

EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO DE DIOSGENINA DE BARBASCO (1)

MARCO ANTONIO TEIXEIRA ZULLO (2, 5), MARIA TEREZA BARALDI RAMOS (2),
DOMINGOS ANTONIO MONTEIRO (3) e GENTIL GODOY JR. (4)

RESUMO

Dioscorea composita Hemsl. e *D. floribunda* Mart. & Gal., introduzidas no Brasil, mostraram teores de diosgenina de $3,15 \pm 1,41\%$ e $4,72 \pm 0,24\%$ na matéria seca dos tubérculos, com pureza mínima de 54,7 e 39,2% respectivamente. Iamogenina também ocorre nos tubérculos de ambas as espécies. O teor de diosgenina em *D. composita* é crescente com a idade da planta, mostrando um máximo pronunciado em torno do terceiro ano de cultivo e estabilizando-se ao redor do sexto ano.

Termos de indexação: barbasco, *Dioscorea composita* Hemsl., *Dioscorea floribunda* Mart. & Gal., *Dioscoriaceae*, diosgenina, iamogenina.

1. INTRODUÇÃO

Diosgenina (25R-espirost-5-en-3 β -ol) é uma sapogenina esteróidica isolada, inicialmente, de *Dioscorea tokoro* Makino (TSUKAMOTO & UENO, 1936) e, posteriormente, de numerosas dioscoriáceas mexicanas (MARKER et al.,

(1) Recebido para publicação em 26 de novembro de 1985.

(2) Seção de Fitoquímica, Instituto Agronômico (IAC), Caixa Postal 28, 13001 Campinas (SP).

(3) Seção de Raízes e Tubérculos, IAC.

(4) Estação Experimental de Ubatuba, IAC.

(5) Com bolsa de pesquisa do CNPq.

1943). Com o desenvolvimento de métodos para sua transformação em progesterona (MARKER et al., 1940; MARKER, 1947), tornou-se uma das matérias-primas de importância para o desenvolvimento da moderna indústria esteróidica (FIESER & FIESER, 1959). A introdução de *D. composita* Hemsl. e *D. floribunda* Mart. & Gal., na Seção de Raízes e Tubérculos do Instituto Agrônomo, realizou-se pela inexistência, no Brasil, de dioscoriácea que permitisse a obtenção, economicamente viável, de diosgenina. Este trabalho caracteriza os teores desta sapogenina no material introduzido no País e relata um método para sua extração e purificação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal: Sementes de *D. composita* e *D. floribunda*, originárias do México, registradas no Serviço de Introdução de Plantas do IAC sob os nºs 41.455 e 41.456, foram semeadas em caixa coletiva em fevereiro de 1968, na Seção de Raízes e Tubérculos, e transplantadas para vasos individuais em abril. Em setembro, 31 plantas de *D. composita* foram transferidas para a Estação Experimental de Ubatuba: sob reprodução e seleção, forneceram outras 210, que foram plantadas na Estação Experimental de Pariqueira-Açu em agosto de 1974.

Extração e isolamento de diosgenina: Tubérculos de barbasco foram fatiados, secos a 60°C até peso constante e pulverizados em moinho tipo Wiley. Cada 100 g de matéria seca foram refluxados por cinco horas com 500 ml de ácido clorídrico 1,92N. Após resfriamento à temperatura ambiente, a mistura de hidrólise foi filtrada a vácuo em funil de Buchner e lavada com cerca de 1.500 ml de água. O resíduo de hidrólise foi seco em estufa a 65°C até peso constante e extraído em soxhlet com 150 ml de hexano durante oito horas. A solução hexânica foi concentrada em evaporador rotatório e seca em estufa a 105°C até peso constante. A diosgenina bruta obtida foi isolada por recristalização em acetona e lavagem com hexano. Concentração das águas-mãe acetônica e hexânica combinadas e recristalização em metanol forneceram uma segunda coleta de diosgenina.

Alternativamente, foi utilizado o método de MORRIS et al. (1956) para a extração e isolamento de diosgenina de tubérculos frescos de barbasco.

Purificação de diosgenina: Amostra analiticamente pura de diosgenina foi obtida por cromatografia de adsorção em coluna, empregando-se, para cada grama de diosgenina isolada, 20 g de sílica (70-200 "mesh") e 2 g de carvão ativo (porção superior), eluindo-se com hexano (50 ml) e acetona (200 ml), seguindo recristalização em metanol do eluato acetônico concentrado.

Determinação da pureza da diosgenina bruta: A pureza de algumas amostras de diosgenina bruta, extraída aos 39 meses, foi determinada por cromatografia em fase gasosa pelo método de ROZANSKI (1972) e por espectrofotometria de ultravioleta. Ambas as análises foram realizadas pelos Laboratórios Lepetit.

Acetilação de diosgenina: Foi realizada pelo método de BRUCE & RALLS (1943), fornecendo o acetato de diosgenina.

Determinação dos pontos de fusão e rotação óptica: Os pontos de fusão foram determinados em capilares selados e as rotações ópticas, em clorofórmio, em concentrações de 10 mg/ml.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os teores de diosgenina em tubérculos de *D. composita*, cujo desenvolvimento no campo foi acompanhado, mostraram-se crescentes com a idade de cultivo, tendendo a um limite à medida que a cultura se tomou perene e apresentando um máximo pronunciado ao redor dos três anos de cultivo, como mostra a figura 1: esse máximo coincide com a época de floração mais vigorosa observada na espécie. Tais dados são qualitativamente semelhantes aos apresentados por CRUZADO et al. (1965) para o cultivo de *D. floribunda*. Embora se tenham observado teores de diosgenina de até cerca de 7% na matéria seca do tubérculo aos 39 meses de cultivo no campo, esse teor nessa época foi de $4,00 \pm 1,79\%$, enquanto em todo o período foi de $3,10 \pm 1,31\%$.

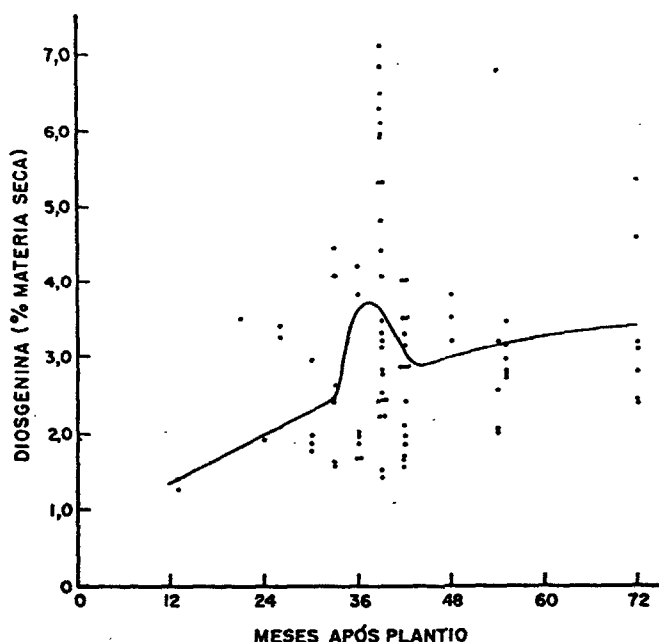


FIGURA 1. Variação dos teores de diosgenina na matéria seca dos tubérculos de *D. composita* Hemsf. em função da idade da planta.

Devido a *D. floribunda* apresentar um comportamento mais frágil no campo, seus teores de diosgenina não foram examinados ao longo do tempo. Tubérculos da espécie, com seis anos de cultivo, apresentaram $4,72 \pm 0,24\%$ de diosgenina.

Com base na verificação de que o teor de diosgenina nos tubérculos de *D. composita* era crescente com a idade do cultivo, tubérculos desta espécie aos 33 e 36 meses, de quatro clones, foram divididos em terços apical, mediano e basal, e cada porção analisada quanto à diosgenina (Quadro 1). A análise de variância mostrou que os teores de diosgenina são significativamente dependentes do clone, da posição amostrada e da idade do cultivo, bem como da interação entre clone e as outras variáveis.

QUADRO 1. Teores de diosgenina na matéria seca de tubérculos de *D. composita* em função da idade do cultivo, posição amostrada e clone

Idade do cultivo	Terço amostrado	Clone			
		PA-1	PA-4	PA-10	PA-13
Meses		diosgenina, %			
33	Apical	1,45	5,36	2,44	2,67
	Mediano	1,66	4,27	2,25	2,20
	Basal	1,64	2,56	2,55	2,90
36	Apical	2,17	4,43	1,97	1,49
	Mediano	1,56	4,69	2,06	1,41
	Basal	1,80	2,35	1,85	2,16

Analisando diversas dioscoriáceas mexicanas, MARKER et al. (1943) encontraram 0,3% de diosgenina na matéria seca do tubérculo de *D. composita*, e WALL et al. (1954), um mínimo de 1,2% e um máximo de 3,0%. SAUVAIRE & BACCOU (1978) encontraram 3,2% de diosgenina na matéria seca de *D. floribunda*. BARBOSA F^o et al. (1982, 1983) isolaram diosgenina, em rendimento não especificado, de *D. trisepta*, isolando β -sitosterol e nenhuma ou insignificante quantidade de diosgenina em sete outras dioscórias nativas no Nordeste brasileiro.

Para comparar o método de extração aqui descrito ao preconizado por MORRIS et al. (1956), um mesmo tubérculo de *D. composita* foi analisado por ambos os métodos. Pelo primeiro, o teor de diosgenina na matéria seca foi de $2,61 \pm 0,14\%$, em oito repetições, enquanto, pelo método de MORRIS et al.

(1956), verificou-se um teor de diosgenina de $1,97 \pm 0,21\%$ na matéria seca, em duas repetições. A extração mais efetiva aqui observada parece ser devida a uma melhor homogeneização do material pela pulverização da amostra: isso permite uma hidrólise mais eficiente do material glicosídico presente no tubérculo, como é indicado por corresponder o resíduo de hidrólise, pela metodologia descrita, a $13,49 \pm 0,77\%$ da matéria seca original, enquanto, pelo método de MORRIS et al. (1956), corresponder a $15,82 \pm 0,34\%$ da matéria seca original. No material proveniente de *D. floribunda* examinado, este resíduo correspondeu a $20,27 \pm 0,51\%$ da matéria seca original, em seis repetições.

Análise da diosgenina bruta de *D. composita* por cromatografia em fase gasosa mostrou uma pureza de $58,64 \pm 2,92\%$, e por espectrofotometria de ultravioleta, de $74,72 \pm 3,68\%$. A menor exatidão do método espectrofotométrico, neste caso devida a uma menor discriminação entre a substância de interesse e seus interferentes, é atestada pela pureza de $54,7\%$ conseguida por recristalização. Em *D. floribunda*, o método de recristalização revelou para a diosgenina bruta obtida uma pureza mínima de $39,2\%$.

A diosgenina isolada tanto de *D. composita* quanto de *D. floribunda* apresenta-se junto a iamogenina (25S-espirost-5-en-3 β -ol), como observado pela depressão em seu ponto de fusão (p.f.) de $189-193^{\circ}\text{C}$, com amolecimento a 180°C , e pela rotação óptica $[\alpha]_{\text{D}}^{27} = -124,24^{\circ}$. Amostra analiticamente pura de diosgenina apresentou p.f. $206-208^{\circ}\text{C}$ e $[\alpha]_{\text{D}}^{28} = -115,05^{\circ}$. Está registrado que diosgenina apresenta p.f. $205,5-208^{\circ}\text{C}$ e $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -118^{\circ}$ (ROTHROCK et al., 1955) ou p.f. 208° e $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -123^{\circ}$ (WALL & WALLENS, 1955); iamogenina, p.f. 201°C e $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -123^{\circ}$ (WALL & WALLENS, 1955), e β -sitosterol, p.f. 140°C e $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -36^{\circ}$ (DIRSCHERL & NAHM, 1944). O acetato de diosgenina, obtido em 85% de rendimento, mostrou p.f. $199-200^{\circ}\text{C}$ e $[\alpha]_{\text{D}}^{28} = -115,11^{\circ}$, enquanto a literatura registra seu p.f. $199-202^{\circ}\text{C}$ e $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -115^{\circ}$ (WALL & WALLENS, 1955) e cita p.f. 182°C e $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -113^{\circ}$ para o acetato de iamogenina (WALL & WALLENS, 1955) e p.f. 132°C e $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -39,4^{\circ}$ para o acetato de β -sitosterila (DIRSCHERL & NAHM, 1944). Esses dados confirmam a coocorrência de diosgenina e iamogenina em tubérculos de *D. composita* e *D. floribunda*, como acontece em outras dioscoriáceas (MARKER et al., 1943), e indicam a ausência, ou presença em quantidade não detectável, de β -sitosterol na fração esteroídica dos tubérculos de barbasco aqui trabalhados.

SUMMARY

EXTRACTION AND ISOLATION OF DIOSGENIN FROM YAMS

Dioscorea composita Hemsl. and *D. floribunda* Mart. & Gal., introduced in Brazil, showed diosgenin contents of $3.15 \pm 1.41\%$ and $4.72 \pm 0.24\%$ on dried tubers, and minimum purities of 54.7% and 39.2% ,

respectively. Yamogenin co-occurs in the tubers of both species. The diosgenin content in *D. composita* increases according to the age of the plant, showing a pronounced maximum around the third year and stabilizing around the sixth year of cultivation. Methods for extraction, isolation and purification are also described.

Index terms: yams, *Dioscorea composita* Hemsl., *Dioscorea floribunda* Mart. & Gal., *Dioscoreaceae*, diosgenin, yamogenin.

AGRADECIMENTOS

Ao Sr. Edgar César Zerbinatti, pelo auxílio técnico na execução do trabalho, e aos Laboratórios Lepetit, pela realização das análises espectroscópicas e de cromatografia em fase gasosa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARBOSA FILHO, J.M.; MEDEIROS, D.F. & BHATTACHARYYA, R. Estudos em dioscoriáceas brasileiras. Parte III. Investigação da *Dioscorea trisepta* L. e *D. trifida* L. Isolamento e identificação de diosgenina. *Ciência e Cultura*, São Paulo, **34**(7):482, 1982. Suplemento.
- ; ——— & ———. Estudos sobre dioscoriáceas brasileiras. Parte IV. "Screening" de *D. alata*, *D. bulbifera*, *D. leptostachya*, *D. glandulosa*, *D. dodecaneura* e *D. sculenta* quanto ao conteúdo de diosgenina. *Ciência e Cultura*, São Paulo, **35**(7):476, 1983. Suplemento.
- BRUCE, W.F. & RALLS, J.O. Dihydrocholesterol. In: BLATT, A.H. *Organic syntheses*. New York, John Wiley, 1943. Collective Volume 2, p.191-193.
- CRUZADO, H.J.; DELPIN, H. & ROARKE, B.A. Sapogenin production in relation to age of tuber in two *Dioscorea* species. *Turrialba*, **15**(1):25-28, 1965.
- DIRSCHERL, W. & NAHM, H. Die Seitenkette des β - und γ -Sitosterins. *Justus Liebig's Annalen der Chemie*, **555**:57-69, 1944.
- FIESER, L.F. & FIESER, M. Hormones from diosgenin. In: ———. *Steroids*. New York, Reinhold Publishing, 1959. p.547-554.
- MARKER, R.E. Steroidal hormone intermediates, U. S. Patent 2,420, 489. *Apud Chemical Abstracts*, **41**:5689, 1947.
- ; TSUKAMOTO, T. & TURNER, D.L. Sterols. C. Diosgenin. *Journal of the American Chemical Society*, **62**:2525-2532, 1940.
- ; WAGNER, R.B.; ULSHAFFER, P.R.; WITTBECKER, E.; GOLDSMITH, D.P.J. & RUOF, C.H. Sterols. CLVII. Sapogenins. LXIX. Isolation and structures of thirteen new steroidal sapogenins. *Journal of the American Chemical Society*, **65**:1199-1209, 1943.
- MORRIS, M.P.; ROARKE, B.A. & CANCEL, B. Simple procedure for the routine assay of *Dioscorea* tubers. *Agricultural and Food Chemistry*, **6**:856-858, 1956.

- ROTHROCK, J.W.; STOUDET, T.H. & GARBER, J.D. Isolation of diosgenin by microbiological hydrolysis of saponin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **57**:151-155, 1955.
- ROZANSKI, A. A simplified method of extraction of diosgenin from *Dioscorea* tubers and its determination by gas-liquid chromatography. *Analyst*, **97**:968-972, 1972.
- SAUVAIRE, Y. & BACCOU, J.C. L'Obtention de la diosgénine, (25R)-Spirost-5-ène-3 β -ol; Problèmes de l'hydrolyse acide des saponines. *Lloydia*, **41**(3):247-256, 1978.
- TSUKAMOTO, T. & UENO, Y. Glucosides of *Dioscorea tokoro* Makino. I. Dioscin, dioscoreasapotoxin and diosgenin. *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, **56**: 802, 1936.
- WALL, M.E.; KRIDER, M.M.; KREWSON, C.F.; EDDY, C.R.; WILLAMAN, J.J.; CORELL, D.S. & GENTRY, H.S. Steroidal sapogenins. VII. Survey of plants for steroidal sapogenins and other constituents. *Journal of the American Pharmaceutical Association*, **43**:1-7, 1954.
- & WALLENS, H.A. Steroidal sapogenins. XXVII. Preparation and properties of 20-isosapogenins. *Journal of the American Chemical Society*, **77**:5661-5665, 1955.