

Metabolitos Secundarios en Cycadaceae: I. Estudios de los tipos de metabolitos secundarios en especies de los géneros *Microcycas*, *Dioon*, *Cycas*, *Zamia* y *Ceratozamia*

Esperanza Peña, Emma Grillo, Margarita Ruiz, Jardín Botánico Nacional
Universidad de La Habana

RESUMEN

Se analizó el contenido de 10 tipos de metabolitos secundarios en hojas mayores y menores de dos años a 19 especies de Cycadaceae. Todas las especies estudiadas con tienen grupos amino libres, flavonoides y triterpenos y/o esteroides y se encontraron glicósidos cardiotónicos en las fases de desarrollo de la hoja estudiada. Se encontraron diferencias específicas en alcaloides, leucoantocianidinas, saponinas, fenoles y taninos. Se discuten los resultados.

ABSTRACT

The content of 10 different types of secondary products in leaves older and younger than two years was analyzed in 19 species of Cycadaceae. All species taken into account contained free amino groups, flavonoids and triterpenes and/or steroids and cardiotonic glycosides in the leaf developmental stages studied. Specific differences in alkaloids, leucoanthocyanidins, Saponines, phenols and tannins were found. Results are discussed.

INTRODUCCIÓN

En la familia Cycadaceae la cual agrupa plantas espermatofitas de caracteres primitivos, se han realizado hasta el presente múltiples estudios con objetivos diversos. Las investigaciones morfoanatómicas y paleobotánicas han servido para considerar la existencia de una familia, *Cycadaceae*, con un

elevado número de especies agrupadas en 9 géneros (Chamberlain, 1919; González, 1980), aunque actualmente algunos investigadores consideran la existencia de tres familias diferentes: *Zamiaceae*, *Cycadaceae* y *Stangeriaceae* (Johnson, 1959; Greguss, 1968).

Son aislados los trabajos, que en esta familia incorporan métodos complementarios que permitan tener un conocimiento más completo acerca de estas plantas. Y por otra parte, los trabajos en que se utilizan estos métodos no han tenido como uno de sus objetivos contribuir a los estudios taxonómicos (Hegnauer, 1962; Alemán y cols., 1972; Swain y Harborne, 1973; Peña y cols., 1982; Peña y cols., 1983).

El estudio de sistemas enzimáticos y compuestos secundarios del

metabolismo, además de incrementar el conocimiento de estas plantas, puede dar alguna luz acerca de la validez o no de los criterios taxonómicos utilizados en la agrupación de los distintos géneros en una o más familias. En el presente trabajo se dan los primeros pasos en este sentido, al realizar el tamizaje fitoquímico a hojas mayores y menores de dos años de 19 especies que abarcan los géneros *Cycas*, *Zamia*, *Microcycas*, *Dioon* y *Ceratozamia* existentes en las diferentes áreas del Jardín Botánico Nacional.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales utilizados

En el presente trabajo se utilizaron plantas de la familia *Cycadaceae* representadas en el Jardín Botánico Nacional, Ciudad de La Habana.

Se colectaron hojas menores de dos años a 19 representantes de los cinco géneros existentes, los cuales se relacionan a continuación:

1. *Cycas media* R.Br.
2. *Cycas revoluta* Thunb.
3. *Cycas pectinata* Griff.
4. *Ceratozamia mexicana* Brongn.
5. *Dioon edule* Lindl.
6. *Dioon spinulosum* Dyer. ex Eichl.
7. *Dioon purpussii* Rose.
8. *Microcycas calocoma* (Miq.) A.DC.
9. *Zamia acuminata* Oerst. ex Dyer.
10. *Zamia furfuracea* Ait.
11. *Zamia latifoliata* Prenl.
12. *Zamia obliqua* A.Br.
13. *Zamia skinneri* Warsz.
14. *Zamia angustifolia* Jacq.
15. *Zamia stricta* Miq.
16. *Zamia* sp. (Calabazar)
17. *Zamia* sp. (Caridad de los Indios).
18. *Zamia* sp. (Remates de Guane)
19. *Zamia* sp. (Sta. María de Loreto).

A las plantas de las 13 primeras especies relacionadas en la lista anterior se les colectaron además, hojas mayores de dos años, teniendo en cuenta que cada año se

producen hojas a un mismo nivel en el tallo.

Las plantas de las cuales se muestrearon las hojas crecen en condiciones de vivero y/o de campo.

En el vivero, las plantas crecen en macetas con riego diario, 40% de humedad, 70% de luz solar, fumigación quincenal y en una mezcla de suelo compuesta de 40% de arena, 40% de humus, 10% de carbón vegetal y 10% de barro.

Las plantas que se desarrollan en otras áreas del referido jardín crecen en las condiciones naturales del lugar y se abonan alternadamente con materia orgánica en descomposición y con abono completo NPK.

Los ejemplares utilizados de las especies referidas con los números 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18 y 19 proceden del vivero y las referidas con los números 1, 2, 3, 8, y 13, de distintas zonas del jardín.

En todos los casos, las hojas muestreadas (raquis y pinnas) se dejaron secar a temperatura ambiente o en estufa a 60°C. Una vez secas se trituraron bien y se maceraron en etanol durante siete días como mínimo para la realización de los análisis. Se analizaron 5 grs de hoja en todos los casos.

2.2 Métodos

Con los materiales referidos anteriormente se procedió a realizar

una separación de fracciones y el reconocimiento de los distintos tipos de metabolitos secundarios presentes.

2.2.1 Separación de fracciones

Para realizar la separación de fracciones se utilizó una modificación del método de Rondina y Coussio (1969), la cual se resume en la figura 1.

2.2.2 Técnicas para la determinación de metabolitos secundarios

Se detectó la presencia de grupos amino libres, fenoles, taninos, leucoantocianidinas, flavonoides, saponinas, glicósidos cardiotónicos esteroides y/o triterpenos y alcaloides en todas las especies estudiadas.

2.2.2.1 Reconocimiento de grupos amino libres: a 1 ml de la Fracción A se le realizó la prueba de la ninhidrina según la técnica de Rondina y Coussio (1969).

2.2.2.2 Reconocimiento de fenoles y taninos: se utilizó 1 ml de la Fracción A para realizar cada uno de los siguientes ensayos: prueba con cloruro férrico, prueba con gelatina y ensayo de la cafeína, según la técnica de Rondina y Coussio (1969).

2.2.2.3 Reconocimiento de triterpenos y esteroides: se realizaron ensayos en las Fracciones B y C utilizando 1 ml en cada uno. Se hicieron las pruebas de Lieberman-Burchard, Rosenhaeim y Salkowski si-

guiendo las técnicas de Stall y Jucker (1955).

2.2.2.4 Reconocimiento de flavonoides:

se realizaron los mismos ensayos en las Fracciones D y E utilizando 1 ml para cada prueba. Se siguió la técnica descrita por Shinoda (1928) en los ensayos del H₂SO₄ y en la prueba de Shinoda.

2.2.2.5 Reconocimiento de leucoantocianidinas: se utilizó 1 ml de la Fracción D para el ensayo de Rosenheim según la técnica de Rosenheim (1920).

2.2.2.6 Reconocimiento de glicosidos cardiotónicos: se utilizó 1 ml de la Fracción D para realizar cada uno de los siguientes ensayos: prueba de Kedde y prueba de Raymond según la técnica de Robinson (1955).

2.2.2.7 Reconocimiento de saponinas:

Se utilizó 1 ml de la Fracción F con el ensayo de la espuma según la técnica de Steiner y Haltzem (1955).

2.2.2.8 Reconocimiento de alcaloides:

Se utilizó 3 ml de la Fracción C en cada especie estudiada. A cada ml se le trató con reactivo de Mayer, Dragendorff y Wagner respectivamente. Este procedimiento se repitió en 1 ml de la Fracción D pero solamente con el reactivo de Dragendorff. Se siguió la técnica de Rondina y Coussio (1969).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se determinó la presencia o ausencia de algunos tipos de metabolitos secundarios en hojas menores y mayores de dos años a ejemplares de 19 especies de la familia *Cycadaceae* mediante distintos análisis fitoquímicos de tipo cualitativo.

En la tabla 1 se observan los resultados de los distintos tipos de compuestos secundarios obtenidos en hojas menores de dos años en plantas de los géneros *Cycas*, *Dioon*, *Microcycas*, *Ceratozamia* y *Zamia*.

Se evidencia que las 19 especies analizadas presentan grupos amino libres, flavonoides, esteroides y/o triterpenos, mientras que en ninguna de éstas se detectó la presencia de glicósidos cardiotónicos. Diferencias en cuanto a los distintos tipos de productos secundarios del metabolismo se observan en el contenido de fenoles, taninos, saponinas, leucoantocianidinas y alcaloides. Se evidencia también que *Cycas media*, *Dioon edule*, *Dioon spinulosum*, *Dioon purpussii*, *Zamia*

obliqua, *Zamia latifoliata*, *Zamia acuminata*, *Zamia stricta*, *Zamia* sp. (Calabazar), *Zamia* sp. (Caridad de los Indios), *Zamia* sp. (Remates de Guane) y *Zamia* sp. (Santa María de Loreto) tienen los mismos tipos de metabolitos secundarios. Ninguna de estas especies contienen fenoles, taninos, saponinas y alcaloides. *Ceratozamia mexicana* presenta alcaloides, fenoles, taninos y saponinas y *Cycas pectinata* sólo se diferencia de la anterior por la falta de alcaloides; *Microcycas calocoma* y *Zamia furfuracea* difieren de la anterior por la ausencia de saponinas, y *Cycas revoluta* contiene este compuesto. Las únicas especies que presentan leucoantocianidinas son *Zamia skinneri* y *Zamia angustifolia*, en estas dos especies no se detectaron fenoles, taninos, alcaloides ni saponinas.

En la tabla 2 se presentan los resultados obtenidos con respecto al contenido de los distintos tipos de metabolitos secundarios en hojas mayores de dos años en todas las especies posibles de plantas pertenecientes a los géneros *Cycas*, *Dioon*, *Microcycas*, *Ceratozamia* y *Zamia*.

En las hojas mayores de dos años de todas las especies analizadas se comprobó la presencia de grupos amino libres, flavonoides, triterpenos y/o esteroides. Carecían de glicósidos cardiotónicos. Se observa que el comportamiento de los metabolitos secundarios es igual en: *Cycas media*, *Dioon edule*, *Dioon spinulosum*, *Dioon purpussii*, *Zamia latifoliata* y *Zamia acuminata* ya que además de los metabolitos coincidentes en todo el grupo, estas especies tienen en común la ausencia de fenoles, taninos, saponinas y alcaloides. *Ceratozamia mexicana* tiene un comportamiento muy similar a las anteriores, sólo difiere por su contenido en alcaloides. *Cycas pectinata* y *Cycas revoluta* difieren porque la primera contiene además fenoles y taninos.

En ambas especies hay saponinas y no se presenta acumulación de alcaloides. *Microcycas calocoma* y *Zamia furfuracea* presentan un contenido idéntico ya que en ambas se detectó la presencia de fenoles y taninos, así como la ausencia de alcaloides y saponinas; estas dos especies se diferencian de *Zamia skinneri* en que esta última posee además, leucoantociani-

dinas. *Zamia obliqua* sólo posee leucoantocianidinas además de los tipos de metabolitos comunes a todas las especies estudiadas.

El análisis comparativo del tamizaje fitoquímico realizado a las hojas menores y mayores de dos años que se deriva de las tablas 1 y 2 pone de manifiesto que no ocurren cambios cualitativos asociados a la edad de la hoja en el contenido de grupos amino libres, flavonoides, esteroides y/o triterpenos, glicósidos cardiotónicos y alcaloides, al menos en las especies estudiadas. Sin embargo, dos de las especies de *Zamia* analizadas acumulan compuestos secundarios con la edad de la hoja: en *Zamia obliqua*, leucoantocianidinas y en *Zamia skinneri*, fenoles y taninos.

Este comportamiento resulta lógico. Sin embargo en *Ceratozamia mexicana* con el incremento de la edad de la hoja se pierden totalmente los fenoles, taninos y saponinas. Si se considera que esta es la única especie estudiada que contiene alcaloides y que estos compuestos son de cadena biosintética más compleja, pudiera pensarse que los metabolitos que no se detectan en las hojas mayores de dos años se han transformado en alcaloides o en algunos compuestos más complejos en su vía de síntesis.

La veracidad de esta hipótesis requiere de otro tipo de análisis. Otro aspecto interesante es el que se deriva de la utilización práctica que pueda darse a los resultados obtenidos en este trabajo. Aunque las diferencias que se ponen de manifiesto en los dos tipos de hojas analizadas son ligeras, resulta más conveniente la utilización de hojas mayores de dos años.

El estudio realizado está restringido a 5 de los 9 géneros que se consideran en la familia *Cycadaeae* y de éstos sólo se estudian algunas especies. No obstante, los resultados sugieren gran homogeneidad en los géneros, lo cual se pone de manifiesto en el comportamiento idéntico de las tres especies de *Dioon* estudiadas; asimismo en *Cycas* y en *Zamia* las diferencias específicas se presentan sólo en tres tipos de compuestos secundarios. En este último género se

ha determinado la ausencia de saponinas en cinco especies colectadas en nuestro país, dos de las cuales también se reportan en este trabajo. (Aleman y cols. 1972).

La homogeneidad bioquímica encontrada en las especies estudiadas, sin embargo, no parece favorecer la separación de los géneros en tres familias diferentes, como consideran algunos investigadores (Johnson, 1959; Greguss, 1968), aunque para sustentar este criterio se requiere de un estudio mucho más amplio.

Finalmente nuestros resultados con respecto al contenido de alcaloides de *Microcycas calocoma* difieren de los de Aleman y cols (1972). La técnica utilizada por ellos puede haber provocado la reacción con compuestos que no fueran realmente alcaloides, los cuales no fueron caracterizados posteriormente.

Sin dudas, resultaría de interés completar este tipo de estudio ya que sólo Aleman y cols. (1972) han realizado ensayos para el reconocimiento de saponinas y alcaloides en algunas especies de *Zamia* y en *Microcycas calocoma*.

CONCLUSIONES

1. El estudio de los compuestos secundarios del metabolismo es más confiable en hojas mayores de dos años que en hojas menores de dos años, al menos en las especies estudiadas.
2. La coincidencia en el comportamiento de grupos amino libres, flavonoides, esteroides y/o triterpenos y glicósidos cardiotónicos y las variaciones específicas encontradas en alcaloides, leucoantocianidinas y saponinas en las especies estudiadas, permiten suponer homogeneidad en el metabolismo secundario de estas plantas.
3. Las variaciones en fenoles, taninos, saponinas, leucoantocianidinas y alcaloides no responden a la separación en tres familias que proponen algunos investigadores.

BIBLIOGRAFÍA

- Aleman, E. y cols.
1972. Phytochemische unter suchungen an Pflanzen der Kubanischen Flora. Die Kulturpflanze, Berlin. Vol. XIX, p.p: 359-425.
- Chamberlain, C.J.
1919. "The living Cycads". 2a. ed Chicago. p.p: 7-63.
- González, L.
1980. Contribución al Estudio del Género *Zamia* L. en Cuba. Rev. Jard. Bot. Nac. Vol.I, No.1, p.p: 67-77.
- Greguss, P.
1968. Xylotomy of the Living Cycads. Akadémiai Kiadó. Budapest. p.p: 15-19, 36-160.
- Hegnauer, R.
1962. Chemotaxonomie Der pflanzen. Birkhauser Verlag Basei und Stuttgart, Vol.I, p.p: 194-321.
- Johnson. L.A.S.
1959. The families of Cycads and Zamiaceae of Australia. Proc, Linnean Soc.New.South soc. London 2, Ser.Bot.Vol. 5, p.p: 155-204.
- Peña, E. y E.Grillo
1982. Proliferación de *Microcycas Calocoma* (Miq.) A.DC. In vitro. Revista, Jardín Botánico Nacional. Vol.III, No.2, p.p: 177-195.
- Peña, E. y E.Grillo y D.Pérez
1983. Peroxidasas en *Cycas circinalis* L. Estudios en la semilla. Rev. Jardín Botánico Nacional. Vol.IV, No.3, p.p: 117-127.
- Robinson, T.
1955. Modern methods of plantanalysis. Peach E.A. and F.B. Francys eds Springer Verlag, Berlín, Vol. III, p. 107.

Rondina, R.U.D. y J.D.Coussio
1969. Estudio fitoquímico de plantas medicinales argentinas, Rev.Inv.Agrop. INTA, Argentina, Serie 2, Biol. y Producción Vegetal. Vol.VI, No.22, p.p: 351-366.

Rosenheim, O.
1920. XXI Observations on Anthocyanins. The Anthocyanins of the young leaves of the graph vive. Biochem J. p.p. 14-17.

Shinoda, J.
1928. Color reactions of flavone and flavonal derites and the like. J.Pharm.Soc.Japan.

Vol.48, No.214,
p.p: 22-29, 47.

Stall, A. y E.Jucker
1955. Modern Methods of Plant Analysis, Peach, E.A. and F.B. Tracy eds. Springer. Verlag, Berlin, Vol.III, No.75, p.p: 152.

Steiner, N. y H.Haltzem
1955. Modern Methods of Plant. Analysis Peach.E.A. and F.B. Tracy eds. Springer Verlag, Berlin, Vol. III, p.p: 75.

Swain, T. y J.B.Harborne
1973. Phytochemistry. Pergamon Press. Vol.12, No. 2, p.p: 371-373.

Recibido: 19 de diciembre de 1984.

BIBLIOGRAFIA

Johnson, J.A.S.
1959. The families of Cycads and Ginkgoaceae of Australia. Proc. Linn. Soc. New South Wales. London 2, Ser. Bot. Vol. 5, p.p: 155-204.

Peña, E. y E.Gillio
1982. Proliferación de Microcystis Calocoma (Miq.) A.D.C. in vitro. Rev. Jard. Bot. Nac. Nacional. Vol. III, No. 1, p.p: 175-195.

Peña, E. y E.Gillio y D.Pérez
1983. Proliferación en cultivo in vitro de Microcystis Calocoma (Miq.) A.D.C. in vitro. Rev. Jard. Bot. Nac. Nacional. Vol. IV, No. 3, p.p: 177-177.

Robinson, T.
1952. Modern methods of plant analysis. Peach E.A. and F.B. Tracy eds. Springer Verlag, Berlin, Vol. III, p. 107.

Almen, E. y cols.
1972. Phytochemische Untersuchungen an Pflanzen der Rubiaceen Flora. Die Katurpflanzen Berlin. Vol. XIX, p.p: 359-425.

Chamberlain, C.L.
1979. "The Living Cycads". 2a ed. Chicago. p.p: 7-81.

González, J.
1980. Contribución al estudio del género *Calocoma* en Cuba. Rev. Jard. Bot. Nac. Vol. I, No. 1, p.p: 87-97.

Greguss, P.
1988. Xylotomy of the living Cycads. Akadémiai Kiadó, Budapest. p.p: 15-19, 26-160.

Hegnauer, K.
1962. Chemotaxonomie der Pflanzen. Birkhäuser Verlag Basel und Stuttgart, Vol. 1, p.p: 154-177.

TABLA 1

TAMIZAJE FITOQUIMICO A HOJAS MENORES DE DOS AÑOS DE 19 ESPECIES DE Cycadaceas 1, grupos amino libres, 2, flavonoides, 3, esteroides y/o triterpeno, 4, glicosidos cardiotonicos, 5, alcaloides, 6, leu. coantocianidinas, 7, fenoles, 8, taninos, 9, saponinas

GENERO	Tipos de metabolitos		1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Especies										
CYCAS	media		+	+	+	-	-	-	-	-	-
	revoluta		+	+	+	-	-	-	-	-	+
	pectinata		+	+	+	-	-	-	+	+	+
DIOON	edule		+	+	+	-	-	-	-	-	-
	spinulosum		+	+	+	-	-	-	-	-	-
	purpureum		+	+	+	-	-	-	-	-	-
	obliqua		+	+	+	-	-	-	-	-	-
	latifoliata		+	+	+	-	-	-	-	-	-
	acuminata		+	+	+	-	-	-	-	-	-
	stricta		+	+	+	-	-	-	-	-	-
ZAMIA	sp Calabazar		+	+	+	-	-	-	-	-	-
	sp Caridad de los Indios		+	+	+	-	-	-	-	-	-
	sp Remates de Gugne		+	+	+	-	-	-	-	-	-
	sp Santa Maria del Loreto		+	+	+	-	-	-	-	-	-
	skinneri		+	+	+	-	-	+	-	-	-
	angustifolia		+	+	+	-	-	+	-	-	-
	furfuracea		+	+	+	-	-	-	+	+	-
MICROCYNAS	calocoma		+	+	+	-	-	-	+	+	-
CERATOPHYLLUM	mexicanum		+	+	+	-	+	-	+	+	+

TAMIZAJE FITOQUIMICO A HOJAS MAYORES DE DOS AÑOS DE ESPECIES DE Cycadaceae. 1, grupos amino libres; 2, flavonoides; 3, esteroides y/o triterpenos; 4, glicósidos cardiotónicos; 5, alcaloides; 6, leucoantocianidinas; 7, fenoles; 8, taninos; 9, saponinas.

TABLA 2

Tipos de metabolitos		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Especie	Tipos de metabolitos	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Especies									
CYCAS	media	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	revoluta	+	+	+	-	-	-	-	-	+
	pectinata	+	+	+	-	-	-	+	+	+
DIOON	edule	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	spinulosum	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	purpureum	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	latifoliate	+	+	+	-	-	-	-	-	-
ZAMIA	acuminata	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	obliqua	+	+	+	-	-	+	-	-	-
	skinneri	+	+	+	-	-	+	+	+	-
	furfuracea	+	+	+	-	-	-	+	+	-
MICROCYNAS	calocoma	+	+	+	-	-	-	+	+	-
CERATOZAMIA	mexicana	+	+	+	-	+	-	-	-	-

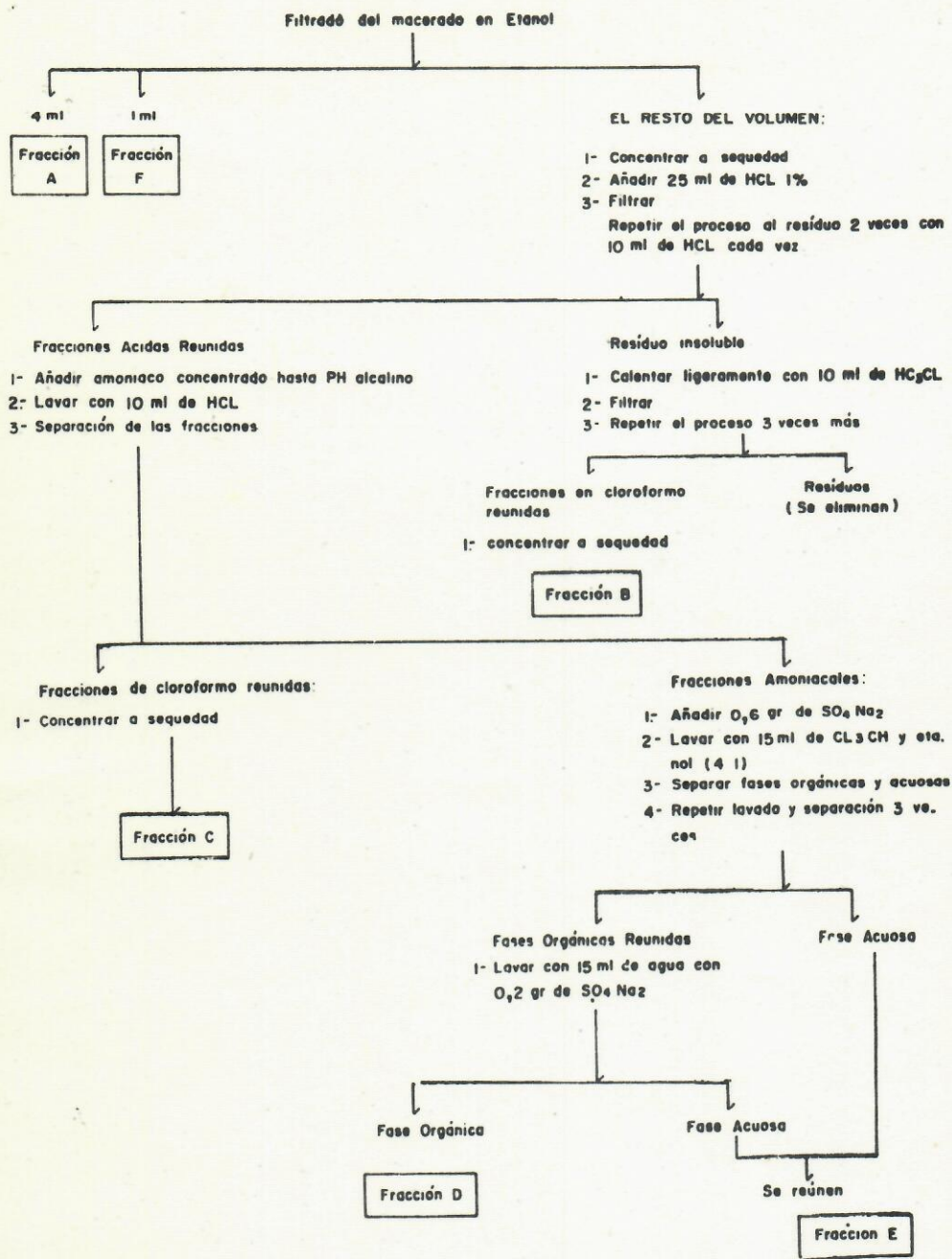


Fig 1 Metodo modificado de Rondina y Coussio (1969) para la separación de fracciones y determinación de metabolitos secundarios