Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE
Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura
Carrera de Biotecnología

Evaluación de la presencia de toxinas, en distintos estados fenológicos de helecho macho (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn), recolectado en fincas lecheras con alta incidencia de hematuria enzoótica bovina (HEB) en la parroquia de Vacas Galindo

Autor:

Cielle Berenisse Villarroel Palacios

Director:

Grace Tatiana Páez Barrera



ÍNDICE

01 Introducción

02 Objetivos

03 Metodología

04 Resultados y discusión

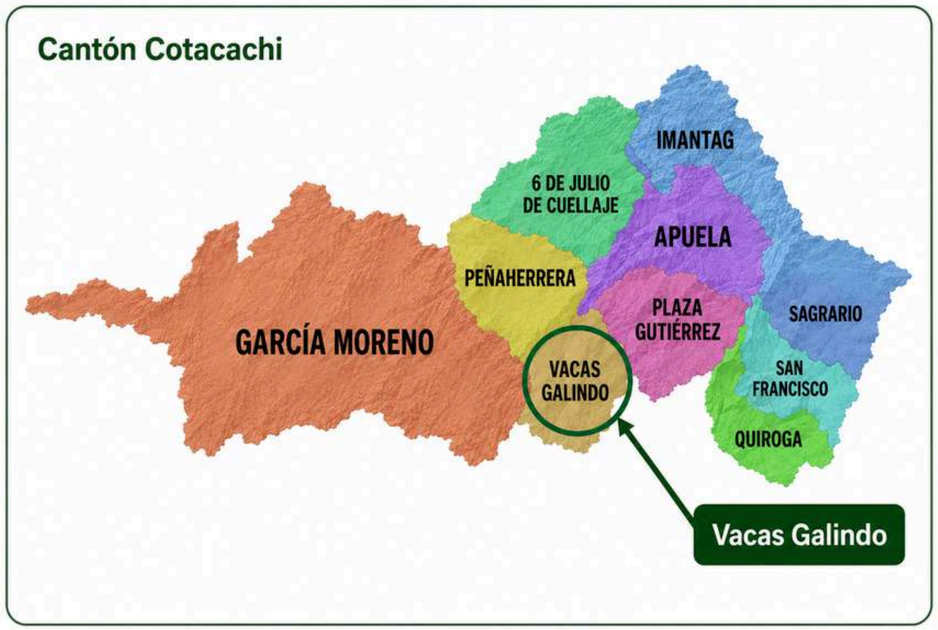
05 Conclusiones y recomendaciones

06 Agradecimientos

Introducción

Área de estudio: parroquia rural Vacas Galindo





Ubicación: catón Cotacachi, provincia de Imbabura

Altitud: 1.200-2.100 m s.n.m.

Clima: templado seco

Temperatura media: 13-18 ºC.

Precipitación anual: 700-2.00 mm.

Extensión territorial: 79 Km2

Extensión territorial: Agricultura y ganadería

(Gobierno Autónomo Descentralizado Parroquial Rural de Vacas Galindo, 2023).

Hematuria enzoótica bovina y *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn

¿Qué es la HEB?

- Enfermedad crónica del bovino
- Se manifiesta con hematuria recurrente
- Produce lesiones en la vejiga urinaria





Relación con el helecho macho

- *Pteridium aquilinum* presente en áreas de pastoreo
- Su ingestión prologanda se asocia con la HEB
- Problema observado en Vacas Galindo

Helecho en el potrero → Ingestión por el bovino → Lesión vesical → Hematuria enzoótica bovina

(Gil da Costa et al., 2024; Marrero et al., 2012; Yoplac, 2024).

Compuestos tóxicos de *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn y pterosina A

Glucósidos iludanos de interés

- Ptaquilósido → Pterosina B
- Caudatósido → Pterosina A
- Ptesculentósido → Pterosina G

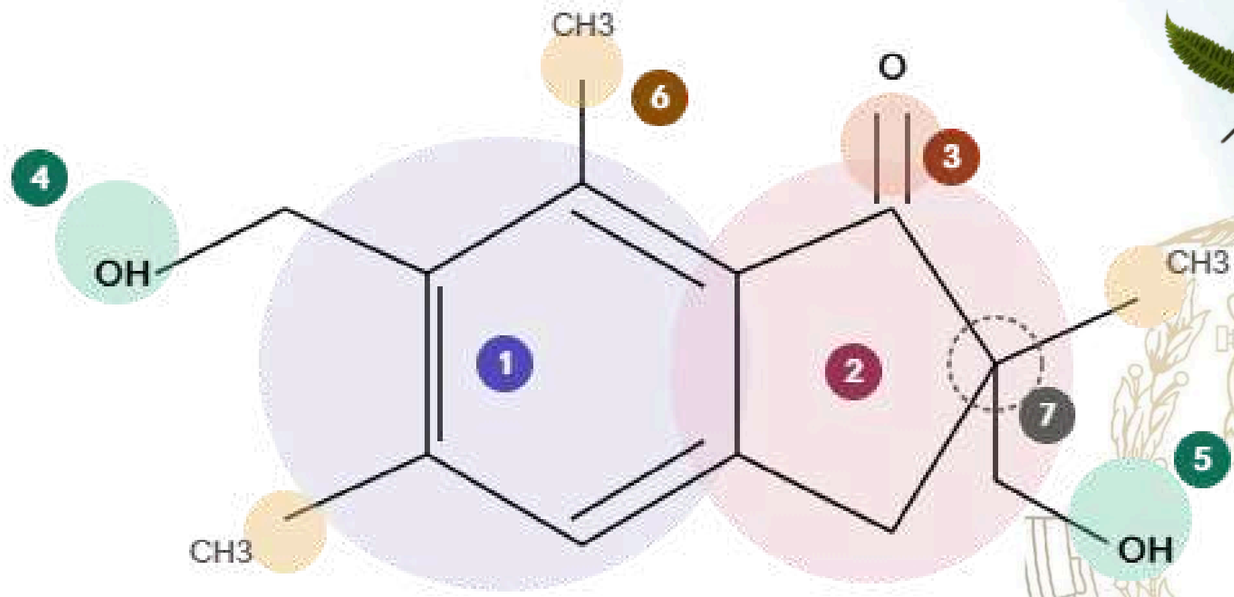
Compuesto Objetivo

- Producto de transformación asociado con el caudatósido
- Compuesto objetivo en la identificación de cromatografía

(Guaraca, 2020; Vetter, 2022; Wu et al., 2021).

Pterosina A

Fórmula molecular: $C_{15}H_{20}O_3$



1 · Anillo aromático (benceno)
2 · Anillo de ciclopentanona
3 · Cetona conjugada (C=O)
4 · Alcohol primario (–CH2CH2OH)
5 · Alcohol primario (–CH2OH)
6 · Grupos metilo (–CH3) ×3
7 · Estereocentro (C cuaternario)

(Realizado por Villarroel, C. en Biorender 2026).

2. Objetivos

2.1 Objetivo General:

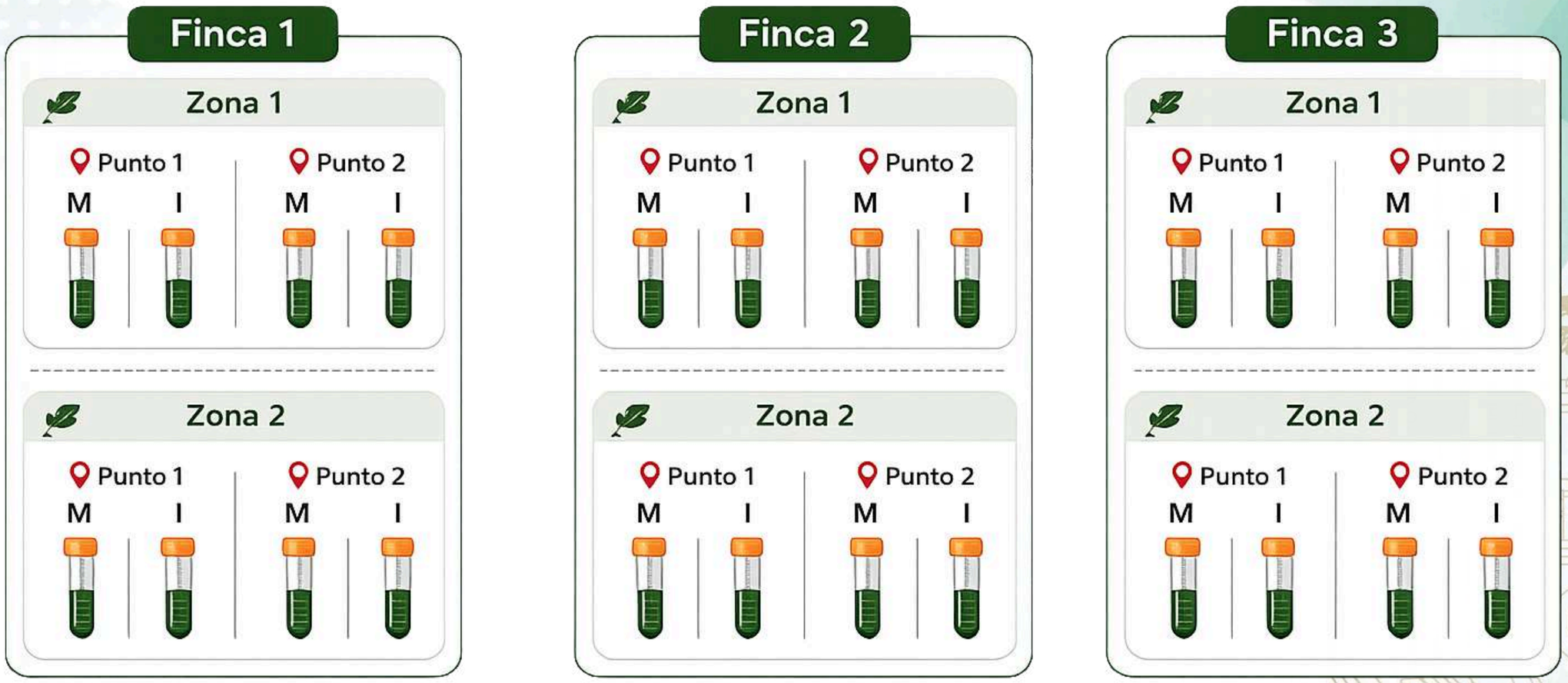
Evaluar la presencia de toxinas, en distintos estados fenológicos de helecho macho (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn), recolectado en fincas lecheras con alta incidencia de hematuria enzoótica bovina (HEB) en la parroquia de Vacas Galindo.

2.2 Objetivos Específicos:

- Caracterizar botánicamente el helecho macho (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn) en la zona de estudio.
- Evaluar la presencia de toxinas y compuestos relacionados en el helecho macho (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn).
- Correlacionar la presencia de toxinas en el helecho macho (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn) con la incidencia de hematuria enzoótica bovina (HEB) en la parroquia de Vacas Galindo.

3. Metodología

Muestreo



8 Muestras por finca

24 muestras en total (12 maduras y 12 inmaduras)

M | I M= estado fenológico maduro, I= estado fenológico inmaduro

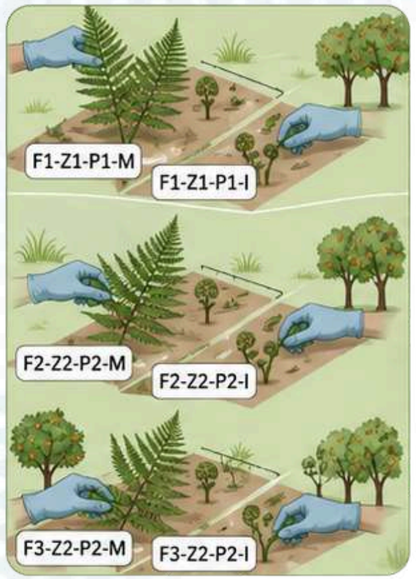
(Realizado por Villarroel, C. en Biorender 2026).

Procesamiento y caracterización de muestras de *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn

ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

1 Recolección

Código: F-Z-P-M/I



2 Empaque

Papel aluminio y fundas ziploc



3 Recepción

Fundas de papel kraf



4 Selección



Fronda madura

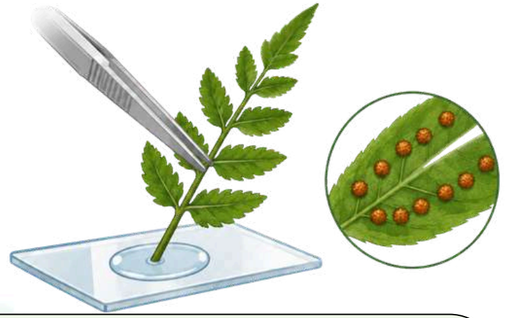
Fronda inmadura

5 Observación en esteroescopio

Identificación de estructuras macroscópicas



6 Obtención de soros para identificación microscopica



7 Tinción con azul de toluidina



Mejora contraste para la observación de estructuras

8 Observación en el microscopio





F: finca; **Z:** zona; **P:** punto de muestro; **M:** fronda madura; **I:** fronda inmadura

(Realizado por Villarroel, C. en Biorender 2026).

Procesamiento y extracción de muestras de *Pteridium aquilinum*

ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

1 Pesaje inicial

24 muestras



2 Secado

35°C ±2 °C, 5 días

Humedad promedio: 64,55 %



3 Trituración

Polvo fino

Materia seca promedio: 35,45 %



4 Almacenamiento

Tubos de 50 mL

≈ 5 g por muestra



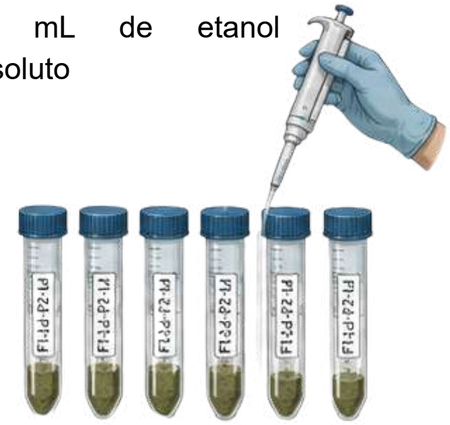
5 Pesaje 2g

2 g por muestra



6 Adición de etanol

20 mL de etanol absoluto



7 Agitación

3 días, 90 rpm



F: finca; **Z:** zona; **P:** punto de muestro; **M:** fronda madura; **I:** fronda inmadura

(Realizado por Villarroel, C. en Biorender 2026).

Procesamiento, extracción, sonicación y concentración de las muestras vegetales

ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

1 Primera maceración

24 muestras
Tiempo: 3 días



2 Sonicación

Sonicación individual
Tiempo: 30 minutos
Temperatura: < 30°C

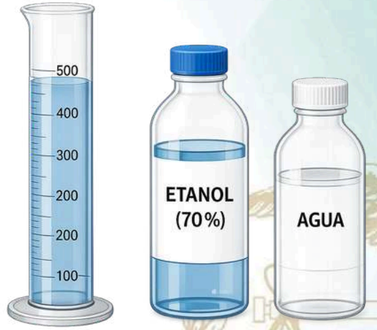


3 Recuperación primer sobrenante

Transfirió a un nuevo tubo Falcon



4 Preparación de solución de etanol acuoso al 70%



Total: 480 mL
Etanol: 334 mL (70%)
Agua: 144 mL (30%)

5 Segunda maceración

- Añadir 20 mL de solución etanol acuoso por muestra
- Tiempo: 3 días



6 Sonicación



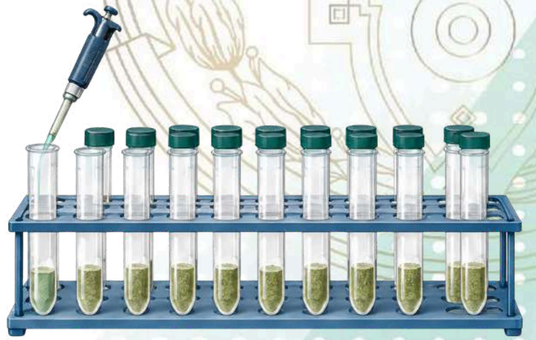
7 Recuperación primer sobrenante

Mezcla con el primer sobrenadante



8 Alícuota para concentración

5 mL por muestra

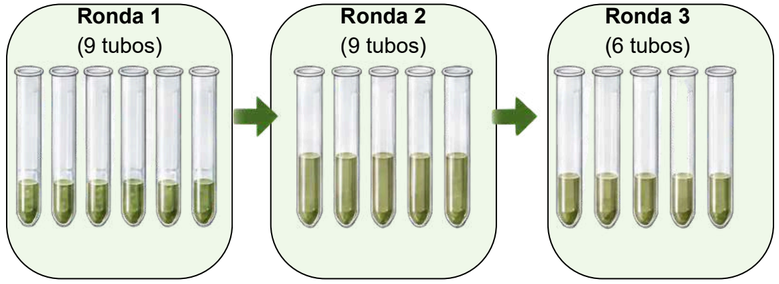


(Realizado por Villarroel, C. en Biorender 2026).

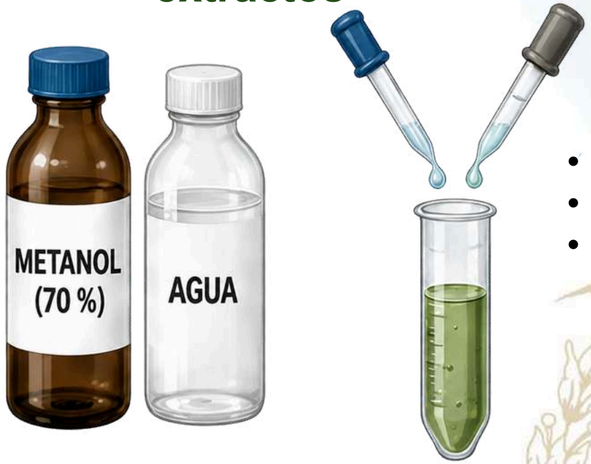
9 Concentración con nitrógeno gaseoso

- Temperatura: 40°C
- Tiempo: 1 h 30 minutos





10 Reconstitución de los extractos



- 2,1 mL de metanol (70%)
- 0,9 mL de agua (30%)
- **Volumen:** 3 mL por tubo

11 Sonicación

- Tiempo: 1 min
- Sin temperatura



12 Extractos listos



(Realizado por Villarroel, C. en Biorender 2026).

Desengrasado, hidrólisis básica y cromatografía de capa fina (TLC)

ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

1 Desengrasado



2 Agitación

120 rpm durante 2 minutos



3 Separación de fases



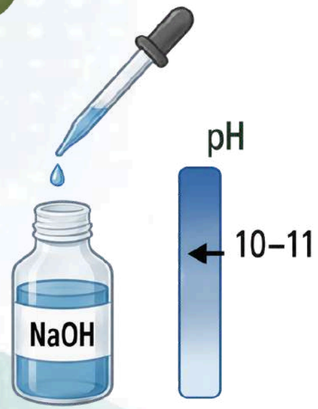
4 Recuperación del extracto



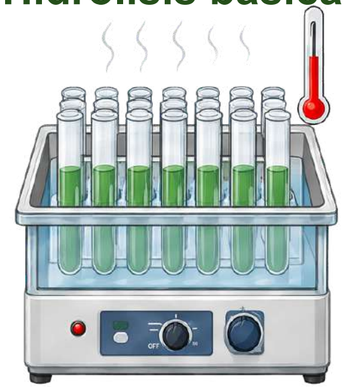
5 Medición del pH inicial



6 Ajuste a pH básico

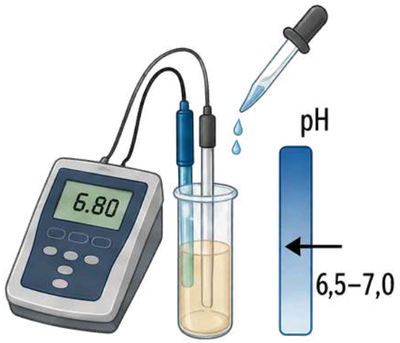


7 Hidrólisis básica



Baño María durante 1 hora

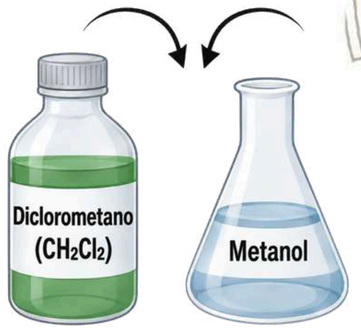
8 Reajuste de pH



9 Preparación de la fase móvil

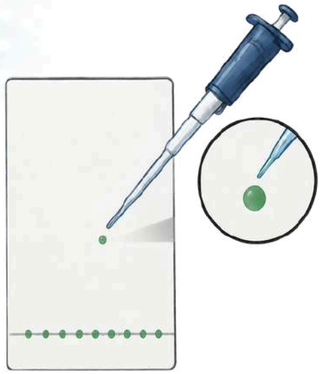
diclorometano: metanol

(9:1)



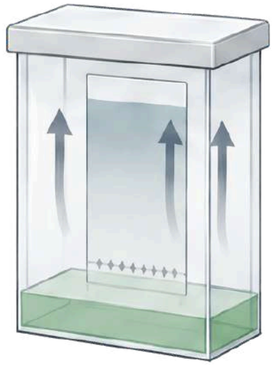
(Realizado por Villarroel, C. en Biorender 2026).

10 Aplicación de las muestras en la placa TLC



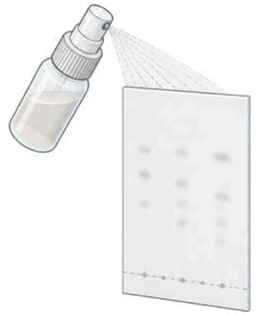
0,5 µL por muestra, 6 repeticiones

11 Desarrollo cromatográfico

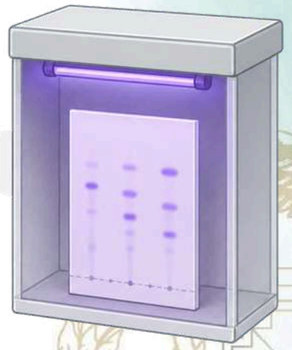


Aprox. 1 hora

12 Observación bajo luz UV



p-anisaldehído

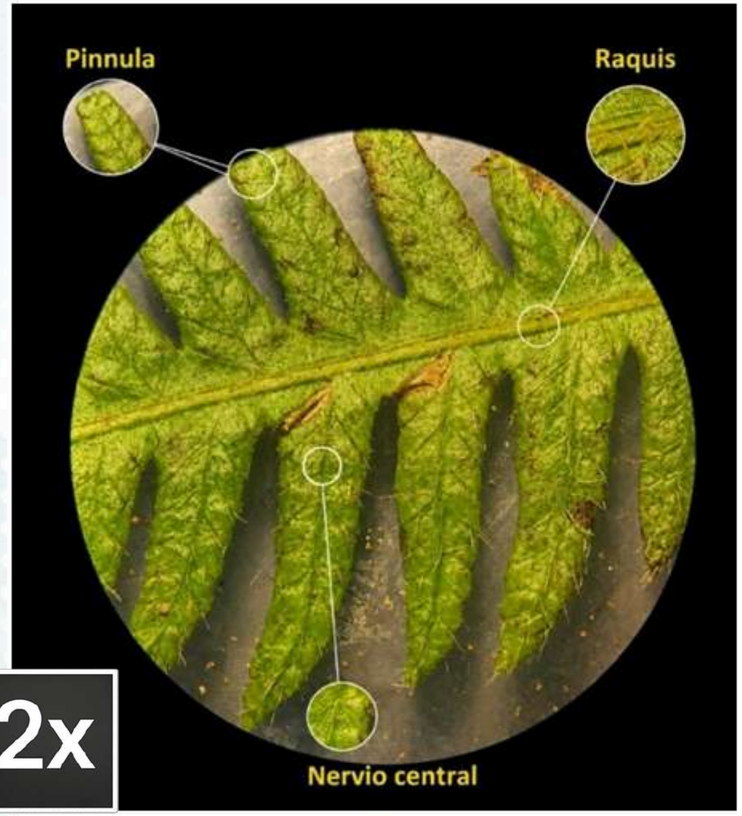


13 Análisis estadístico

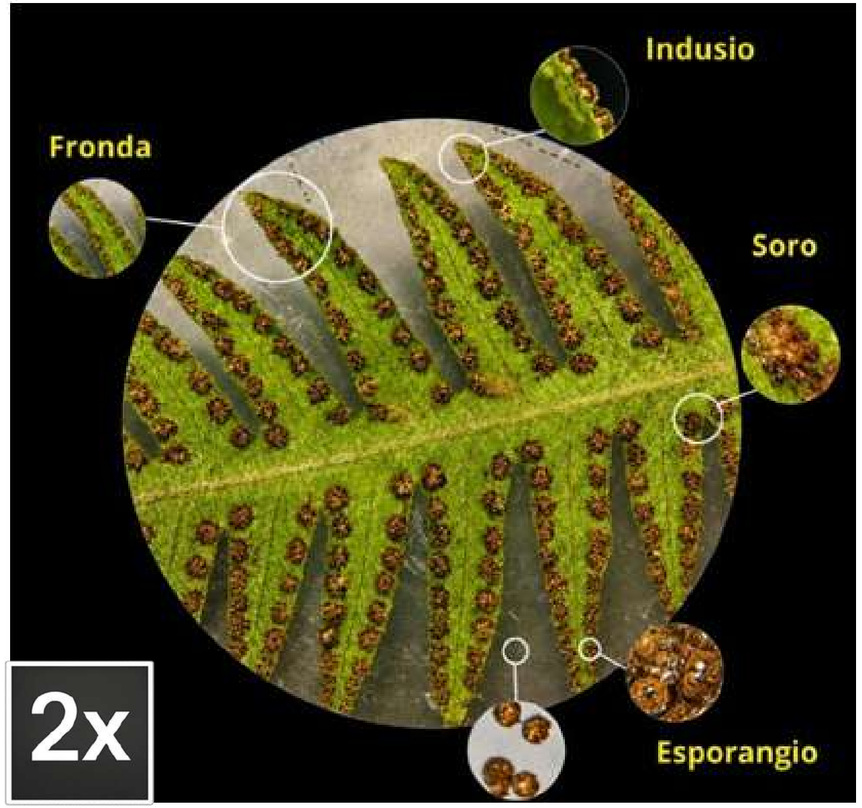
(Realizado por Villarroel, C. en Biorender 2026).

4. Resultados y discusión

Caracterización de la fronda madura



Caracterización botánica de fronda maduro haz



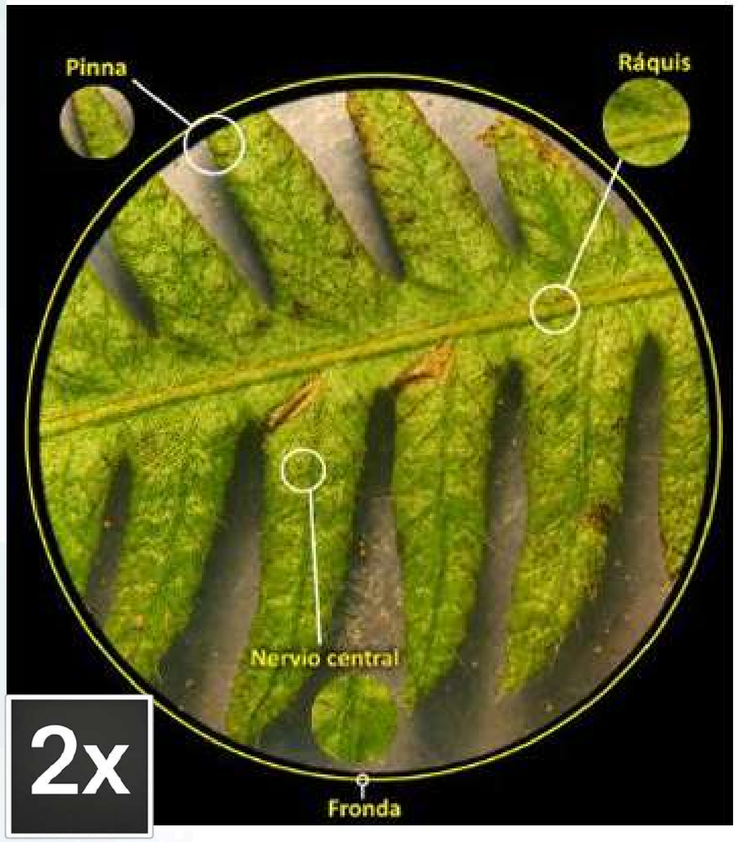
Caracterización botánica de fronda maduro envés



Esporangio maduro

Las frondas maduras presentaron pínulas bien definidas y abundantes soros marginales en el envés. Sus esporangios mostraron mayor diferenciación del pedicelo, la cápsula y el anillo mecánico, características asociadas con la madurez reproductiva y la liberación de esporas (Eslava et al., 2020; Marrs & Watt, 2006; Trejo, 2012).

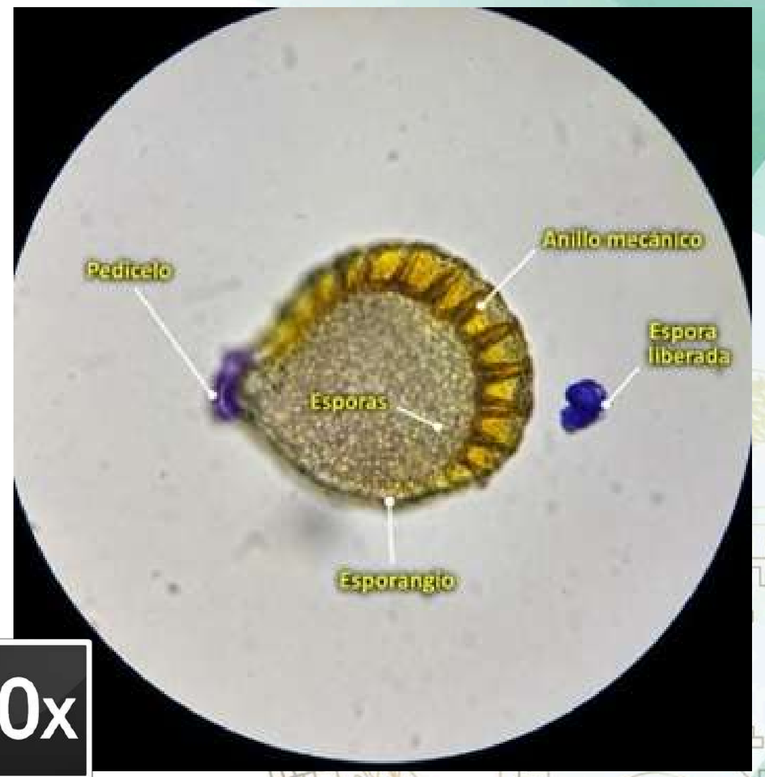
Caracterización de la fronda inmadura



Caracterización botánica de fronda inmaduro haz



Caracterización botánica de fronda inmaduro envés



Esporangio inmaduro

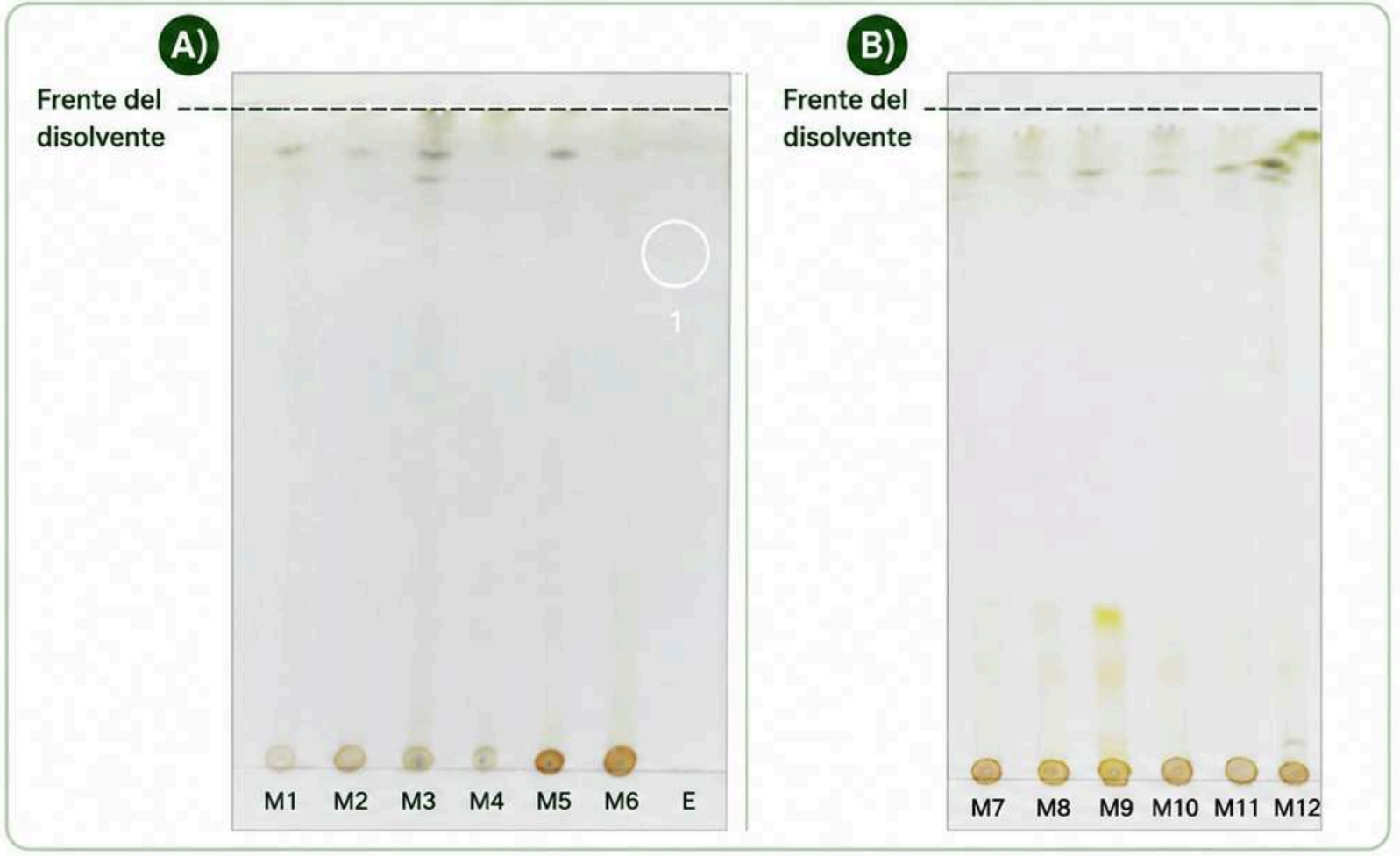
Las frondas inmaduras mostraron pinnas más compactas, menor subdivisión de la lámina y menor desarrollo de soros, esporangios e indusio. Aunque se reconocieron la cápsula y el anillo mecánico, el pedicelo fue menos evidente, lo que indicó un desarrollo reproductivo todavía incompleto (Eslava et al., 2020; Marrs & Watt, 2006; Trejo, 2012).

(Realizado por Villarroel, C. en Canva 2026).

Placa de TLC correspondiente a las muestras de helecho maduro

En luz visible, las frondas maduras mostraron una respuesta cromática tenue y de baja definición.





Rf

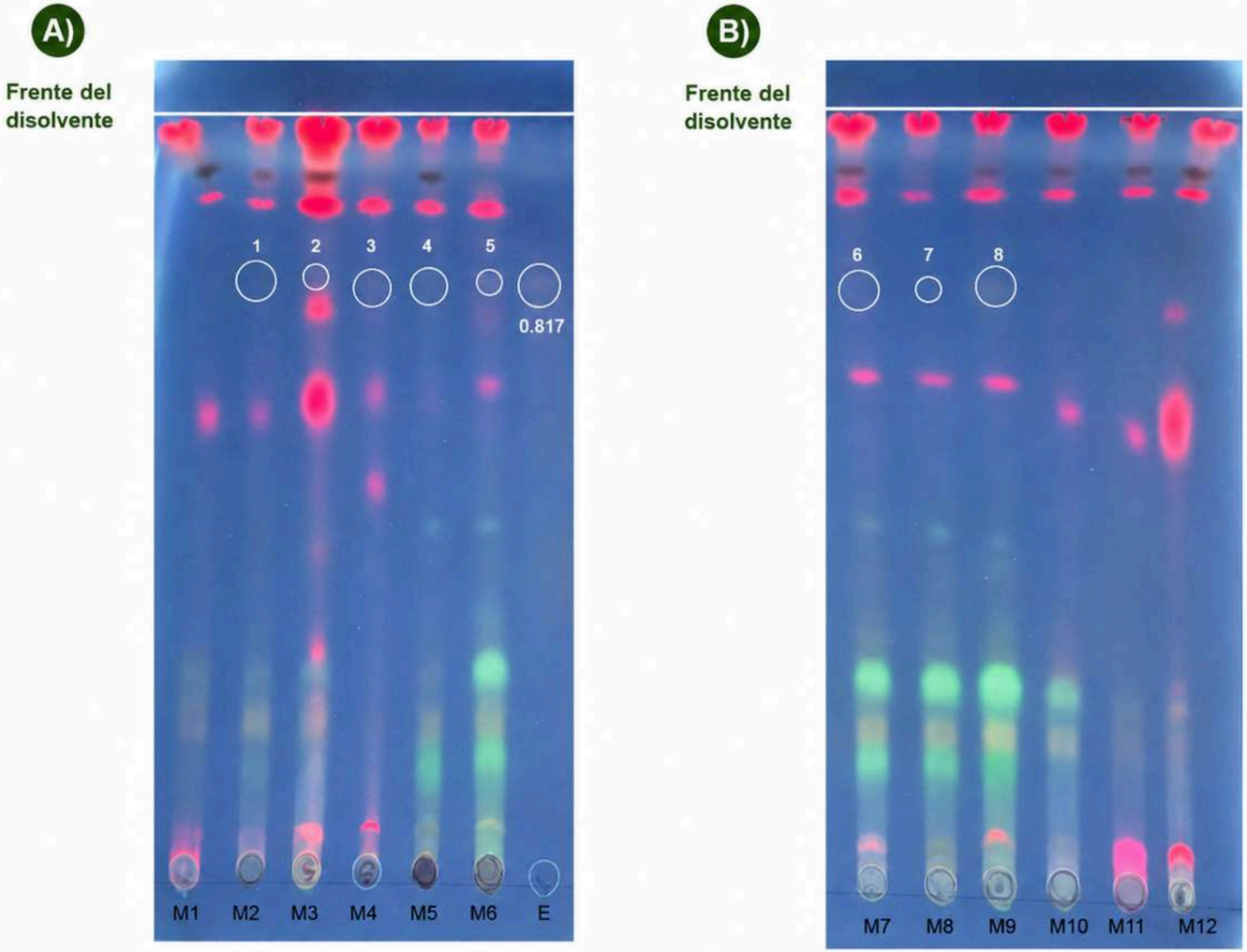
$$Rf = \frac{Distancia\ recorrida\ por\ el\ compuesto\ desde\ la\ línea\ base}{Distancia\ recorrida\ por\ el\ frente\ del\ solvente\ desde\ la\ línea\ base}$$

Rf_estándar

$$RF = \frac{13{,}9}{17} = 0{,}817$$

(López et al., 2005; Kowalska & Sajewicz, 2022).

Placa de TLC correspondiente a las muestras de helecho maduro bajo luz UV

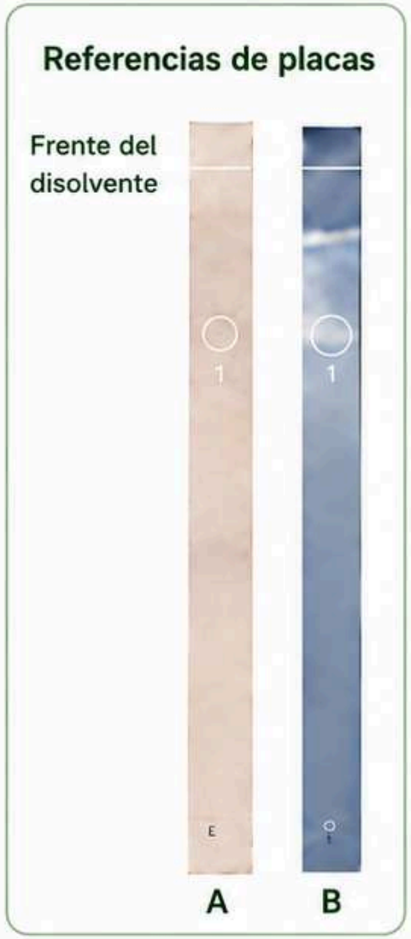


Bajo luz UV, las frondas maduras presentaron 8 bandas compatibles con Pterosina A, con un valor Rf= 0,817

8 muestras con bandas compatibles

(Kowalska & Sajewicz, 2022; EDQM, 2023).

Placa de TLC correspondiente a las muestras de helecho inmaduro







En luz visible, las frondas maduras mostraron una respuesta cromática tenue y de baja definición.

Rf

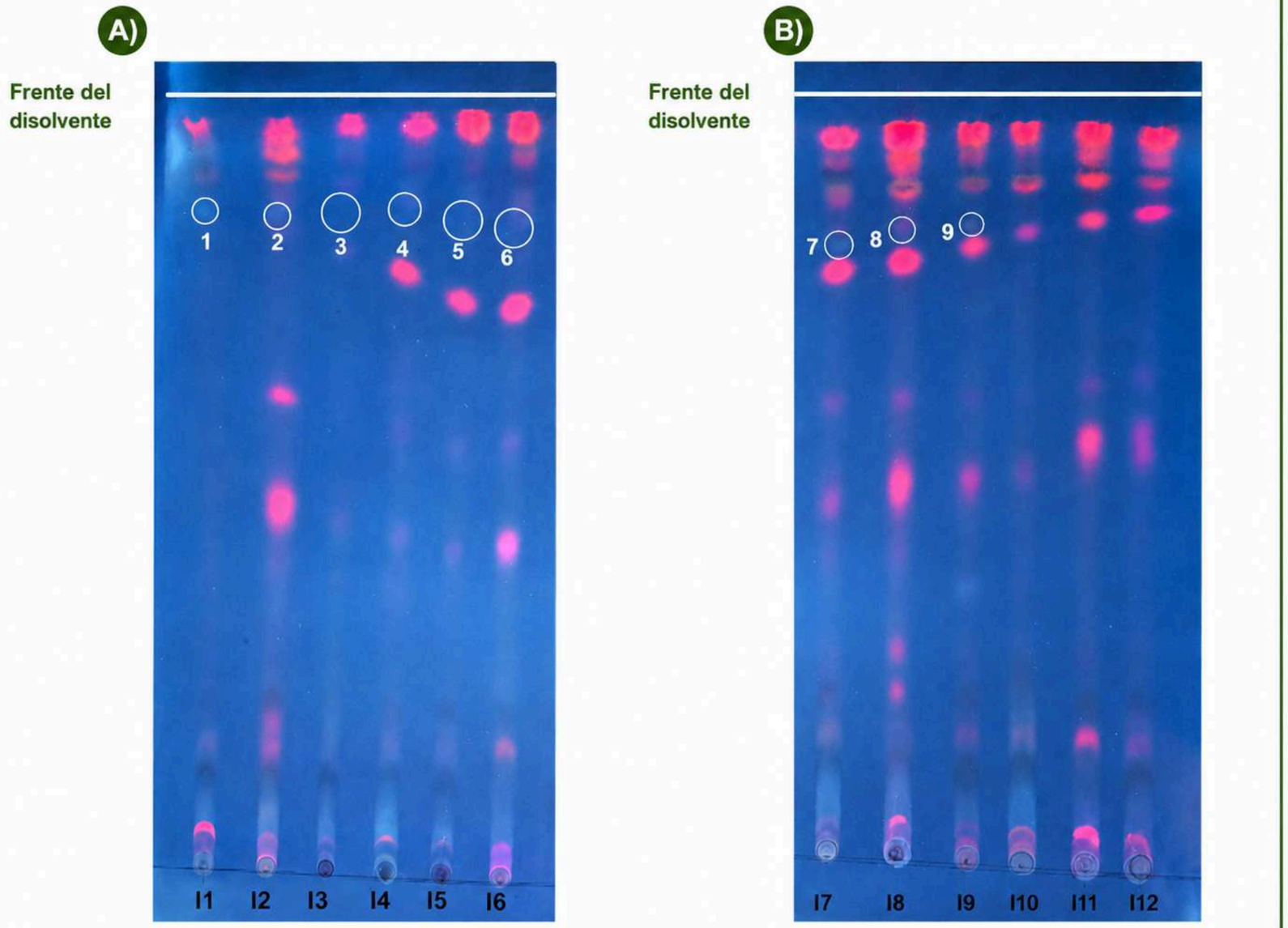
$$Rf = \frac{Distancia\ recorrida\ por\ el\ compuesto\ desde\ la\ línea\ base}{Distancia\ recorrida\ por\ el\ frente\ del\ solvente\ desde\ la\ línea\ base}$$

Rf_estándar

$$RF = \frac{13{,}9}{17} = 0{,}817$$

(López et al., 2005; Kowalska & Sajewicz, 2022).

Placa de TLC correspondiente a las muestras de helecho inmaduro

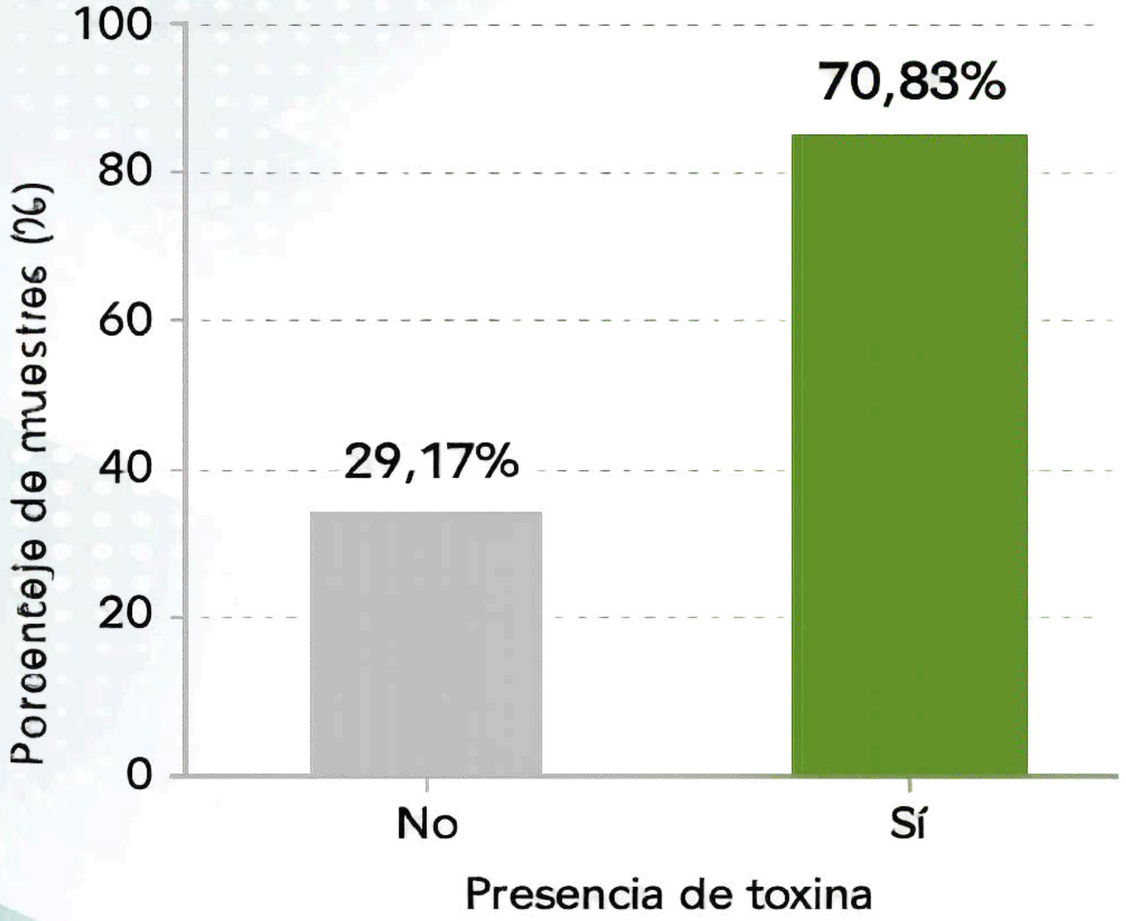


Bajo luz UV, las frondas imaduras presentaron más bandas compatibles con Pterosina A, lo que sugiere una mayor presencia relativa en este estado fenológico.

9 muestras con bandas compatibles

(López et al., 2005; Kowalska & Sajewicz, 2022).

Frecuencia de presencia de pterosina A

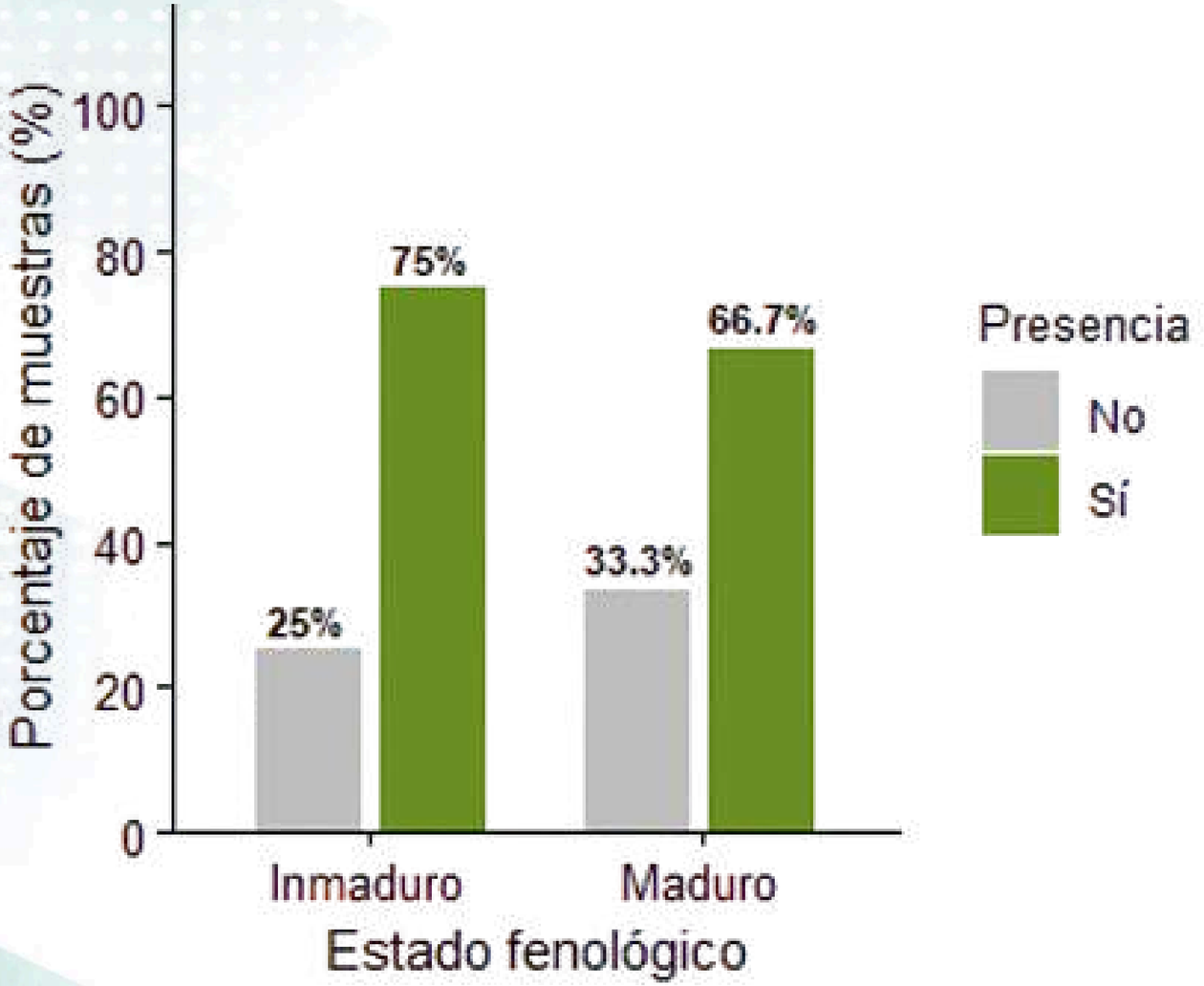


Presencia	Número de muestras (n)	Porcentaje (%)
No	7	29,17%
Sí	17	70,83%
Total	24	100%

De las 24 muestras analizadas. el **70,83%** presentó bandas compatibles con Pterosina A

(Cope, 2025; Guaraca, 2020, Ribeiro et al., 2020, Zaccone et al., 2014)

Presencia de pterosina A según estado fenológico



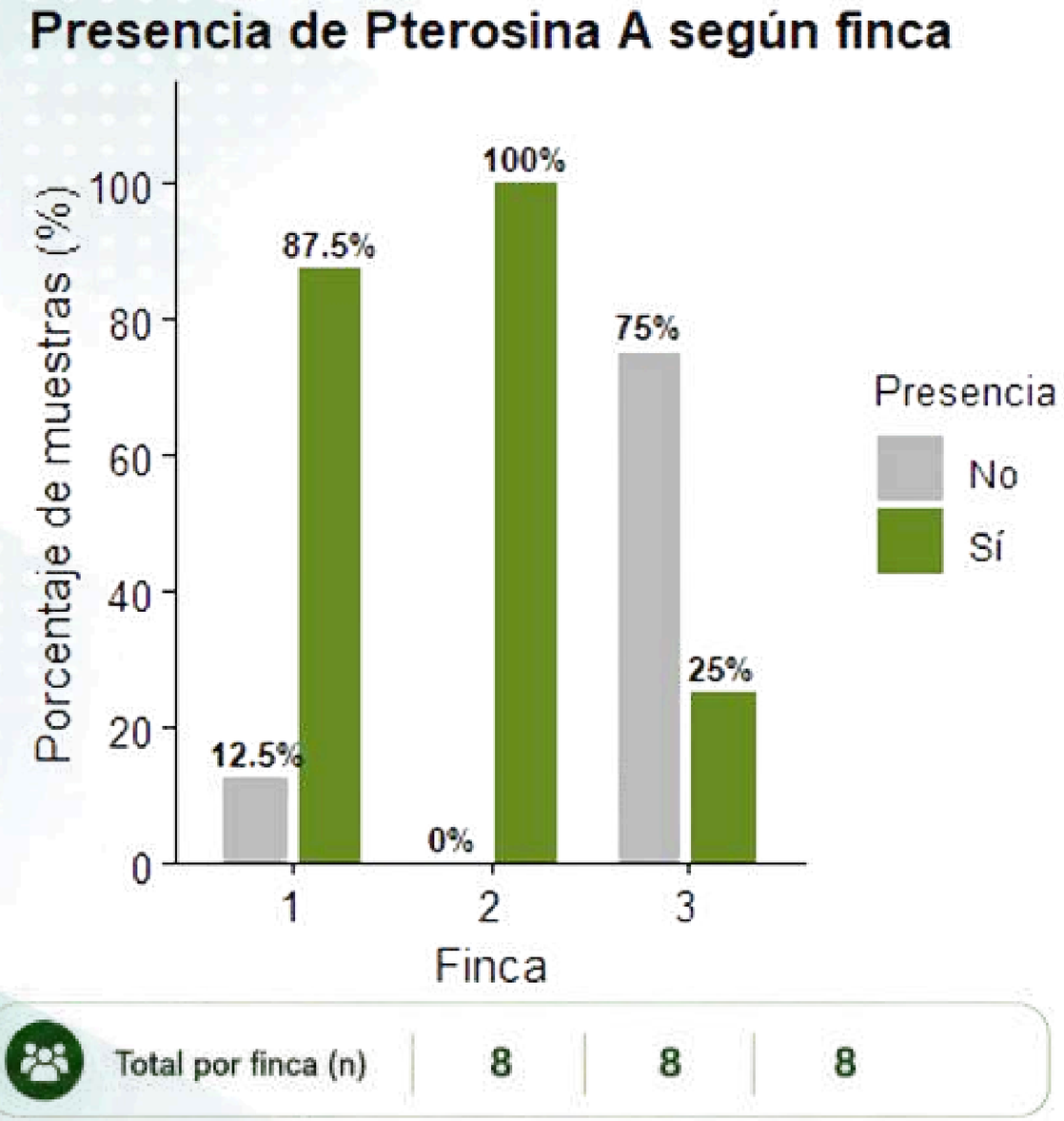
Prueba de Fisher-Freeman-Halton.
(p= 1,000) > 0,05

No significativo

Existe una tendencia descriptiva compatible con una mayor detección en frondas inmaduras, pero no se demostró una asociación estadísticamente significativa.

(Alonso et al., 1995; Rasmussen & Hansen 1995; Ribiero et al., 2020).

Presencia de pterosina A según finca



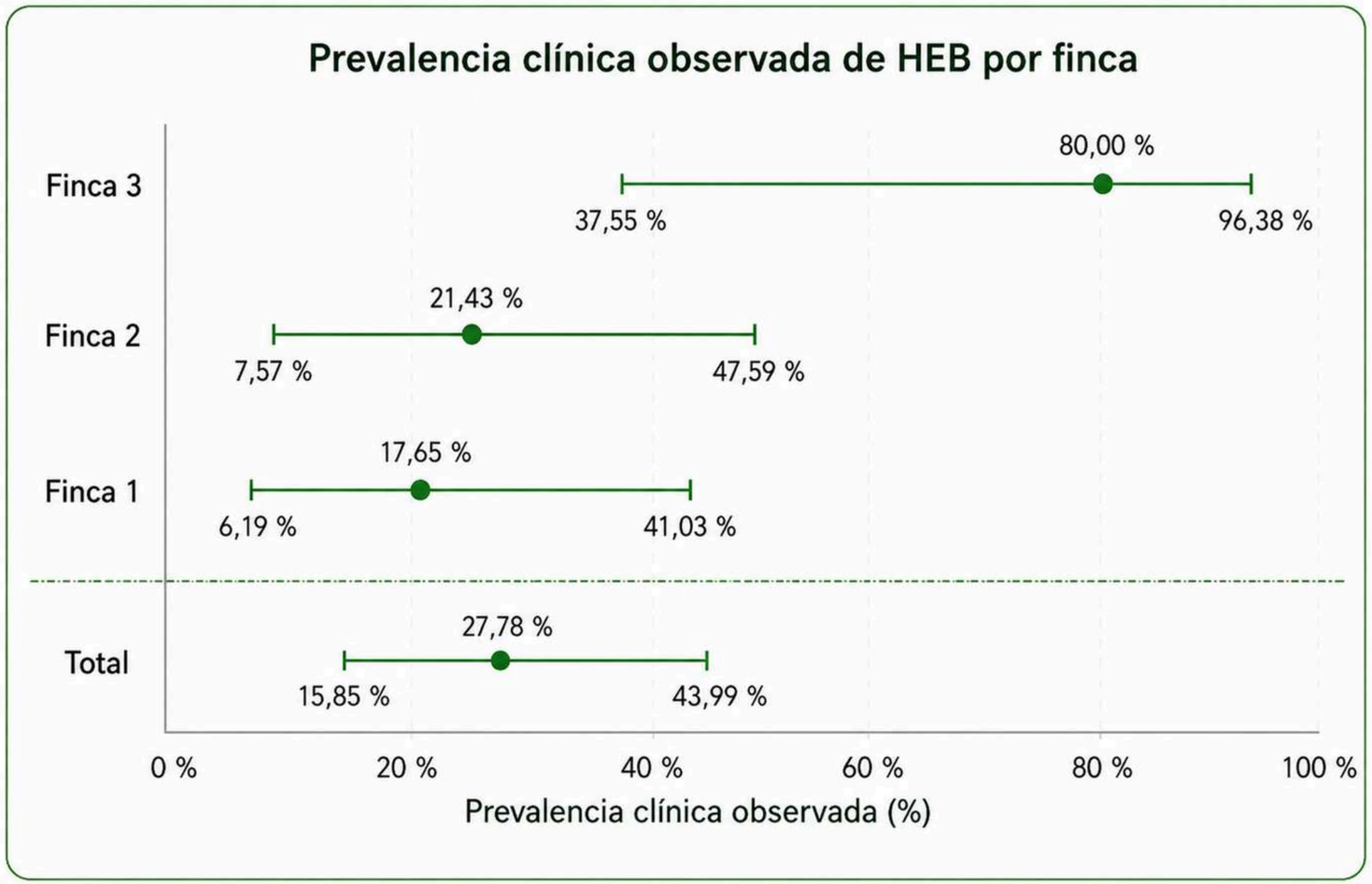
Finca	No n (%)	Sí n (%)	Total n
1	1 (12,5%)	7 (87,5%)	8
2	0 (0%)	8 (100%)	8
3	6 (75%)	2 (25%)	8
Total	**7 (29,17%)**	**17 (70,83%)**	**24**

Prueba de Fisher-Freeman-Halton.
(p= 0,00395) < 0,05

Asociación significativa

(Alonso et al., 1995; Rasmussen & Hansen 1995; Ribiero et al., 2020).

Correlacionar la presencia de toxinas en el helecho macho *Pteridium aquilinum* (L.) Khun



Grupo	Casos/ Examinados	Prevalencia (%)	IC de Wilson 95% (%)
Finca 1	3/17	17,65 %	6,19–41,03 %
Finca 2	3/14	21,43 %	7,57–47,59 %
Finca 3	4/5	80,00 %	37,55–96,38 %
Total	**10/36**	**27,78 %**	**15,85–43,99 %**

Prueba de Fisher-Freeman-Halton.

p= 0,0261

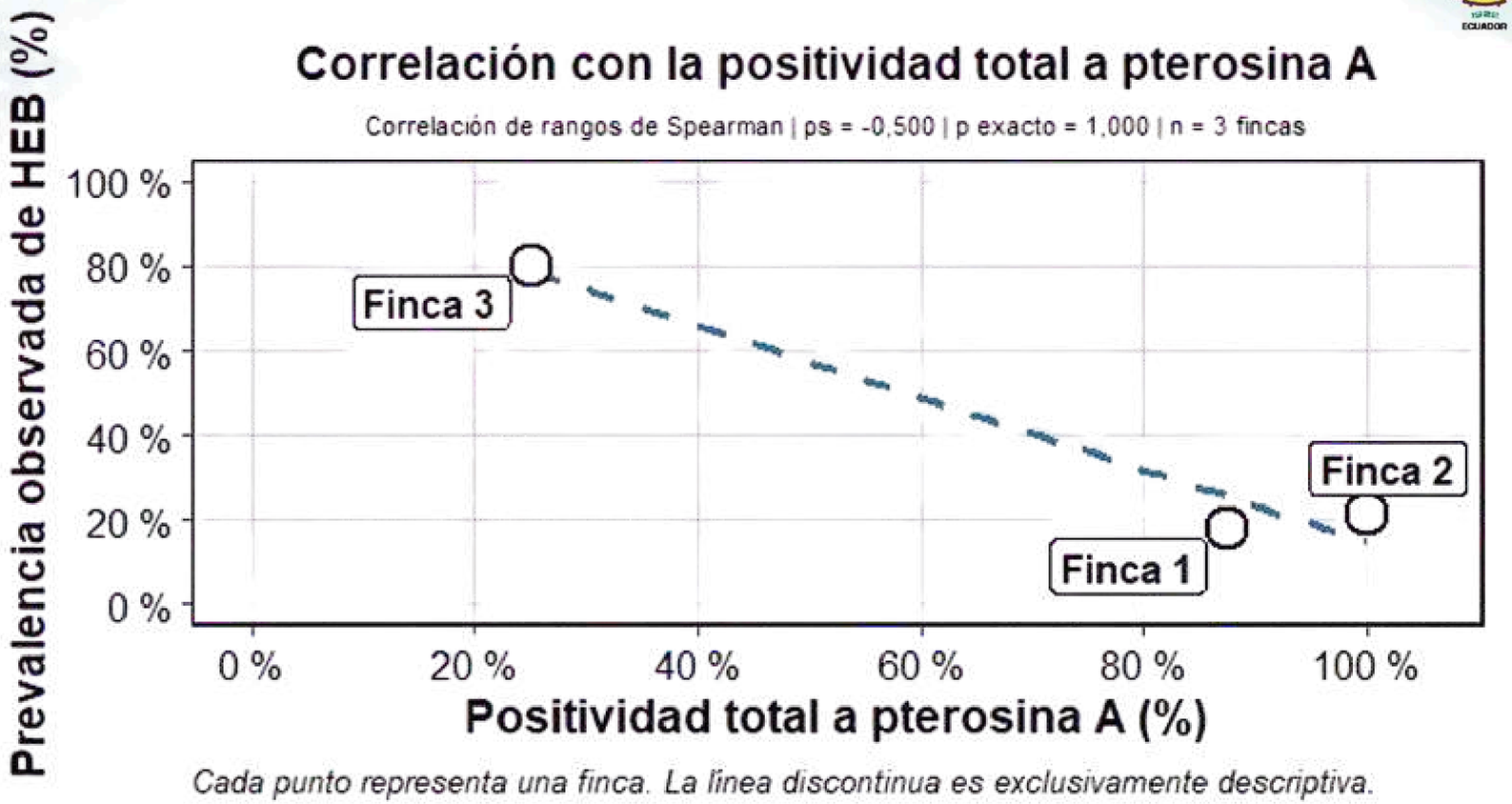
p< 0,05

Hay diferencia significativa entre fincas

Nota. Gráfico de intervalos de confianza de Wilson al 95%

(Mejía & Malo, 2020; Sánchez et al., 1999).

Correlación con la positividad total a Pterosina A



Análisis	ρs	p exacto	Conclusión
Inmaduras	-0,866	0,667	No significativo
Maduras	-0,500	1,000	No significativo
Total	**-0,500**	**1,000**	**No significativo**

No se encontró evidencia estadisticamente suficiente para demostrar una correlación entre la positividad a pterosina A y la prevalencia clínica de HEB

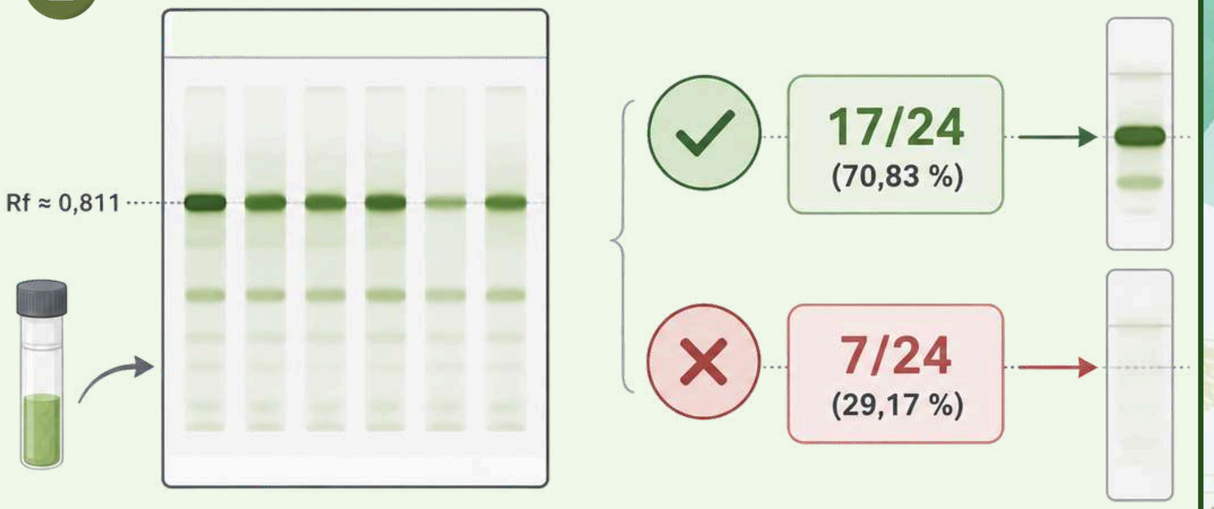
(Mejía & Malo, 2020; Sánchez et al., 1999).

5. Conclusiones

1

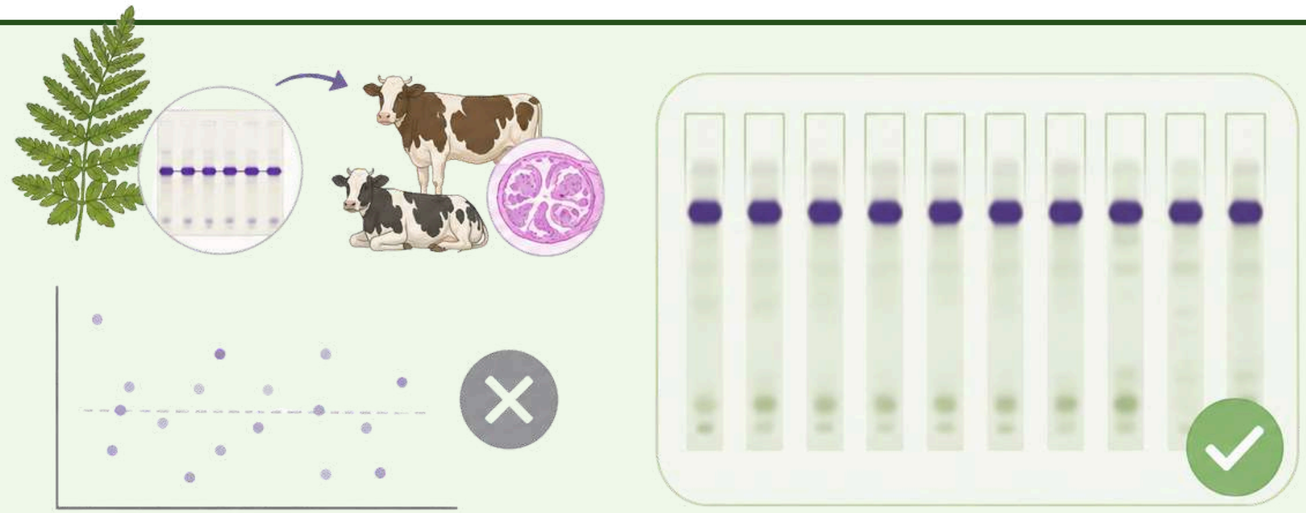


2



Se logró demostrar, que existe una alta frecuencia de detección de bandas compatibles en las muestras vegetales analizadas.

3



(Realizado por Villarroel, C. en Biorrender 2026).

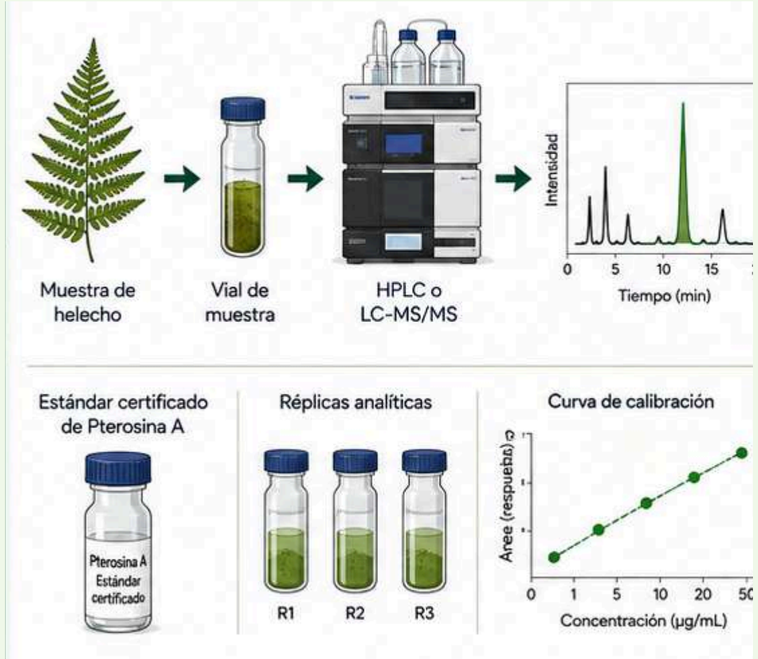
6. Recomendaciones

1 Comparar frondas maduras e inmaduras



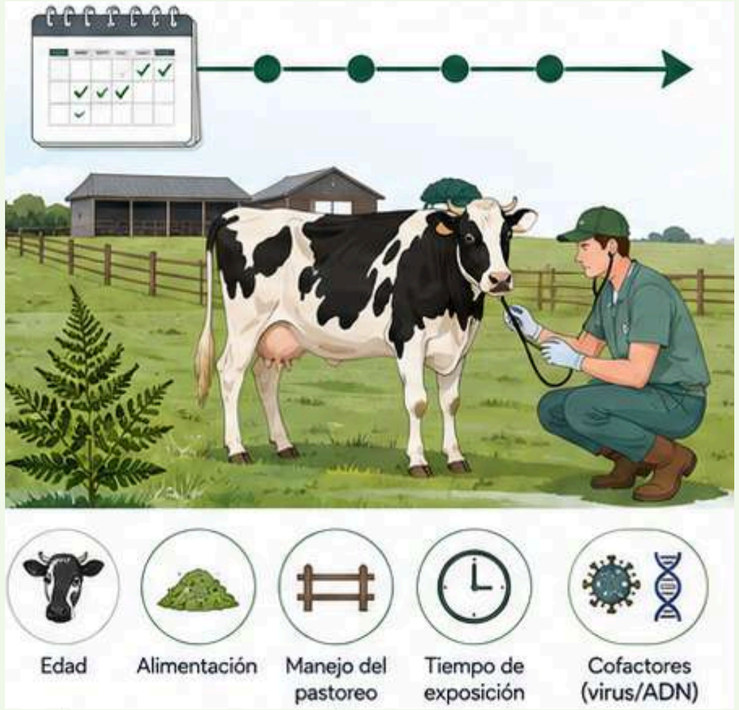
Longitud, número de pínnulas y cantidad de soros

2 Confirmar y cuantificar la Pterosina A



- Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia
- Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas

3 Realizar seguimiento longitudinal en las fincas



7. Agradecimientos













ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Vinculación ESPE

CENCINAT
Centro de Nanociencia y Nanotecnologia

Ikiam
Universidad Regional Amazónica

VACAS GALINDO
Pueblo solidario y progresista

Alexis Debut, PhD
Ing. Geovanna Arroyo
Ing. Katherine Garay, Mgtr
Dra.Blanco Naranjo
Ing. Wilson Navas
Ing. Tatiana Páez, Mgtr
Gabriela Salazar, PhD