidais importantes, muitas metodologias para sua determinação/quantificação foram desenvolvidas. As técnicas utilizadas nessas

metodologias incluem: métodos espectrofotométricos após reação com reagentes não específicos,³⁰⁻³⁵ os quais podem gerar resultados falso-positivos; cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE) com detecção densitométrica,^{36,37} que também utilizam reagentes não específicos para coloração das cromatoplasas e adição do grupo cromóforo aos analitos, e normalmente, não alcançam baixas concentrações como os métodos a seguir; cromatografia a gás acoplada (CG) ao detector de espectrometria de massas (EM),^{13,38,39} os quais possuem baixos limites de detecção e quantificação e são utilizados em amostras voláteis; cromatografia a líquido de alta (CLAE) ou ultra eficiência (CLUE), os quais apresentam maior versatilidade de aplicação com relação à matriz da amostra e aos detectores acoplados, sendo de radiação ultravioleta-visível (UV-Vis ou UV-DAD),⁴⁰⁻⁴² de espalhamento de luz evaporativa (ELSD)¹¹ e de espectrometria de massas (EM),⁴³ além disso, métodos com este tipo de técnica apresentam baixos limites de detecção.

Em virtude desses fatos e da crescente demanda por diosgenina, a busca por novas fontes se tornou pertinente. O objetivo do nosso estudo foi desenvolver, validar e aplicar um método de CLAE-UV-DAD para a determinação de diosgenina presente nos bulbos e folhas da *Dioscorea bulbifera* e tubérculos da *Dioscorea trifida*.

2. Materiais e Métodos

2.1. Padrão e solventes

Diosgenina (95 % de pureza) foi obtida da Sigma-Aldrich (EUA) e utilizada como padrão sem purificação adicional. Acetato de etila (VETEC, Brasil) e acetonitrila (J. T. Baker, EUA), ambos em grau HPLC foram usados. Água ultrapura (18,2 MΩ cm) obtida no sistema Sartorius (Arium Confort II, Brasil) foi utilizada para o preparo das soluções aquosas e da fase móvel.

2.2. Amostras

As amostras de bulbos e folhas de *D. bulbifera* e tubérculos de *D. trifida* foram coletadas e identificadas em parceria com o Dr. Ricardo Couto, biólogo da Secretaria do Meio Ambiente da Prefeitura da Cidade do Rio de Janeiro. Cabe destacar que este trabalho teve licença concedida em dezembro de 2013 pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN), cujo número do processo 010877/2013-4, indispensável para acesso ao patrimônio genético segundo a MP nº 2.186-16/2001.

2.3. Processamento do material vegetal

As amostras frescas foram transformadas em farinha para maior conservação, segundo metodologia descrita na literatura.^{10,40,44,45} Resumidamente, as amostras foram lavadas e fatiadas em processador industrial picador/fatiador PA 210 (CAF Máquinas, Brasil) a 2 mm de espessura, com exceção das folhas de *D. bulbifera* que foi mantida inteira para o restante do processo. Em seguida, todas as amostras foram transferidas para estufa ventilada a 60 °C por 24 h (FANEM SE 315, Brasil). Logo depois de secas, as amostras passaram pelo processo de moagem em moedor industrial (CAF Máquinas, Brasil) e a umidade residual da amostra pulverizada foi removida por aquecimento em estufa (SOLAB SL 102, Brasil) a 105 °C por duas horas. As farinhas foram armazenadas em dessecador contendo sílica gel.

2.4. Metodologia de extração de diosgenina

O procedimento de extração consistiu em maceração assistida por ultrassom (UNIQUE, Brasil) durante 2 h a partir de 1 g de farinha seca de amostra e 9,0 mL de acetato de etila. Em seguida, a mistura foi filtrada em sistema de filtração à vácuo (Manifold® para extração

em fase sólida, 20 posições, Agilent Technologies, EUA), com uma seringa descartável, um *plug* de algodão hidrófilo (Cramer, Brasil) e filtro de PTFE (diâmetro 0,45 µm, Sartorius, Alemanha). O sólido foi lavado duas vezes com 0,5 mL com acetato de etila. O volume do extrato foi completado a 10,0 mL com acetato de etila. Uma alíquota do extrato (100 µL) foi diluída para 1 mL com acetonitrila e analisada por CLAE-UV-DAD.

2.5. Método cromatográfico de CLAE-UV-DAD

Para determinação da diosgenina, um sistema de cromatografia a líquido de alta eficiência (1200 series, Agilent Technologies, EUA) dotado de bomba binária, injetor automático, forno de colunas e detector de UV-DAD, e controlado pelo software *Agilent ChemStation* (B.01.03) foi empregado. Os principais parâmetros cromatográficos avaliados foram: coluna [ACE 5 C18 (250 x 4,5 mm x 5 µm), ACE 3 C18 (100 x 2,1 mm x 3 µm), SUPELCO 5 C18 (100 x 2,1 mm x 5 µm), ZORBAX Eclipse Plus C18 (50 x 4,6 mm x 3,5 µm), ZORBAX Eclipse Plus C8 (100 x 4,6 mm x 1,8 µm) ZORBAX SB C18 (150 x 2,1 mm x 1,8 µm), ZORBAX Eclipse XDB C18 (100 x 4,6 mm x 1,8 µm)], fase móvel (proporções de acetonitrila e água), vazão e temperatura.

A separação cromatográfica otimizada foi realizada com a coluna de ZORBAX Eclipse XDB C18, eluição em modo isocrático com fase móvel composta de acetonitrila:água (90:10), na vazão 0,8 mL min⁻¹ e na temperatura da coluna de 35 °C. O volume de injeção de amostras e padrões foi 5 µL e detecção em 200 nm. As fases móveis utilizadas foram degaseificadas em banho de ultrassom por 30 min.

2.6. Validação do método analítico

A validação do método de analítico de determinação de diosgenina por CLAE-UV-DAD foi realizada de acordo com o guia "Orientação de validação de métodos analíticos DOQ-CGCRE-008, revisão 06, agosto de 2017" do INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, Brasil).⁴⁶

Para os ensaios de validação, três soluções estoque do padrão de diosgenina - com concentração aproximada de 1050 µg mL⁻¹ - foram preparadas em acetonitrila com auxílio de um agitador vórtex (QL 901, Biomixer, Brasil) e banho de ultrassom e armazenadas a 8 °C por uma semana. Estas soluções foram utilizadas para o preparo de curvas analíticas e de adição-padrão independentes.

3. Resultados e Discussão

3.1. Desenvolvimento do método para determinação de diosgenina

Para o desenvolvimento e otimização do método para determinação de diosgenina por CLAE-UV-DAD, diversas condições cromatográficas foram avaliadas a partir de análises de soluções de diosgenina e do extrato dos bulbos de *D. bulbifera*, obtido de acordo com o procedimento descrito no item 2.4. Deste modo, vários parâmetros foram avaliados: colunas cromatográficas de fase reversa (C8 e C18 com dimensões diferentes), composição (proporções de acetonitrila e água) e vazão da fase móvel e, temperatura do forno. A detecção foi realizada em 200 nm, em vez de 192 nm, que corresponde ao comprimento de onda de máxima absorção da diosgenina para reduzir o efeito de interferentes na determinação.

De acordo com os resultados obtidos, o cromatograma da fase C8 testada apresentou apenas um sinal cromatográfico referente ao padrão de diosgenina, enquanto as colunas de fase C18 e partículas menores (1,8 e 3 µm)

evidenciaram que o padrão comercial continha uma impureza, que segundo o rótulo do produto, era estimada em 5 % e não havia informações adicionais a respeito da natureza química. As condições otimizadas, descritas no item 2.5, geraram a máxima resolução

encontrada para diosgenina e sua impureza (~1,5) (Figura 2). Além disso, a coluna Zorbax Eclipse XDB-C18 de tamanho de partícula 1,8 μm demonstrou melhor desempenho na separação dos constituintes do extrato de bulbos de *D. bulbifera*.

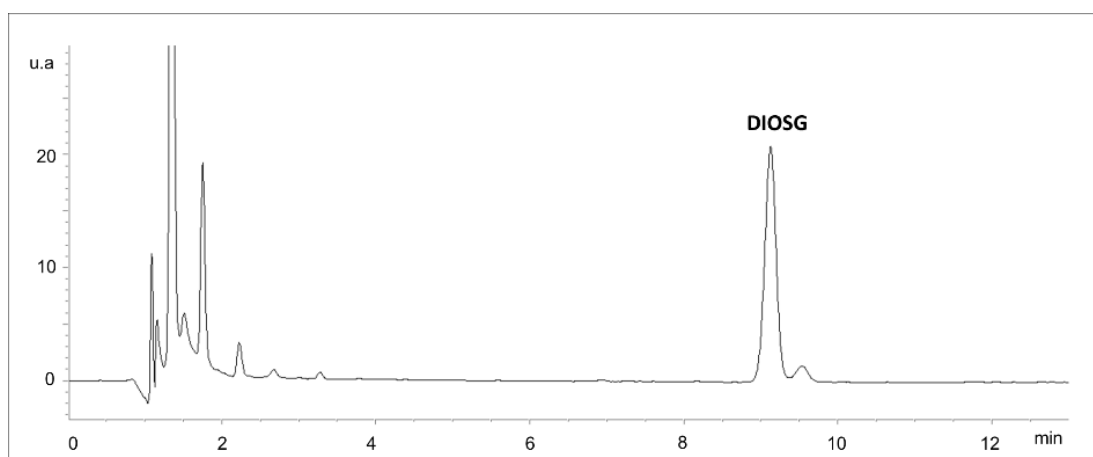


Figura 2. Cromatograma da condição otimizada para análise do padrão de diosgenina (DIOSG) por CLAE-UV-DAD

3.2. Validação do método

A validação do método de determinação de diosgenina considerou as principais figuras de mérito (seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão e robustez) necessárias para implementar um método quantitativo.

3.2.1. Avaliação de linearidade

A linearidade do método desenvolvido foi avaliada por meio da construção de três curvas analíticas independentes, preparadas em acetonitrila, na faixa de trabalho de 0,25 a 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A curva analítica geral foi obtida pelo método dos mínimos quadrados a partir dos dados para as três curvas. A curva representativa, descrita pela equação $y = 21,2224x - 0,0417$, na qual y é a área do sinal analítico e x é a concentração do analito em $\mu\text{g mL}^{-1}$, demonstrou boa adequação do modelo linear no intervalo de concentração

investigado, evidenciada pelo alto valor do coeficiente de correlação linear obtido ($r > 0,99$). A ausência de *outliers* foi verificada por teste de Grubbs e os resultados em todos os níveis de concentração tiveram coeficientes de variação (CV (%)) menor ou igual a 4,0 %.

A adequação do modelo linear também foi verificada por outros testes, aplicados considerando uma calibração de cinco níveis, com três repetições independentes por nível, e um intervalo de confiança de 95 %: o teste de Cochran atestou a homogeneidade das variâncias ($C_{\text{calculado}} = 0,6504 < C_{\text{crítico}} = 0,6838$); a distribuição dos resíduos foi considerada aleatória pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk

($W_{\text{calculado}} = 0,779 > W_{\text{tabelado}}(0,05; n=5) = 0,762$); a correlação dos dados foi avaliada pelo teste F de *Snedecor-Fisher*, ($F_{\text{calculado}} = 29627,361 > F_{\text{crítico}}(0,025; 1; 13) = 6,414$) e considerada estatisticamente válida. O teste de falta de ajuste e erro puro demonstrou que não havia falta de ajuste no modelo da regressão ($F_{\text{calculado}} = 2,958 < F_{\text{crítico}}(0,025; 3; 10) = 4,826$).

3.2.2. Limite de detecção, limite de quantificação e seletividade

Para estimativa dos limites de detecção e quantificação do método, o desvio padrão, obtido por meio de 7 análises consecutivas da solução padrão, correspondente ao menor ponto da curva analítica ($0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$), foi dividido pelo coeficiente angular da curva analítica. O limite de detecção (LD) foi estimado multiplicando-se o valor obtido por 3,3 e o limite de quantificação (LQ) foi estimado multiplicando-se este valor por 10. Os valores calculados de LD e LQ foram, respectivamente, $0,03 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $0,08 \mu\text{g mL}^{-1}$ que considerando-se o processamento da amostra, extração de 1 g de amostra com 10 mL e posterior diluição 1:10, correspondem a LD = 3 e LQ = 8 mg de diosgenina por kg de amostra seca.

Os valores de LD e LQ obtidos foram comparados com os limites de outros métodos para a determinação de diosgenina (Tabela 1). O método desenvolvido neste trabalho apresentou limites comparáveis ou inferiores aos de outros grupos de pesquisa que também utilizaram CLAE ou CLUE com detecção por UV-DAD,⁴⁷⁻⁵² além do método com detecção por espalhamento de luz evaporativa (ELSD)¹¹ ou da metodologia de quantificação por CCD de alta eficiência com detector de densitometria.^{47,48}

Contudo, os LD e LQ do método de Yi e colaboradores,⁴³ cuja técnica utilizada foi CLUE-EM, foram inferiores aos nossos, uma vez que o detector por espectrometria de massas possui maior sensibilidade do que um detector de UV-DAD,⁴³ principalmente no caso da diosgenina, que só apresenta uma ligação

C=C como grupo cromóforo. Apesar disso, o nível inferior de concentração da curva analítica desenvolvida neste trabalho foi mais baixo do que todas as metodologias apresentadas na Tabela 1, inclusive do método desenvolvido por CLUE-EM, demonstrando a alta sensibilidade do presente método.

A seletividade do método foi avaliada por meio da comparação dos cromatogramas obtidos a partir dos brancos de preparação de padrões e dos extratos dos bulbos de *D. bulbifera*. Nenhum sinal analítico proveniente de possíveis interferentes foi observado no tempo de eluição do padrão de diosgenina, indicando a boa seletividade do método desenvolvido.

3.2.3. Avaliação da precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e recuperação do método

A precisão de um método analítico pode ser avaliada através da dispersão de resultados entre ensaios independentes e repetidos, de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas e, é medida pelo coeficiente de variação (CV%).^{46,53} A precisão do método para determinação da diosgenina foi estimada pela avaliação da repetibilidade e da precisão intermediária em extratos obtidos em condições de recuperação. Os ensaios consistiram em adicionar alíquotas de concentração conhecida da solução de padrão à farinha seca dos bulbos de *D. bulbifera* e realizar extração de diosgenina livre com acetato de etila.

Tabela 1. Limites de detecção e quantificação de métodos da literatura de determinação de diosgenina

Técnica	Faixa de concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Comparação dos limites de detecção com o trabalho atual	Referência
CLUE-UV-DAD	0,25 a 10,0	0,03	0,08	-----	Este trabalho
CLUE-EM	1 a 500	3×10^{-4}	8×10^{-4}	100 vezes menor	43
CLAE-UV-DAD	2 a 1024	0,02	-	Comparável	49
CLAE-UV-DAD	1 a 60	0,33	1,00	11 vezes maior	50
CLAE-UV-DAD	2 a 10	0,520	1,577	17 vezes maior	51
CLAE-UV-DAD e CCDAE	2 a 10	0,7	2,0	23 vezes maior	47
CLAE-UV-DAD e CCDAE	6,25 a 10	3,72	11,27	124 vezes maior	48
CLUE-ELSD	15 a 550	7,0	15,0	233 vezes maior	11
CLAE-UV-DAD	50 a 1000	10	30	333 vezes maior	52

LD = limite de detecção; LQ = limite de quantificação; CLAE = cromatografia a líquido de alta eficiência; CLUE = cromatografia a líquido de ultra eficiência; CCDAE = cromatografia em camada delgada de alta eficiência; UV = detector de ultravioleta; DAD = detector de arranjo de diodos; ELSD = detector por espalhamento de luz evaporativa; EM = detector de espectrometria de massas

Para avaliação de repetibilidade foram feitos seis ensaios independentes em dois níveis de concentração (0,25 e 5,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Para avaliação da precisão intermediária, foram feitos 12 ensaios completamente independentes em intervalos muito curtos de tempo, nos mesmos dois níveis supracitados. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 2. Os coeficientes da avaliação de repetibilidade foram 3,3 % na menor concentração e da ordem de 1 % no nível mais alto. Resultados comparáveis foram obtidos na avaliação da precisão intermediária com CV (%) igual a 3,7 % no menor nível (0,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e valor da ordem de 0,92 % na concentração

de 5,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Tais valores de CV(%) evidenciaram a boa precisão do método, uma vez que estavam abaixo do critério aceitação estabelecido por *Association of Analytical Chemists*(AOAC),⁵⁴ 11,0 % para ambos os níveis

A exatidão do método foi avaliada por ensaios de recuperação, realizados em triplicatas independentes nos mesmos níveis de concentração (Tabela 2). A recuperação foi calculada a partir da razão entre a diferença das concentrações de diosgenina, antes e após a adição do padrão ao extrato, pela concentração adicionada do analito, os

valores foram expressos em %. Os valores de recuperação obtidos (93,1 a 97,7 %) estão de acordo com o critério de aceitação

estabelecido de 80 a 110 %⁵⁴ no intervalo de concentração.

Tabela 2. Estimativas da precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e da recuperação do método

	Repetibilidade (n=3)	Precisão intermediária (n =3)	Recuperação (n=3)
Concentração de diosgenina adicionada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CV (%)	CV (%)	Média \pm desvio padrão (%)
0,25	3,3	3,7	97,7 \pm 3,3
5,00	1,0	0,92	96,2 \pm 1,0

3.2.4. Avaliação da robustez do método

A robustez do método foi avaliada variando-se a composição da fase móvel (87,5:12,5; 90:10 e 92,5:7,5 v/v acetonitrila e água) e temperatura da coluna (30, 35 e 40 °C). Um dos extratos empregados na avaliação da recuperação foi analisado em triplicata em cada condição (Tabela 3). Mudanças no perfil cromatográfico ou interferências decorrentes das mudanças nos parâmetros, em especial a perda de resolução ou a sobreposição dos sinais provenientes da matriz e do analito, foram avaliadas também. A impureza

presente no padrão manteve boa resolução em relação à diosgenina (Figuras 3 e 4).

As diferentes condições de temperatura e composição de fase móvel estudadas (Tabela 3) resultaram em variações inferiores a 1,0 % e 1,5 %, respectivamente. A ausência de interferências cromatográficas e a pequena variação nas áreas obtidas nas condições estudadas indicam que o método desenvolvido apresenta boa robustez. Mesmo se for considerada a variação simultânea dos dois parâmetros (temperatura e composição da fase móvel) uma média geral de 572,2 \pm 6,8 com CV(%) igual a 1,2 % é obtida indicando a robustez das condições experimentais.

Tabela 3. Avaliação da influência de temperatura e composição da fase móvel na área do sinal analítico de diosgenina em um extrato de recuperação dos bulbos de *D. bulbifera*

Proporção acetoneitrila: água na fase móvel (%v/v)	Temperatura (°C)	Área média e desvio padrão do sinal cromatográfico	CV (%)	Tempo de retenção médio e desvio padrão (min)
90:10	30	568,4 ± 3,3	0,58	10,46 ± 0,04
90:10	35	562,4 ± 2,0	0,36	9,88 ± 0,06
90:10	40	573,8 ± 0,5	0,10	9,15 ± 0,01
Variação com a temperatura na separação		567,9 ± 4,9	0,87	9,83 ± 0,57
87,5:12,5	35	576,5 ± 1,1	0,19	11,17 ± 0,02
90:10	35	562,4 ± 2,0	0,36	9,88 ± 0,06
92,5:7,5	35	580,9 ± 1,9	0,33	8,58 ± 0,04
Variação com a composição da fase móvel		573,3 ± 8,5	1,48	9,88 ± 1,13

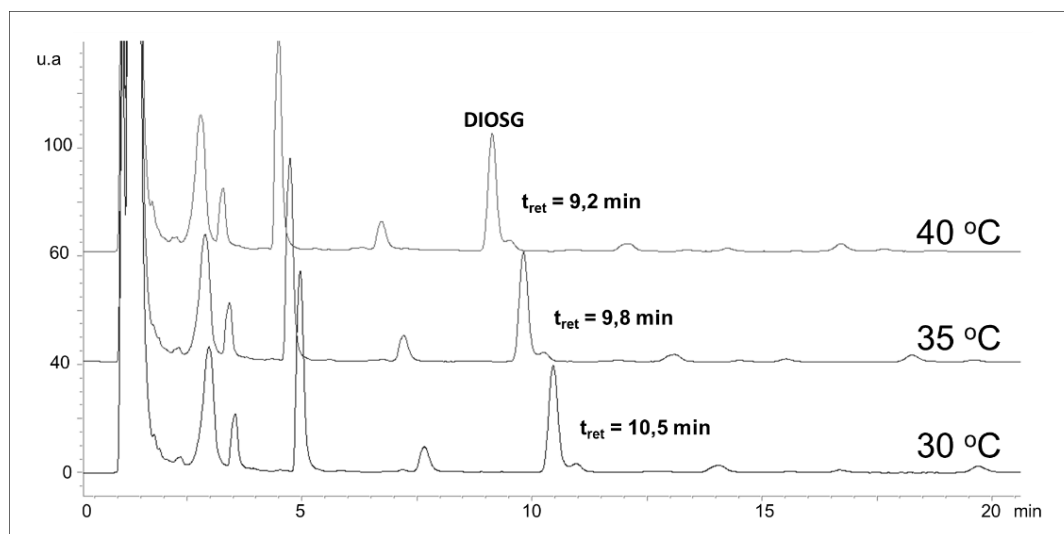


Figura 3. Comparação entre diferentes temperaturas na análise por CLAE-UV-DAD do extrato de recuperação de acetato de etila bulbos de *D. bulbifera*

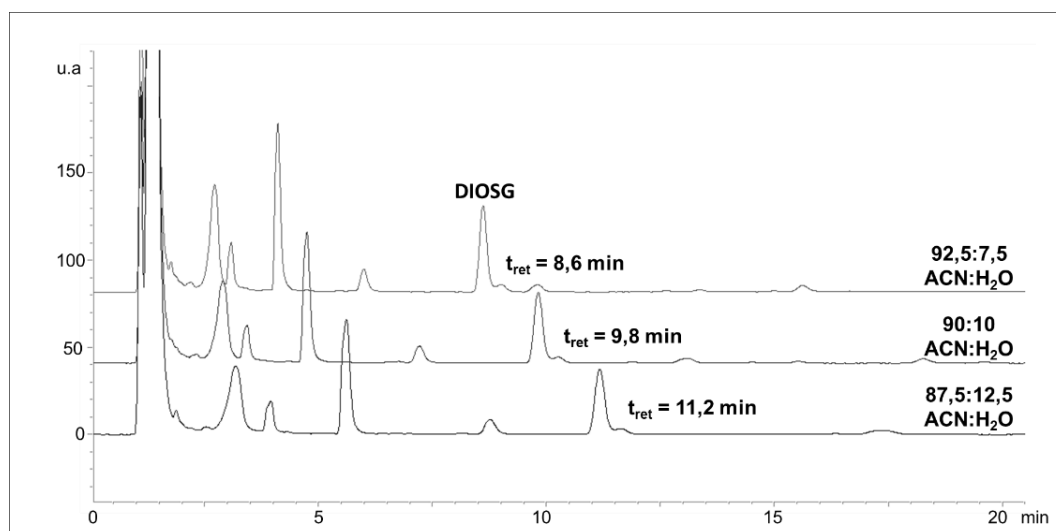


Figura 4. Comparação entre diferentes composições isocráticas de fase móvel na análise por CLAE-UV-DAD do extrato de recuperação de acetato de etila dos bulbos de *D. bulbifera*

Apesar da variação nos tempos de retenção, observada ao modificar algumas condições, pode-se verificar que não houve mudança expressiva no perfil cromatográfico. Nenhuma das condições estudadas resultou em coeluição ou perda de resolução significativa, que poderia comprometer a integração do sinal analítico da diosgenina, e assim, sua seletividade e sensibilidade.

3.3. Aplicação do método às amostras para avaliação do conteúdo de diosgenina livre

O método cromatográfico desenvolvido e validado para determinação de diosgenina foi utilizado para avaliar o conteúdo desta substância em *D. bulbifera* (folhas e bulbos) e *D. trifida* (tubérculos). Os extratos foram obtidos e analisados seguindo os procedimentos descritos nos itens 2.4 e 2.5.

Diosgenina na forma livre não foi encontrada em nenhuma das amostras estudadas, como pode ser observado pela ausência de sinal no tempo de retenção do analito, nos cromatogramas apresentados na Figura 5, mesmo quando as amostras foram analisadas sem diluição. Tais resultados estão de acordo com dados descritos na literatura, nos quais diosgenina livre também não foi

observada em bulbos e tubérculos de *D. bulbifera* e tubérculos de *D. trifida* cultivados em diferentes regiões dos Estados Unidos.¹¹ Entretanto, um teor de 3,0 % de diosgenina livre havia sido quantificado em tubérculos de *D. trifida* cultivada no Brasil,⁵⁵ e esta sapogenina já havia sido isolada dos bulbos de *D. bulbifera*.¹³ Com relação ao teor de diosgenina das folhas de *D. bulbifera*, nenhum estudo foi encontrado.

Como a diosgenina é um metabólito secundário, sua produção depende exclusivamente das necessidades específicas do organismo vegetal e de fatores como sazonalidade, nutrientes, disponibilidade hídrica, radiação UV,^{14,56} assim, as amostras utilizadas para este trabalho podem ter crescido em condições desfavoráveis para a produção do analito de interesse, resultando na ausência ou em um teor dessa sapogenina abaixo do limite de detecção do método. Além disto, esse metabólito também pode ser encontrado nas plantas sob a forma glicosilada de saponinas, sendo assim, para avaliação do conteúdo de diosgenina, seria necessária uma etapa de hidrólise do extrato para romper as ligações *O*-glicosídicas.⁵⁷ A avaliação de condições de hidrólise e diosgenina em outras plantas deste gênero e em gêneros correlatos será realizada em outras etapas de trabalho.

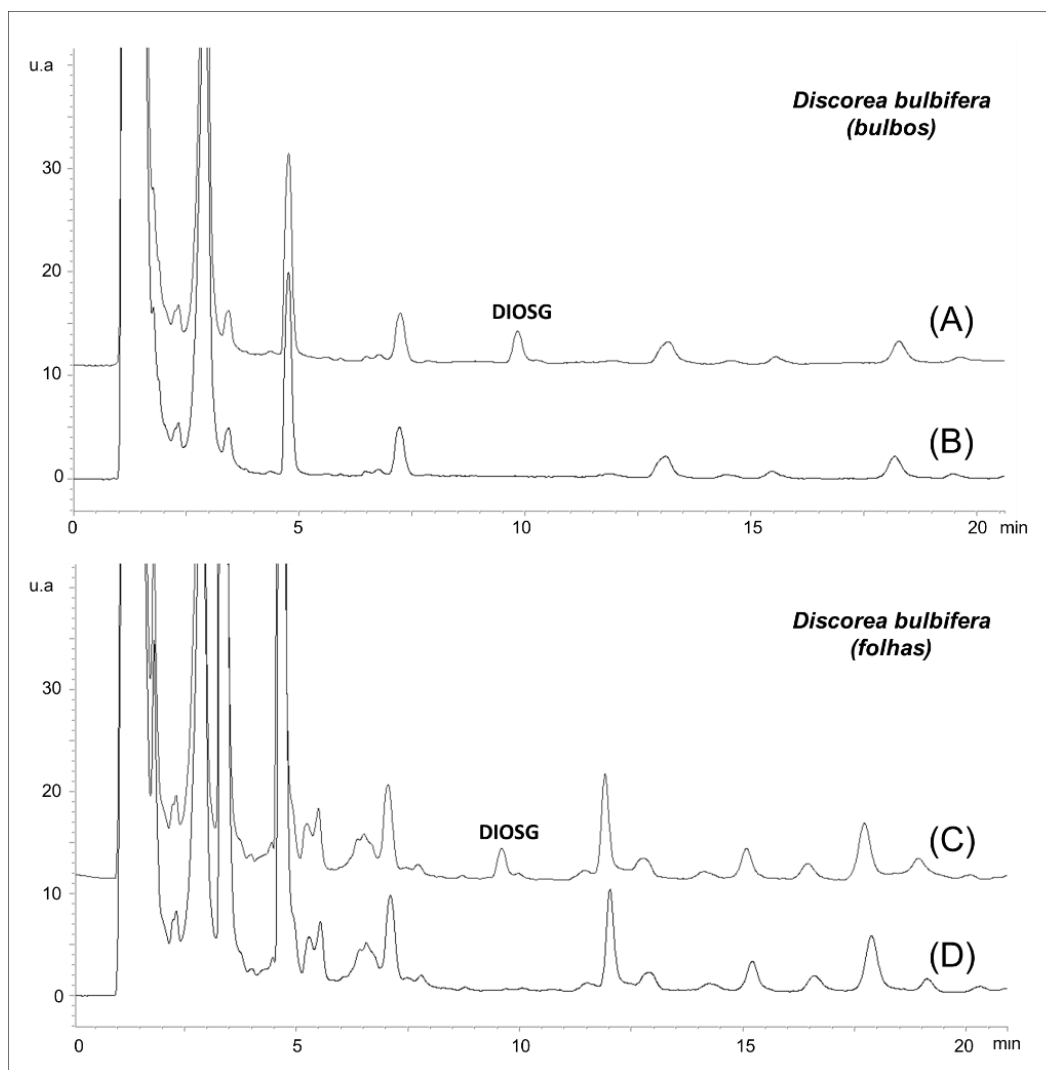


Figura 5. Cromatogramas de análise por CLAE-UV-DAD das amostras de *Dioscorea bulbifera*. (A) extrato fortificado com padrão de diosgenina ($1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$) dos bulbos; (B) extrato dos bulbos; (C) extrato fortificado com padrão de diosgenina ($1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$) das folhas e; (D) extrato das folhas

4. Conclusão

Um método de CLAE-UV-DAD para determinação da diosgenina em espécies de *Dioscorea* foi desenvolvido, otimizado e validado. Os parâmetros analíticos de validação demonstraram que o método apresentou boa linearidade, precisão, exatidão e robustez. O limite inferior da faixa linear de concentração, o LD e o LQ do método proposto foram menores que diversos métodos na literatura que utilizaram a técnica de CLAE-UV-DAD, demonstrando a alta

sensibilidade do método. Uma metodologia de extração da diosgenina rápida e eficiente por maceração assistida por ultrassom e acetato de etila também foi desenvolvida. Apesar dos altos valores de recuperação e da sensibilidade do método, em nenhuma das amostras analisadas foi encontrada diosgenina nas condições de análise, fato que está de acordo com alguns autores da literatura. A avaliação de condições de hidrólise e diosgenina em outras plantas deste gênero e em gêneros correlatos será realizada em outras etapas de trabalho.

Agradecimentos

Aos órgãos de fomento pelas bolsas e auxílios concedidos, Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001 e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). À Dra. Odara Boscolo do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal Fluminense (UFF) e ao MSc. Antônio Sergio Aymoré Martins da Faculdade de Farmácia da UFF por fornecerem as amostras.

Referências Bibliográficas

- ¹ Tsukamoto, T.; Ueno, Y. Glucosides of *Dioscorea tokoro* Makino. I. Dioscin, dioscoreasapotoxin and diosgenin. *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan* **1936**, *56*, 802.
- ² Marker, R. E.; Turner, D. L.; Ulshafe, P. R. Sterols CIV. Diosgenin from Certain American Plants. *Journal of the American Chemical Society* **1940**, *62*, 2542. [[CrossRef](#)]
- ³ Dasgupta, B.; Pandey, V. B. A New Indian Source of Diosgenin (*Costus speciosus*). *Experientia* **1970**, *26*, 475. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴ Marker, R. E.; Wagner, R. B.; Ulshafe, P. R.; Wittbecker, E. L.; Goldsmith, D. P. J.; Ruof, C. H. Sterols. CLVII. Sapogenins. LXM. I. Isolation and Structures of Thirteen New Sources for Known Steroidal Sapogenins. *Journal of the American Chemical Society* **1943**, *65*, 1199. [[CrossRef](#)]
- ⁵ Blunden, G.; Yi, Y.; Jewers, K. Steroidal sapogenins from leaves of *Agaveae* species. *Phytochemistry* **1978**, *17*, 1923. [[CrossRef](#)]
- ⁶ Iskenderov, G. B. Steroid sapogenins of *Smilax excelsa*. *Khimiya Prirodnykh Soedinenii* **1970**, *6*, 633.
- ⁷ Panouse, J. J.; Mamlok, L. Sterol sapogenins from the stem and leaves (fresh and fermented) of *Yucca guatamalensis*. *Annales Pharmaceutiques Francaises* **1963**, *21*, 735.
- ⁸ Blunden, G.; Hardman, R. Steroidal constituents from *Yucca glauca*. *Phytochemistry* **1969**, *8*, 1523. [[CrossRef](#)]
- ⁹ Taylor, W. G.; Elder, J. L.; Chang, P. R.; Richards, K. W. Microdetermination of Diosgenin from Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) Seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2000**, *48*, 5206. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁰ Contreras-Pacheco, M. De L.; Santacruz-Ruvalcaba, F.; Garcia-Fajardo, J. A.; Sánchez, J. de J.; Ruíz, M. A.; Estarrón-Espinosa, M.; Castro-Castro, A. Diosgenin quantification, characterization and chemical composition in a tuber collection of *Dioscorea* spp. in the state of Jalisco, Mexico. *International Journal of Food Science and Technology* **2013**, *48*, 2111. [[CrossRef](#)]
- ¹¹ Avula, B.; Wang, Y.-H.; Ali, Z.; Smillie, T. J.; Khan, I. A. Chemical fingerprint analysis and quantitative determination of steroidal compounds from *Dioscorea villosa*, *Dioscorea* species and dietary supplements using UHPLC-ELSD. *Biomedical Chromatography* **2014**, *28*, 281. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹² Avula, B.; Wang, Y.-H.; Wang, M.; Ali, Z.; Troy, J. S.; Zweigenbaum, J.; Khan, I. A. Characterization of Steroidal Saponins from *Dioscorea villosa* and *D. cayenensis* Using Ultrahigh Performance Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Planta Medica* **2014**, *80*, 321. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹³ Ghosh, S.; More, P.; Derle, A.; Patil, A. B.; Markad, P.; Asok, A.; Kumbhar, N.; Shaikh, M. L.; Ramanamurthy, B.; Shinde, V. S.; Dhavale, D. D.; Chopade, B. A. Diosgenin from *Dioscorea bulbifera*: Novel Hit for Treatment of Type II Diabetes Mellitus with Inhibitory Activity against α -Amylase and α -Glucosidase. *PLoS ONE* **2014**, *9*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

- ¹⁴ Dewick, P. M. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. 3a. ed. Wiley: United Kingdom, 2009.
- ¹⁵ Heming, N.; Lamothe, L.; Ambrosi, X.; Annane, D. Emerging drugs for the treatment of sepsis. *Expert Opinion on Emerging Drugs* **2016**, *21*, 27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁶ Johannsson, G.; Falorni, A.; Skrtic, S.; et al. Adrenal insufficiency: review of clinical outcomes with current glucocorticoid replacement therapy. *Clinical Endocrinology* **2015**, *82*, 2. [[CrossRef](#)]
- ¹⁷ Jesus, M.; Martins, A. P. J.; Gallardo, E.; Silvestre, S. Diosgenin: Recent Highlights on Pharmacology and Analytical Methodology. *Journal of Analytical Methods in Chemistry* **2016**, *2016*, 1. [[CrossRef](#)]
- ¹⁸ Chen, P.-S.; Shih, Y.-W.; Huang, H.-C.; Cheng, H.-W. Diosgenin, A Steroidal Saponin, Inhibits Migration And Invasion Of human prostate cancer pc-3 cells by reducing matrix metalloproteinases expression. *PLoS ONE* **2011**, *6*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁹ Ghosh, S.; More, P.; Derle, A.; Kitture, R.; Kale, T.; Gorain, M.; Avasthi, A.; Markad P.; Kundu, G. C.; Kale, S.; Dhavale, D. D.; Bellare, J.; Chopade, B. A. Diosgenin functionalized iron oxide nanoparticles as novel nanomaterial against breast cancer. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **2015**, *15*, 9464.
- ²⁰ Li, J.; Liu, X.; Guo, M.; Liu, Y.; Liu, S.; Yao, S. Electrochemical Study of Breast Cancer Cells MCF-7 and Its Application in Evaluating the Effect of Diosgenin. *Analytical Sciences* **2005**, *21*, 561. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²¹ Selim, S.; Jaouni, A. L. S. Anticancer and apoptotic effects on cell proliferation of diosgenin isolated from *Costus speciosus* (Koen.) Sm. *BMC Complementary and Alternative Medicine* **2015**, *15*, 301. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²² Lepage, C.; L'Eger, D. Y.; Bertrand, J.; Martin, F.; Beneytout, J.L.; Liagre, B. Diosgenin induces death receptor-5 through activation of p38 pathway and promotes TRAIL-induced apoptosis in colon cancer cells. *Cancer Letters* **2011**, *301*, 193. [[CrossRef](#)]
- ²³ Mao, Z.-J.; Tang, Q.-J.; Zhang, C.-A. Qin, Z.-F.; Pang, B.; Wei, P.-K.; Liu, B.; Chou, Y.-N. Anti-proliferation and anti-invasion effects of diosgenin on gastric cancer BGC-823 cells with HIF-1 α shRNAs. *International Journal of Molecular Sciences* **2012**, *13*, 6521. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁴ Mohammad, R. Y.; Somayyeh, G.; Gholamreza; H.; Majid, M.; Yousef, R. Diosgenin inhibits hTERT gene expression in the A549 lung cancer cell line. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* **2013**, *14*, 6945. [[CrossRef](#)]
- ²⁵ Jung, D.-H.; Park, H.-J.; Byun, H.-E.; Park, Y.-M.; Kim, T. -W.; Kim, B.-O.; Um, S.-H.; Pyo, S. Diosgenin inhibits macrophage-derived inflammatory mediators through downregulation of CK2, JNK, NF- κ B and AP-1 activation. *International Immunopharmacology* **2010**, *10*, 1047. [[CrossRef](#)] [[Link](#)]
- ²⁶ Harijono, T. E.; Ariestingsih, A. D.; Wardani, N. A. K. The effect of crude diosgenin extract from purple and yellow greater yams (*Dioscorea alata*) on the lipid profile of dyslipidemia rats. *Emirates Journal of Food and Agriculture* **2016**, *28*, 506. [[CrossRef](#)]
- ²⁷ Son, I. S.; Kim, J. H.; Sohn, H. Y.; Son, K. H.; Kim, J.-S.; Kwon, C.-S. Antioxidative and hypolipidemic effects of diosgenin, a steroidal saponin of yam (*Dioscorea* spp.), on high-cholesterol fed rats. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **2007**, *71*, 3063. [[CrossRef](#)]
- ²⁸ Khan, H.; Saeed, M.; Rauf, A.; Khan, M.A.; Muhammad, N. Antimicrobial and inhibition on heat-induced protein denaturation of constituents isolated from *Polygonatum verticillatum* rhizomes. *Natural Product Research* **2015**, *29*, 2160. [[CrossRef](#)]
- ²⁹ Tohda, C.; Lee, Y.-A.; Goto, Y.; Nemere, I. Diosgenin induced cognitive enhancement in normal mice is mediated by 1,25D3-MARRS. *Scientific Reports* **2013**, *3*, 3395. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

- ³⁰ Mu-Zou, W.; Tung-Whei, C. Determination of diosgenin in plants. *Acta Pharmaceutica Sinica* **1964**, *11*, 235. [[Link](#)]
- ³¹ Sanchez, G. L.; Acevedo, J. C. M.; Soto, R. R. Spectrophotometric Determination of Diosgenin in *Dioscorea composita* Following Thin-layer. Chromatography *Analyst* **1972**, *97*, 973. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³² Baccou, J. C.; Lambert, F.; Sauvaire, Y. Spectrophotometric Method for the Determination of Total Steroidal Sapogenin. *Analyst* **1977**, *102*, 458. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³³ Chapagain, Bishnu; Wiesman, Zeev. Variation in diosgenin level in seed kernels among different provenances of *Balanites aegyptiaca* Del (Zygophyllaceae) and its correlation with oil content. *African Journal of Biotechnology* **2005**, *4*, 1209. [[Link](#)]
- ³⁴ Saxena, Rohit; Rathore, S. S.; Barnwal, P.; Soni, A.; Sharma, L.; Saxena, S. N. Effect of cryogenic grinding on recovery of diosgenin content in fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) genotypes. *International Journal Seed Spices* **2013**, *3*, 26. [[Link](#)]
- ³⁵ Jing-Tong, T.; Gao, X.; Xue, J.-P.; Li, Z.-W.; Zhang, A.-M.; Sheng, W. Determination of the Diosgenin Content of *Dioscorea opposita* Thunb. Tubers and Bulbils. *Medicinal Plant* **2012**, *3*, 89. [[Link](#)]
- ³⁶ Ghosh, V. K.; Bhope, S. G.; Kuber, V. V.; Sagulale, A. D. An Improved Method For The Extraction And Quantitation Of Diosgenin In *Tribulus terrestris* L. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **2012**, *35*, 1141. [[CrossRef](#)]
- ³⁷ Pazhanichamy, K.; Bhuvaneshwari, K.; Kunthavai, B.; Eevera, T.; Rajendran, K. Isolation, Characterization and Quantification of Diosgenin from *Costus igneus*. *Journal of Planar Chromatography* **2012**, *25*, 566. [[CrossRef](#)]
- ³⁸ Cooke, B. K. Determination of Diosgenin in *Dioscorea deltoidea* and *Dioscorea sylvatica* by Using Gas-Liquid Chromatography. *Analyst* **1970**, *95*, 95. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁹ Rozanski, A. A Simplified Method of Extraction of Diosgenin from *Dioscorea* Tubers and its Determination by Gas-Liquid Chromatography. *Analyst* **1972**, *97*, 968. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁰ Niño, J.; Jiménez, D. A.; Mosquera, O. M.; Correa, Y. M. Diosgenin Quantification by CLAE in a *Dioscorea polygonoides* Tuber Collection from Colombian Flora. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2007**, *18*, 1073. [[CrossRef](#)]
- ⁴¹ Ortuño, A.; Oncina, R.; Botia, J. M.; Del Rio, J.A. Distribution and changes of diosgenin during development of *Trigonella foenum-graecum* plants. Modulation by benzylaminopurine. *Food Chemistry* **1988**, *63*, 51. [[CrossRef](#)]
- ⁴² Oncina, R.; Botia, J. M.; Del Rio, J. A.; Ortuño, A. Bioproduction of diosgenin in callus cultures of *Trigonella foenum-graecum* L. *Food Chemistry* **2000**, *70*, 489. [[CrossRef](#)]
- ⁴³ Yi, T.; Fan, L.-L.; Chen, H.-L.; Zhu, G.-Y.; Suen, H.-M.; Tang, Y.-N.; Zhu, L.; Chu, C.; Zhao, Z.-Z.; Chen, H.-B. Comparative analysis of diosgenin in *Dioscorea* species and related medicinal plants by UPLC-DAD-MS. *BMC Biochemistry* **2014**, *15*, 19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁴ Bhandari, M. R.; Kasai, T.; Kawabata, J. Nutritional evaluation of wild yam (*Dioscorea* spp.) tubers of Nepal. *Food Chemistry* **2003**, *82*, 619. [[CrossRef](#)]
- ⁴⁵ Bhandari, M. R.; Kawabata, J. Assessment of antinutritional factors and bioavailability of calcium and zinc in wild yam (*Dioscorea* spp.) tubers of Nepal. *Food Chemistry* **2004**, *85*, 281. [[CrossRef](#)]
- ⁴⁶ INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. *Orientação sobre validação de métodos analíticos*. DOQ-CGCRE-008, Revisão 05 – Agosto/2016. [[Link](#)]
- ⁴⁷ Jayaprakasam, R.; Ravit, K.; Kuriakose, A.; Asha, J. B. Quantitative determination of diosgenin in polyherbal formulation and various extracts of *Smilax china* Linn using standard marker by validated analytical techniques. *Universal Journal of Pharmacy* **2013**, *2*, 83. [[Link](#)]
- ⁴⁸ Li, P.; Mou, Y.; Lu, S.; Sun, W.; Lou, J.; Yin, C.; Zhou, L. Quantitative determination of

- diosgenin in *Dioscorea zingiberensis* cell cultures by microplate spectrophotometry and high-performance liquid chromatography. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2012**, *6*, 1186. [[Link](#)]
- ⁴⁹ Yang, H.; Chen, B.; Wang, X.-B.; Chue, P.-W.; Shen, Y.-P.; Xia, G.-H.; Jia, X.-B. Rapid quantitative analysis of diosgenin in the tubers of *Dioscorea zingiberensis* C.H. Wright by coupling cellulose enzymolysis and two-phase acid hydrolysis in tandem with HPLC-UV. *Natural Product Research* **2013**, *27*, 1933. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁰ Desai, S.; Tatke, P.; Gabhe, S. Y. Quantification of diosgenin in extracts and formulations containing *Solanum nigrum*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* **2015**, *6*, 676. [[CrossRef](#)] [[Link](#)]
- ⁵¹ Warke, V. B.; Deshmukh, T. A.; Patil, V. R. Development and validation of RP-HPLC method for estimation of diosgenin in pharmaceutical dosage form. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* **2011**, *4*, 126. [[Link](#)]
- ⁵² Hwang, W.-T.; Kim, Y.-S.; Hong, C.-K.; Lee, J.; Park, D. Simple stability-indicating validated HPLC method for diosgenin in cosmeceutical formulations with long termostability application for light and heat. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **2011**, *3*, 466. [[Link](#)]
- ⁵³ Ribani, M.; Bottoli, C.B.G.; Collins, C.H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova* **2004**, *27*, 771. [[CrossRef](#)]
- ⁵⁴ AOAC International, Official methods of analysis of AOAC International, in Guidelines for Standard Method Performance Requirements (Appendix F). Gaithersburg: AOAC International, 2016. [[Link](#)]
- ⁵⁵ Mollica, J. Q.; Cara, D. C.; D'auriol, M.; Oliveira, V. B.; Cesar, I. C.; Brandão, M. G. L. Anti-inflammatory activity of American yam *Dioscorea trifida* L.f. in food allergy induced by ovalbumin in mice. *Journal of Functional Foods* **2013**, *5*, 1975. [[CrossRef](#)] [[Link](#)]
- ⁵⁶ Gobbo-Neto, L.; Lopes, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova* **2007**, *30*, 347. [[CrossRef](#)]
- ⁵⁷ Athayde, M. L.; Taketa, A. C.; Gosmann, G.; Schenkel, E. P. Em *FARMACOGNOSIA: do produto natural ao medicamento*; Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R. Artmed: Porto Alegre, 2017, cap. 19.