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 Cuellaje.

Hernández Landazuri Esmeda Teodora

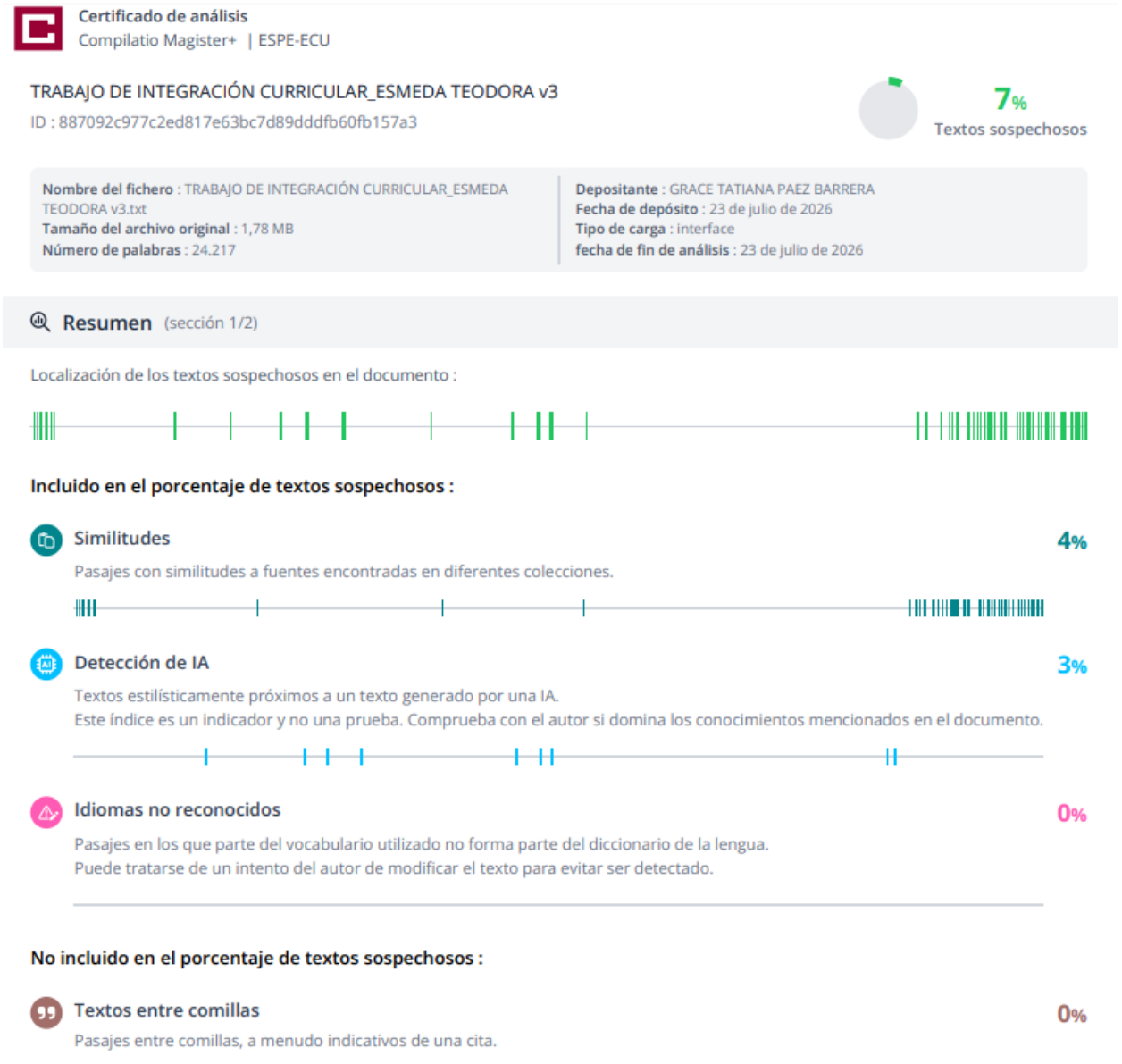
Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniera Biotecnóloga

Ing. Agr. Páez Barrera Grace Tatiana M Sc.

05 de agosto de 2026



Certificado de análisis
Compilatio Magister+ | ESPE-ECU

TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR_ESMEDA TEODORA v3
ID : 887092c977c2ed817e63bc7d89dddfb60fb157a3

7%
Textos sospechosos

Nombre del fichero : TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR_ESMEDA TEODORA v3.txt
Tamaño del archivo original : 1,78 MB
Número de palabras : 24.217

Depositante : GRACE TATIANA PAEZ BARRERA
Fecha de depósito : 23 de julio de 2026
Tipo de carga : interface
fecha de fin de análisis : 23 de julio de 2026

Resumen (sección 1/2)

Localización de los textos sospechosos en el documento :

Incluido en el porcentaje de textos sospechosos :

Similitudes 4%
Pasajes con similitudes a fuentes encontradas en diferentes colecciones.

Detección de IA 3%
Textos estilísticamente próximos a un texto generado por una IA.
Este índice es un indicador y no una prueba. Comprueba con el autor si domina los conocimientos mencionados en el documento.

Idiomas no reconocidos 0%
Pasajes en los que parte del vocabulario utilizado no forma parte del diccionario de la lengua.
Puede tratarse de un intento del autor de modificar el texto para evitar ser detectado.

No incluido en el porcentaje de textos sospechosos :

Textos entre comillas 0%
Pasajes entre comillas, a menudo indicativos de una cita.

Validar únicamente en FirmaEC.
Firmado electrónicamente por:
GRACE TATIANA PAEZ BARRERA

Ing. Agr. Páez Barrera Grace Tatiana M Sc.

Directora

CC: 1710134626

Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular: "**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 Cuellaje**" fue realizado por la señorita **Hernández Landazuri Esmeda Teodora,** el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE; habiéndose efectuado una revisión integral de forma y de fondo conforme a los lineamientos y formatos institucionales vigentes. Además, fue revisado y analizada en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 19 de agosto de 2026

.

Validar únicamente en FirmaEC.
Firmado electrónicamente por:
GRACE TATIANA PAEZ BARRERA

MSc. Páez Barrera Grace Tatiana

Directora del proyecto de integración curricular

C.C.: 1710134626

Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo **Hernández Landazuri Esmeda Teodora**, con cédula/cédulas de ciudadanía n° 1726272238, declaro/declaramos que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular**: 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 Cuellaje** es de mi/nuestra autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 19 de agosto de 2026

Validar únicamente en FirmaEC.
Firmado electrónicamente por:
ESMEDA TEODORA
HERNANDEZ LANDAZURI

Hernández Landazuri Esmeda Teodora

C.C.: 1726272238

Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo **Hernández Landazuri Esmeda Teodora**, con cédula/cédulas de ciudadanía Nro. 1726272238, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **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 Cuellaje,** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 19 de agosto de 2026

Validar únicamente en FirmaEC.
Firmado electrónicamente por:
ESMEDA TEODORA
HERNANDEZ LANDAZURI

Hernández Landazuri Esmeda Teodora

C.C.: 1726272238

Dedicatoria

Dedico mi tesis principalmente a Dios porque él ha sido mi guía, mi sustento y todo lo que he logrado ha sido gracias a él. A mi madre María Margarita Landazuri Plaza por confiar en mis sueños incluso más que yo, por ser esa mujer resiliente que con su ejemplo me enseñó a no rendirme, ni achicopalarme por nada, a mis hermanos Mayra, Jhonatan, Damián y Daniel por que en cada uno de ustedes encontré una enseñanza, un consejo o un motivo para seguir en este camino.

Agradecimiento

Quiero empezar agradeciendo a Dios por darme la sabiduría, amor incondicional y fortaleza para seguir, en los momentos de incertidumbre y tribulación él estuvo conmigo manifestándose incluso en los últimos momentos. Durante este proceso me he sentido acompañada por él. A mi madre Margarita Landazuri por ser mi apoyo incondicional, por motivarme a seguir incluso cuando ya me quería rendir. A mi padre Adolfo Hernández por siempre brindare una palabra de apoyo. A mis hermanos Mayra, Jonathan, Damián y Daniel por acompañarme en cada etapa de este proceso, llevo un pedacito de cada uno ellos en mí.

A lo largo de este camino tuve el honor de conocer personas extraordinarias y excelentes profesionales que, con su calidad humana, conocimientos y generosidad, dejaron una huella significativa en mi a nivel personal y profesional. Mi más sincero agradecimiento a mi tutora de tesis Doc. Taty quien, con su apoyo, paciencia y disposición, hizo que este proceso sea más llevadero, gracias por inspirar y ser ejemplo. Quiero agradecer también a todos los profesores que estuvieron guiándonos en este proyecto con criterios, espacios y su buena disposición.

A los amigos que me regaló la universidad Meli, Vane, Leo y Cielle con los que compartí días sin dormir por estudiar, gracias hacer de este viaje más llevadero, las risas, las palabras de ánimo, por su apoyo. A mis amigas de siempre: Dennice, Emilia, Rose, Génesis y Karolay por sostenerme en momentos difíciles, por escucharme y animarme siempre, me alegro que sigan formando parte de mi vida. A mi gatita Dakota quien ha demostrado ser mi fiel compañera, acompañándome en las madrugadas

Índice de Contenidos

Certificación.....3

Responsabilidad de Autoría.....4

Dedicatoria.....6

Agradecimiento.....7

Resumen.....15

Abstract.....16

Capítulo I.....17

1. Introducción.....17

1.2 Planteamiento del problema.....17

1.3 Formulación del problema o pregunta de investigación.....20

1.4 Objetivos.....20

1.4.1 Objetivo general:.....20

1.4.2 Objetivos específicos:.....20

1.5 Justificación.....20

Capítulo II.....22

2.1 Estado del arte.....22

2.1.1 Investigaciones sobre la distribución y ecología de *Pteridium aquilinum* (L). Kunh.....22

2.1.2 Investigaciones sobre las toxinas presentes en el helecho macho.....23

2.1.3 Investigaciones sobre la relación de Hematuria enzoótica bovina (HEB) y el consumo de helecho....28
2.1.4 Investigaciones sobre métodos de control y manejo del helecho....30
2.2 Marco teórico....31
2.2.1 *Pteridium aquilinum* (L). Kunh....31
2.2.2 Descripción botánica....31
2.2.3 Taxonomía....32
2.2.4 Ciclo Biológico de los helechos....33
2.2.5 Composición química....34
2.2.6 Toxicidad en la planta....35
2.2.7 Ptaquilósido....35
2.2.8 Caudatósido y ptesculentósido....38
2.2.9 Tiaminasas....40
2.2.10 Prunasina....41
2.2.11 Hematuria enzoótica bovina....43
2.2.12 Cromatografía en capa fina (TLC)....46
2.3 Marco conceptual....47
Capítulo III....52
3.1 Metodología....52
3.1.1 Enfoque de investigación....52
3.1.2 Tipo y diseño de investigación....52
3.2 Población y muestra....53

3.2.1 Área de estudio 53

3.2.2 Población.....56

3.2.3 Muestra 56

3.3 Técnica e instrumento.....57

3.3.1 Recolección de las muestras.....57

3.3.2 Codificación y transporte de muestras.....58

3.3.3 Caracterización botánica 59

3.3.4 Secado del material vegetal.....60

3.3.5 Molienda.....60

3.3.6 Macerado 61

3.3.7 Concentración del extracto etanólico.....62

3.3.8 Eliminación de Clorofila 63

3.3.9 Hidrólisis básica.....64

3.3.10 Cromatografía en capa fina (TLC) 65

3.3.11 Análisis estadístico.....66

3.4 Consideraciones éticas.....66

Capítulo IV 68

Análisis y discusión de los resultados 68

4.1 Caracterización Botánica del Helecho *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn.....68

4.2 Evaluación de la presencia de toxinas en *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn 74

4.3 Correlación entre la presencia de HEB y las toxinas presentes en *Pteridium aquilinum* (L.) Kunh.....85

Capítulo V 89

5.1 Conclusiones 89

5.2 Recomendaciones 90

5.3 Referencias 91

Índice de figuras

Figura 1 Morfología y sección transversal del helecho del género *Pteridium*.....32

Figura 2 Ciclo de vida del helecho (Pteridophyta). 34

Figura 3 Estructura química del ptaquilósido.....36

Figura 4 Mecanismo de activación del ptaquilósido y su interacción con el ADN. 37

Figura 5 Glucósidos de tipo illudano encontrados en *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn y sus respectivas pterosina.....39

Figura 6 Mecanismo de acción de la tiaminasa I. 41

Figura 7 Degradación enzimática de la prunasina y liberación de (HCN). 42

Figura 8 Rutas de exposición del ptaquilósido desde *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn. 44

Figura 9 Interacción entre el ptaquilósido y el BPV-4 en la progresión de papiloma a carcinoma. 46

Figura 10 Ubicación geográfica de los sitios de muestreo de *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn....55

Figura 11 Muestreo de ejemplares de *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn en campo. 57

Figura 12 Resumen visual de la caracterización botánica 59

Figura 13 Proceso de molienda del material vegetal 61

Figura 14 Maceración etanólico de las muestras de *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn 62

Figura 15 Etapa de concentración del extracto etanólico de helecho macho mediante una corriente de nitrógeno. 63

Figura 16 Etapa de eliminación de clorofila mediante una extracción líquido-líquido utilizando un embudo de decantación. 64

Figura 17 Desarrollo y revelado cromatográfico de los extractos del helecho macho mediante TLC.....65

Figura 18 Caracterización macroscópica de la superficie abaxial y abaxial de una lámina de *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn 68

Figura 19 Caracterización estereoscópica del revés de *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn en una fronda inmadura. 69

Figura 20 Caracterización estereoscópica del revés de *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn en una fronda madura. 71

Figura 21 Caracterización microscópica de esporangios de *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn en estados fenológicos inmaduro y maduro. 72

Figura 22 Perfil cromatográfico de los extractos de frondas inmaduras de *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn observado bajo la luz visible. 75

Figura 23 Perfil cromatográfico de los extractos de frondas inmaduras de *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn observado bajo la luz UV de onda larga. 76

Figura 24 Perfil cromatográfico de los extractos de frondas maduras de *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn observado bajo la luz visible. 79

Figura 25 Perfil cromatográfico de los extractos de frondas maduras de *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn observado bajo la luz UV lejana. 80

Figura 26 Gráfico de barras apiladas y estratificado por fincas de Cuellaje según el estado fenológico de las muestras de las frondas de *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn 81

Figura 27 Relación entre la prevalencia de HEB y la posible presencia de pterosina A**.** 87

Índice de Tablas

Tabla 1 Clasificación taxonómica de *Pteridium aquilinum* (L). Kuhn....32

Tabla 2 Coordenadas Geográficas de los puntos de muestreo. 54

Tabla 3 Sistema de codificación utilizado durante todo el estudio para las muestras de helecho macho....58

Tabla 4 Variación de masa en muestras de *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn durante el proceso de secado según el estado fenológico. 74

Tabla 5 Detección presuntiva de Pterosina A enfrondas inmaduras de *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn. 78

Tabla 6 Detección presuntiva de Pterosina A enfrondas inmaduras de *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn 80

Tabla 7 Distribución de vacas muestreadas y casos de posible HEB según la finca 85

Tabla 8 Correlación ecológica entre la prevalencia observada de HEB y la presencia aparente de pterosina A en *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn 86

Resumen

Pteridium aquilinum (L.) Kuhn es una planta vascular inferior conocida como helecho águila por la forma de sus hojas o helecho macho en Ecuador. Esta especie está ampliamente distribuida en el mundo y ha sido estudiada por gran capacidad de reproducción y el contenido de toxinas, principalmente glucósidos de tipo illudano como ptaquilósido, caudatósido y ptesculentósido. El consumo de este helecho por parte del ganado bovino se lo relaciona con la incidencia de la enfermedad crónica llamada hematuria bovina enzoótica (HEB), que le causa lesiones neoplásicas en la vejiga, provocando la orina con sangre y pérdida de peso del ganado bovino. El objetivo del estudio fue evaluar la presencia de compuestos tóxicos en frondas de helecho que varían en el estado fenológico: maduro e inmaduros recolectados de tres fincas lecheras ubicadas en la parroquia rural de Cuellaje, cantón Cotacachi, provincia de Imbabura, así como, relacionar la presencia de la toxina con la prevalencia de HEB en esta zona de estudio. Se analizaron muestras vegetales, en dos estados fenológicos, hojas maduras e inmaduras. Las plantas colectadas fueron caracterizadas anatómica, morfológicamente y taxonómicamente a nivel macroscópico, estereoscópico y microscópico, determinando que los helechos colectados pertenecen al género *Pteridium*, especie *aquilinum*. Las muestras vegetales colectadas en campo, fueron posteriormente procesadas en laboratorio, y finalmente analizadas mediante cromatografía en capa fina (TLC), dando como resultado que el 75% de las muestras de frondas inmaduras presentaron compatibilidad con la del estándar de pterosina A que es un producto de degradación del caudatósido, mientras que las muestras de frondas maduras obtuvieron una señal compatible del 41.67%. En las tres fincas estudiadas se observó una prevalencia del 0% en la finca 1, 10% en la finca 2 y 13,64% en la finca 3. Para evaluar una correlación entre HEB y las señales compatibles se ocupó coeficientes de rangos de Pearson y de Spearman, con los cuales se determinó una correlación no significativa.

Palabras clave: Pteridium aquilinum (L.) Kuhn*, Caudatósido. Hematuria enzoótica bovina, ingestión prolongada, bovino.*

Abstract

Pteridium aquilinum (L.) Kuhn is a lower vascular plant known as the eagle fern due to the shape of its fronds, or as the “male fern” in Ecuador. This species is widely distributed throughout the world and has been studied for its high reproductive capacity and toxin content, primarily illudane-type glycosides such as ptaquiloside, caudatoside, and ptesculentoside. Consumption of this fern by cattle is associated with the incidence of a chronic disease called enzootic bovine hematuria (EBH), which causes neoplastic lesions in the bladder, leading to bloody urine and weight loss in cattle. The objective of the study was to evaluate the presence of toxic compounds in fern fronds at different phenological stages mature and immature collected from three dairy farms located in the rural parish of Cuellaje, Cotacachi canton, Imbabura province, as well as to correlate the presence of the toxin with the prevalence of EBH in this study area. Plant samples were analyzed in two phenological stages: mature and immature leaves. The plant samples collected in the field were subsequently processed in the laboratory and finally analyzed using thin-layer chromatography (TLC), revealing that 75% of the immature frond samples showed compatibility with the pterosin A standard, which is a degradation product of caudatoside, while the mature frond samples showed a 41.67% match. Among the three farms studied, the prevalence was 0% at Farm 1, 10% at Farm 2, and 13.64% at Farm 3. To evaluate a correlation between EHB and the compatible signals, Pearson’s and Spearman’s rank correlation coefficients were used, which revealed a non-significant correlation.

Keywords: Pteridium aquilinum (L.) Kuhn, caudatoside; enzootic bovine hematuria, prolonged ingestion, cattle.

Capítulo I

1. Introducción

1.2 Planteamiento del problema

A nivel mundial, los sistemas de producción ganadera son fundamentales en el sector alimentario y económico. Según Henchion *et al.* (2021), satisfacer la demanda creciente de proteína animal y lácteos, especialmente de bovinos, dentro de los límites ambientales representa un gran desafío; asimismo, lograr una ganadería sostenible no resulta nada fácil, debido a las altas demandas nutricionales que requiere el ganado y a las marcadas diferencias de consumo entre las distintas regiones del mundo. En este sentido, países como Ecuador representan un papel importante dentro del área lechera en América Latina ya que es uno de los principales productores de leche, donde el 80% de su producción se concentra en pequeñas fincas familiares ubicadas en la región andina. A pesar de su importancia a nivel económico, estos sistemas productivos poseen algunas limitaciones como el manejo inadecuado de los recursos, el exceso de mano de obra y la limitada optimización del uso de zonas forrajeras, lo que evidencia la necesidad de mejorar la práctica productiva tratando de mantener un enfoque sostenible (Torres-Inga, Aguirre-de Juana, Guevara-Viera, Alvarado-Dávila, & Guevara-Viera, 2025). Esta realidad se ve reflejada en múltiples zonas rurales, como Cuellaje, ubicada en Intag, Imbabura, donde predominan sistemas ganaderos a pequeña escala que enfrentan condiciones productivas similares, lo que podría influir en la exposición del ganado a factores de riesgo presentes en el entorno.

Uno de los grandes desafíos de los sistemas ganaderos es la disponibilidad de forraje, especialmente durante la época seca, donde la ausencia de lluvia hace que la oferta de pastos disminuya significativamente. Esta escasez hace que el ganado empiece a consumir mayor diversidad de especies vegetales presentes en el pastizal y sus alrededores, entre las cuales pueden estar presentes plantas arvenses muchas de ellas tóxicas, representando un riesgo

para la salud del animal, la baja productividad, y posterior muerte del animal. En este contexto, autores como Diaz (2011) menciona que los sistemas ganaderos extensivos típicos en países tropicales como el Ecuador, con presencia de una alta biodiversidad, la probabilidad de que el ganado consuma plantas tóxicas aumenta. Asimismo, varios estudios mencionan la falta de caracterización y estudios toxicológicos de las malezas o arvenses, y los casos de intoxicación como el que causa el helecho macho están subestimados, y los efectos ambientales y socio económicos en poblaciones rurales de agricultura de subsistencia son cada vez un problema complejo en el país.

Las plantas tóxicas presentes en sistemas de pastoreo contienen metabolitos secundarios y toxinas que pueden causar múltiples efectos adversos en la salud animal afectando a distintos órganos y sistemas incluyendo el sistema digestivo, hepático, nervioso, hematológico y urinario, dependiendo del tipo de compuesto. Las alteraciones generadas por estos compuestos tóxicos pueden ir desde leves hasta cuadros crónicos y degenerativos comprometiendo el bienestar y la salud del animal; como consecuencia, se observa una disminución en la producción de leche, pérdida de peso y eficiencia de reproducción (Abera, Jibat, Sori, Feyisa, & Beyene, 2014).

Dentro de este grupo de plantas se encuentra *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn comúnmente conocido como helecho macho o helecho águila, que destaca por contener un complejo perfil de toxinas. Es una planta altamente distribuida a nivel mundial, encontrándose en todos los continentes. Según Vetter (2009) esta especie posee una distribución cosmopolita, encontrándose desde regiones ecuatoriales hasta zonas subárticas de América del Norte y Europa. Se extiende por Europa, Asia Central, China, Japón, América del Sur, adaptándose rápidamente a una gran variedad de tipos de suelo y condiciones medioambientales. Su amplia distribución está directamente relacionada con su alta capacidad de reproducción mediante esporas, ya que cada planta puede liberar millones de esporas, las cuales son de fácil

dispersión por el viento y ambientes favorables. Además, esta planta tiene la capacidad de reproducirse de manera vegetativa a través de sus rizomas subterráneos (Marrs & Watt, 2006).

En Ecuador, los helechos del género *Pteridium* presentan una importante distribución, especialmente en zonas andinas donde el ser humano ha intervenido en los bosques. El helecho macho ha sido una de las malezas más agresivas en el área del pastoreo. La colonización rápida del helecho se ha dado principalmente por áreas perturbadas por incendios lo cual está estrechamente relacionado con prácticas agrícolas tradicionales basadas en la quema periódica de vegetación y las actividades ganaderas (Roos, 2010).

Autores como Fernández & Sierra (2022) subrayan que el helecho macho posee toxinas que han despertado interés debido a que pueden producir tanto en animales como humanos efectos adversos; entre los metabolitos tóxicos más importantes se encuentran el ptaquilósido, sustancias antiaminas. prunasina; las cuales afectan a la salud del animal. Por ejemplo, el ptaquilósido suele estar asociado a efectos carcinógenos y enfermedades crónicas como la hematuria enzoótica bovina (HEB) debido a que puede generar daño a nivel genético, ya que puede formar aductos de ADN.

La hematuria enzoótica bovina es una enfermedad crónica de gran importancia veterinaria que genera pérdidas económicas y está asociada al consumo prolongado de *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn, esta enfermedad ha sido reportada principalmente en sistemas ganaderos extensivos, donde el ganado consume el helecho durante largos períodos de tiempo, especialmente en épocas de sequía (Cortinovis & Caloni, 2013). Esta enfermedad se caracteriza por causar hemorragias, anemia, pérdida de peso y desarrollo de neoplasias vesicales, asociados principalmente al consumo prolongado del helecho macho, que contiene sustancias tóxicas (Scala, Ortiz, Catinaud, & Lemberger, 2014).

1.3 Formulación del problema o pregunta de investigación

- ¿Cuáles son las características botánicas en el helecho macho (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn) en la zona de Cuellaje?
- ¿Existe alguna diferencia significativa entre los estados fenológicos maduros e inmaduro del helecho macho (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn), recolectado en fincas lecheras con alta incidencia de hematuria enzoótica bovina (HEB) en la parroquia de Cuellaje?
- ¿Existe alguna correlación entre la presencia de toxinas en el helecho macho y la incidencia de la hematuria enzoótica bovina?

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general:

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 Cuellaje.

1.4.2 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 Cuellaje.

1.5 Justificación

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (2026), la ganadería es un pilar fundamental para la seguridad alimentaria, la nutrición y el

alivio de la pobreza, ya que muchas personas dependen de esta forma de producción. El sector provee alimentos ricos en proteínas muy importantes para la nutrición de la humanidad, genera ingresos y empleo. En Ecuador, la ganadería constituye uno de los pilares económicos y productivos más importantes del país, ya que abastece mayor parte de la demanda interna de leche, carne y derivados lácteos. Además, es una fuente de ingresos para muchas familias, especialmente en zonas rurales del país, como Cuellaje. La producción lechera ganadera genera 1.400 millones de dólares anuales que benefician a más de 299.000 productores, de los cuales una parte corresponde a pequeñas unidades de producción (Cando Barbecho & Guzmán Cabrera, 2024).

Según un estudio realizado por Franco-Crespo, Morales Carrasco, Lascano Aimacaña, & Cuesta Chávez (2019), sobre la dinámica de pequeños productores de leche en la Sierra centro de Ecuador, se menciona que la producción ganadera a nivel nacional se encuentra fuertemente sostenida por los pequeños productores. Además, los autores mencionan que la mayoría de pequeñas fincas ganaderas se concentran en extensiones reducidas de entre 0,5 y 1 hectárea y tienen una alta dependencia de mano de obra familiar con un bajo nivel de tecnificación. En este contexto, las limitaciones de espacio y baja asistencia técnica incrementan la vulnerabilidad del sector frente a enfermedades, pérdidas productivas y problemas asociados al manejo del ganado afectando directamente el bolsillo de esos pequeños productores.

Un adecuado manejo del ganado que incluya una alimentación balanceada, control del pastoreo puede disminuir significativamente el riesgo de intoxicación por plantas. Sin embargo, en Ecuador en muchas zonas rurales esta no es una realidad debido a factores económicos y escaso acceso a una asistencia técnica, condiciones que se agravan en periodos de sequía, donde el ganado se ve obligado a consumir especies como el helecho macho, aumentando el riesgo de intoxicaciones y hematuria bovina enzoótica como ya lo han sugerido algunos autores (Roperto, y otros, 2010).

La hematuria bovina enzoótica representa un problema importante en las zonas andinas y húmedas donde el helecho macho, al contar con condiciones climáticas favorables para su reproducción y expansión, invade terrenos destinados al pastoreo bovino. La abundante presencia de esta maleza en potreros constituye un riesgo sanitario para el ganado, ya que su consumo continuo puede provocar a largo plazo intoxicaciones crónicas y afectar su producción (Marrero Faz & Calderón Tobar, 2012).

A pesar de los estudios previos realizados sobre la relación entre helecho y HEB, el presente estudio tiene relevancia debido a que a nivel país es importante aportar información sobre la presencia de compuestos tóxicos y su posible impacto en la salud animal, sobre todo en zonas rurales como la parroquia de Cuellaje ubicada en el cantón Cotacachi, Valle de Intag, Imbabura. Además, esta investigación constituye una de las primeras realizadas en el país enfocada a *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn por lo que representa una importante línea base para futuras investigaciones. Los resultados obtenidos podrán contribuir al desarrollo de estrategias de prevención, manejo y control orientadas a disminuir las pérdidas económicas en la ganadería rural ecuatoriana.

Capítulo II

2.1 Estado del arte

2.1.1 Investigaciones sobre la distribución y ecología de Pteridium aquilinum (L). Kuhn

Pteridium aquilinum (L.) Kuhn ha sido una planta que poco a poco va despertando el interés de los investigadores debido a su amplia distribución a nivel mundial, sus características de adaptación y sus toxinas. En la actualidad se ha reportado que el género *Pteridium* es taxonómicamente complejo, estudios como el realizado por Wolf, y otros (2019), ayudan a entender de mejor manera la clasificación taxonómica y las diferencias genéticas asociadas a su distribución geográfica mediante el uso de marcadores nucleares y plastidiales. Los autores

lograron identificar dos grandes grupos evolutivos dentro del género: el primero correspondiente a *Pteridium aquilinum* y el segundo a *Pteridium escuelentum.* Además, los autores informaron sobre mezcla genética e hibridación entre algunas poblaciones. Esto quiere decir que, a pesar del parecido físico entre las especies, estas no son completamente iguales y existen grupos genéticos diferentes según la región geográfica. Poblaciones sudamericanas usualmente clasificadas como *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn podrían pertenecer a otros taxones relacionados, existiendo aún debates sobre su clasificación.

Por otro lado, el helecho es considerado una de las especies más invasoras de zonas de pastoreo; su éxito se debe a su rizoma y a la fácil dispersión de esporas. Con el objetivo de poder visibilizar la magnitud de la colonización del helecho, Cherrill & Lane (1994) realizaron un estudio en Inglaterra en una amplia extensión de terreno. Para esto, se empleó un sistema de clasificación de paisaje, el cual dividió el territorio en clases ambientales según variables como altitud, clima, suelo, etc. De manera interesante se determinó que la distribución del helecho no depende netamente de la altitud y que el mismo no invade todos los territorios por igual, sino que muestra preferencia por determinados hábitats como áreas de pastoreo y brezales. Además, es importante estandarizar una metodología para estimaciones sobre la expansión del *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn.

2.1.2 Investigaciones sobre las toxinas presentes en el helecho macho

Desde los 70 ya se venía sospechando que el helecho macho posee toxicidad debido a los frecuentes casos de intoxicación asociados a su consumo. Uno de los primeros estudios realizados para identificar las toxinas del helecho fue el realizado por Yoshihira, y otros (1978), quienes principalmente analizaron la composición química y su potencial tóxico. Los autores recolectaron frondas y rizomas del helecho los cuales fueron sometidos a diferentes métodos de extracción y fraccionamiento, es así que se lograron identificar un total de 24 distintos compuestos del grupo de las pterosinas y pterosidos. Estos hallazgos fueron la línea base para

determinar la composición química. Además, realizaron pruebas de toxicidad en ratones, ratas y células HELA donde se evidenció que los extractos tenían actividad citotóxica.

Para los años 1980 avanzaron las investigaciones sobre el helecho macho gracias a la recopilación y análisis de estudios experimentales, es así que Fenwick (1988) realizó una revisión detallada sobre los efectos tóxicos presentes en el helecho destacando que una de las sustancias con mayor relevancia es el ptaquilósido ya que posee propiedades cancerígenas y mutagénicas.

Después de determinar al ptaquilósido como la principal toxina del helecho, se empezó a implementar algunos métodos para cuantificar. En este contexto, Agnew & Lauren (1991) desarrollaron una metodología basada en cromatografía en capa fina (HPLC) para detectar y cuantificar el helecho. Uno de sus resultados más interesantes fue la diferencia entre frondes maduros e inmaduros, lo que determinó que el estado fenológico influye en la presencia de la toxina.

A partir de los avances se logró hacer otras investigaciones como la realizada por Rasmussen, Kroghsbo, Frisvad, & Hansen (2003) donde se determinó si los factores ambientales influyen en la concentración de la toxina y su posible transferencia al entorno, para ello se utilizó diferentes poblaciones de helecho y suelos con un gran crecimiento del mismo en Dinamarca. Los resultados mostraron concentraciones variables evidenciando que la toxina no es constante y que puede verse influenciada por características propias de la planta y condiciones ambientales. Otro hallazgo interesante es que se determinó la presencia de ptaquilósido en el suelo y capas orgánicas. Finalmente, los autores concluyeron que factores como contenido de carbono, exposición a la luz y precipitación tienen un rol en la dinámica del metabolito. Además, la carga de ptaquilósido en el suelo y capas orgánicas puede favorecer la transferencia a cuerpos de agua, ampliando la exposición para animales y humanos.

Una vez ya establecidos los avances en cuanto a identificación y cuantificación de ptaquilósido, las investigaciones posteriores comenzaron a enfocarse en comprender los

mecanismos responsables de su toxicidad. Potter & Baird (2000) explicaron el mecanismo de acción, en condiciones ligeramente alcalinas, como las presentes en el intestino y la orina de la vaca, el compuesto tiende a convertirse en una especie altamente reactiva denominada dienona. Esta especie tiene la capacidad de unirse al ADN, formando aductos que provocan mutaciones y procesos tumorales en la vejiga.

A la vez que las investigaciones avanzan determinando la toxicidad y el potencial carcinógeno del helecho, otras investigaciones decidieron enfocarse en la presencia de la toxina en organismos que ingieren el helecho. Aranha, Hansen, Rasmussen, Strobel, & Friis (2014) desarrollaron un método analítico de alta sensibilidad para la detección de Ptaquilósido y pterosina B en plasma, orina y leche de bovinos. El estudio destacó que no solo el animal estaba expuesto a la toxina, sino también sus consumidores, es decir, el ser humano, ocurriendo así una transferencia de la toxina a través de la cadena alimentaria. Mediante la aplicación de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC/MS), los autores lograron cuantificar concentraciones muy bajas de la toxina y la pterosina B en el plasma, orina y leche bovina. Los resultados demostraron que podrían existir trazas de la toxina en la leche que es de consumo diario.

En el Ecuador se ha reportado la presencia de especies del género *Pteridium* en zonas ganaderas, ampliamente distribuidas en regiones andinas y subtropicales. Los helechos pueden producir compuestos tóxicos que pueden llegar al consumidor final. Por ello Calderón Tobar, y otros (2014) desarrollaron una investigación en el cantón Chimbo, en la provincia de Bolívar, en donde se buscó evaluar la presencia de residuos de ptaquilósido en leche bovina. Los autores analizaron muestras de leche mediante cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), los resultados demostraron que el 89,29% de todas las muestras analizadas tenían residuos de ptaquilósido, evidenciando la transferencia de esta toxina planta-animal; animal-consumidor. Años más tarde, Puga-Torres, y otros (2022) realizaron una investigación sistemática y un metaanálisis entre los años 2010 a 2022 para evaluar la leche cruda en el país

durante este período de tiempo. Entre los contaminantes que analizaron se encontró el ptaquilósido debido a su capacidad tóxica. Los resultados mostraron que un alto porcentaje de las muestras analizadas presentaban concentraciones asociadas a contaminación por esta toxina.

Por lo antes expuesto, se esperaría que el único metabolito tóxico presente en la planta sea el ptaquilósido. Sin embargo, investigaciones recientes sugieren que esta planta posee una composición química compleja, ya que existen otros glucósidos de tipo illudano con estructuras similares al ptaquilósido. Estudios científicos señalan que aparte del ptaquilósido existen otros compuestos relacionados como el caudatósido y el ptescuelósido, los cuales presentan una estructura y reactividad similares entre ellos (Kisielius et al., 2020). Estos compuestos no han sido ampliamente estudiados debido a que no existen muchos métodos de cuantificación y detección de estas toxinas. En esta investigación, los autores utilizaron espectrometría de masas (LC-MS) para cuantificar los 3 metabolitos y sus correspondientes productos de degradación: para el ptaquilósido, la pterosina B; para el caudatósido, la pterosina A; y para el ptesculentósido, la pterosina G. Los resultados mostraron una amplia variabilidad en las concentraciones de estos 3 glicósidos, donde los análogos de ptaquilósido pueden encontrarse en cantidades iguales o incluso superiores. Adicionalmente, se observó que el caudatósido fue detectado en la mayoría de las muestras analizadas.

Dentro del grupo de toxinas del helecho águila se tiene a la prunasina, que es un glucósido cianogénico. Las primeras investigaciones sobre este compuesto en *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn estuvo orientada a comprender cómo influye este compuesto en el comportamiento alimenticio de insectos, donde se encontró que la prunasina no tuvo efectos significativos sobre la dieta de los insectos (Jones & Firn, 1979).

Otras investigaciones tomaron otro enfoque, como la realizada por Low & Thomson (1990), que demostró que dentro de una especie del género *Pteridium* existen diferentes fenotipos que le permiten al helecho la capacidad cianogénica. Los autores concluyeron que

existen individuos totalmente cianogénicos y otros que no poseen esa capacidad, evidenciando que la producción de compuestos cianogénicos presenta variabilidad genética dentro de las poblaciones y que el ambiente puede influir en esta condición.

La presencia de prunasina en *Pteridium arachnoideum* y *Pteridium caudatum*, dos especies estrechamente relacionadas con *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn fue estimada mediante la determinación de la concentración de la prunasina, el potencial cianogénico y la actividad de la beta-glucosidasa; en frondes jóvenes y maduros (Oliveros-Bastidas & Alonso-Amelot, 2010). Además, demostraron valores muy variados de concentración de prunasina y se determinó que la prunasina alcanza valores altos en frondas jóvenes y, a medida que se va desarrollando la planta, estos valores disminuyen.

Otros compuestos potencialmente peligrosos son las tiaminasas, que son enzimas que poseen una capacidad antiamínica. Es bien conocido que la vitamina B1 es indispensable para algunos procesos metabólicos; si existe una deficiencia de la misma en el organismo, esta puede tener efectos en el sistema nervioso y el nivel energético del individuo. Desde hace algún tiempo se venía sospechando que el helecho común posee enzimas antiaminasas, uno de los primeros estudios experimentales de la tiaminasa en el helecho fue realizado por Kenten (1958), quien investigó el funcionamiento de la enzima mediante técnicas manométricas. El autor pudo demostrar que la tiaminasa cataliza la degradación de tiamina gracias a la transferencia de un grupo pirimidina. Otro hallazgo importante de este autor fue que la actividad y concentración de tiaminasa variaba en función de naturaleza y aminas presentes en el medio.

Meyer (1989) realizó una investigación para determinar la actividad enzimática utilizando algunos ensayos bioquímicos en varias especies vegetales forrajeras, dentro de este grupo se encontraron: *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn*, Equisetum ramosissimum, Malva parviflora, Medicago sativa y Pennisetum clandestinum.* El autor buscó determinar las diferencias en cuanto a degradación de tiamina de los extractos de estas especies y determinar la cantidad residual de esta vitamina y de esta manera, obtener la actividad enzimática. Los

resultados mostraron que el helecho macho tenía una actividad enzimática superior a las otras especies. Estos hallazgos respaldan la teoría de que el helecho puede causar deficiencia de vitamina B1.

Estudios como el realizado por Pamukcu (1957) investigaron la relación entre la actividad antiaminíca del helecho y su capacidad cancerígena en ratas a las cuales se les suministró una dieta que contenía un tercio de helecho macho, pero se separó dos grupos uno al cuál se les dio la dieta con *P. aquilinum* y el otro grupo al cuál se les suministró la misma dieta, pero también se les suministró vitamina B. Después de un tiempo los dos grupos desarrollaron tumores en alguna zona del aparato urinario, lo cual evidenció que la suplementación con tiamina no impide la acción cancerosa. Sin embargo, la frecuencia de los carcinomas fue mayor en animales suplementados con vitamina B1. Esto quiere decir que los componentes tóxicos del helecho tienen varios mecanismos de acción.

Años más tarde, autores como Waret-Szkuta, y otros (2021) documentaron un brote de intoxicación en cerdos por ingerir el helecho macho. Los autores reportaron síntomas como pérdida de peso y alteraciones neurológicas, posteriormente a los cerdos se le suministro Tiamina y mostraron una mejora considerable lo que sugiere que hubo una deficiencia de vitamina B1 causada por las tiaminasas del helecho. Además, en este estudio se determinó que la toxicidad del helecho es multifactorial y que no puede atribuirse netamente a la acción de las tiaminasas.

2.1.3 Investigaciones sobre la relación de Hematuria enzoótica bovina (HEB) y el consumo de helecho

Uno de los primeros estudios que se centraron en relacionar la hematuria bovina con la ingesta prolongada del helecho es el realizado por Pamukcu (1957), donde el autor buscaba establecer la naturaleza de las lesiones que presentaban algunos bovinos, especialmente búfalos. En la época existía poco conocimiento sobre las lesiones en la vejiga, es así como el investigador examinó animales de regiones de Turquía donde existe alta incidencia de

hematuria bovina y realizó análisis anatomopatológicos e histopatológicos. Pamukcu logró analizar 285 vejigas obtenidas de distintos mataderos y usó diferentes técnicas de tinción. Los resultados demostraron que esta enfermedad afectaba a búfalos de entre 2 a 14 años, especialmente con la aparición de papilomas, carcinomas, adenomas y hemangiomas. Otro hallazgo importante fue que el 25,24 % de las vejigas analizadas tenían neoplasias puras, demostrando que la hematuria enzoótica no es únicamente una enfermedad inflamatoria, sino un proceso neoplásico complejo.

Tras los primeros aportes de Pamukcu, en 1978 McKenzie realizó una investigación donde identificó los factores asociados en zonas donde previamente se reportaron casos clínicos en Queensland, Australia. Para ello, el autor recolectó información de las fincas ganaderas afectadas entre 1960 y 1976 evaluando la presencia de helechos. Los resultados determinaron que un porcentaje alto de fincas estaban afectadas por esta condición y dentro de este porcentaje se encuentran fincas donde los animales tenían completo acceso a *Pteridium escuelentum* que se encuentra estrechamente relacionado con *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn. Por lo tanto, el autor concluyó que la ingestión prolongada de helecho aumentaba la probabilidad de lesiones neoplásicas en la vejiga (McKenzie, 1978).

A pesar de que estudios previos confirmaron la relación entre la enfermedad y el consumo del helecho los mecanismos responsables de la aparición de las lesiones neoplásicas en la vejiga aún no estaban del todo claros, es así como Wosiacki, Claus, Alfieri, & Alfieri (2006) investigaron la posible aparición del papilomavirus bovino tipo 2(BPV-2) y si alguno de los compuestos tóxicos del helecho influye en el desarrollo de estas lesiones. Para ello analizaron muestras de bovinos localizados en Brasil. Se recolectó un total de 62 vejigas urinarias, las cuales fueron clasificadas en 3 grupos y un control con animales sanos cuya alimentación era sin helecho. Además, se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar el gen de BPV-2. Los resultados demostraron que el 58% de las muestras

analizadas presentaban el virus. Los autores concluyeron que la HEB podría resultar de una interacción entre una infección por BPV-2 y los compuestos carcinogénicos del helecho macho.

Con el propósito de saber la incidencia de hematuria en el noreste de Rumanía; Giurgiu, Mircean, Scurtu, & Popovici (2008) realizaron un estudio en siete localidades distintas de la región de Maramures en 1751 bovinos durante los años 2007 y 2008 en zonas donde esta enfermedad fue considerada endémica. Los autores realizaron monitoreo de la alimentación, del manejo del ganado y de cómo este se distribuía en las diferentes épocas del año. Adicionalmente, los investigadores realizaron encuestas, exámenes clínicos, análisis bioquímicos, hematológicos y urinarios. Estos exámenes demostraron un marcado deterioro del animal en cuanto a su estado corporal, anemia y hematuria, trastornos reproductivos. Los autores concluyeron que la hematuria enzoótica bovina es una enfermedad multifactorial asociada al consumo duradero del helecho.

2.1.4 Investigaciones sobre métodos de control y manejo del helecho

Una de las características que más destacan de este helecho es que se considera una maleza por su gran capacidad de reproducción y tolerancia. Por ello, se busca poder controlar de alguna manera a esta planta. Un meta-análisis realizado por Stewart, Cox, Le Duc, & Pakeman (2008) durante 10 años en el Reino Unido analizó la efectividad de distintos métodos de control del helecho. Esta investigación surgió debido a esta necesidad de controlar el helecho y demostrar si las técnicas de control estaban funcionando adecuadamente; para ello, se establecieron 6 experimentos replicados en distintas localidades con tratamientos de control químico, físico y combinado. Los resultados demostraron que cada método de control varió considerablemente entre las localidades. De manera que se puede decir que los factores ambientales y ecológicos influyen significativamente en el desarrollo del helecho.

2.2 Marco teórico

2.2.1 Pteridium aquilinum (L). Kuhn

P. aquilinum (L). Kuhn, comúnmente conocido como helecho águila o helecho macho, es una planta perenne ampliamente distribuida a nivel mundial ya que se adapta a diferentes condiciones y climas. El nombre de su género *Pteridium* es gracias al vocablo griego “pterón” que tiene relación con “alas” o “plumas”, lo cual hace referencia a su apariencia similar a una pluma por sus múltiples frondas. Esta especie se caracteriza por presentar frondas grandes y triangulares que pueden alcanzar hasta 1 metro de altura, además de un rizoma subterráneo extenso, lo que le da la capacidad de expandirse rápidamente y colonizar grandes superficies (Austin, 2004).

2.2.2 Descripción botánica

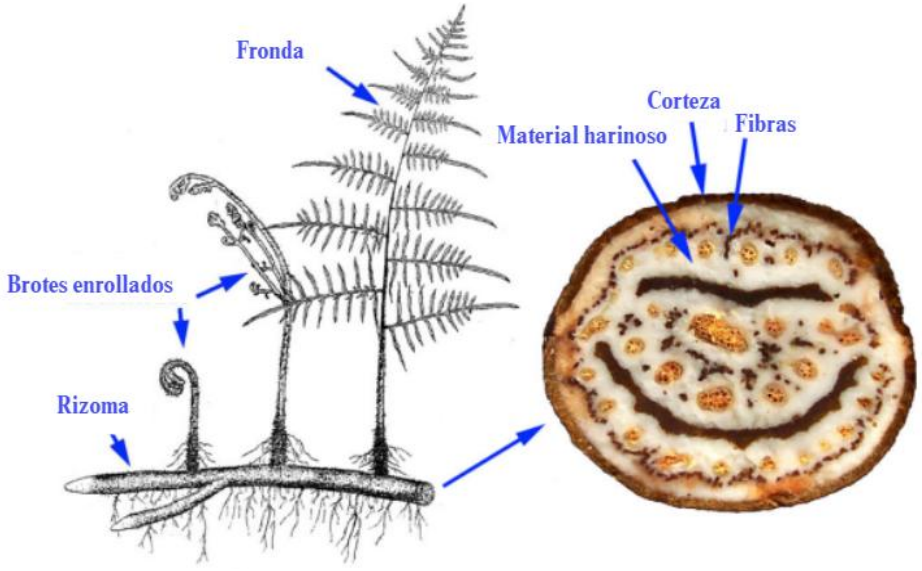
El helecho es una planta que posee frondas de gran tamaño que pueden variar en forma y tamaño dependiendo de las condiciones medioambientales; sus láminas foliares son bipinnadas, tripinnadas con pinas o pinúlas bien diferenciadas. Además, las frondas presentan un peciolo rígido y recto de color café o verde claro dependiendo del estado fenológico de la planta; las hojas al tacto pueden ser duras hasta más suaves. Entre las características morfológicas que más destacan está la disposición de las pinas, el ángulo de inserción respecto al raquis, presencia de tricomas, etc. Es importante destacar que durante las distintas etapas fenológicas del helecho macho se observan cambios en las frondas en cuanto a su forma, color y estructuras reproductivas (Zenkteler & Nowak, Application of morphometric study to discriminate *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn subsp. pinetorum (C. N. Page & R. R. Mill 1995) J. A. Thomson in Poland, 2019).

Uno de sus órganos más importantes es el rizoma ya que este le confiere la capacidad al helecho águila de reproducirse de manera vegetativa y es la fuente de energía para la planta debido a que donde se almacenan los carbohidratos. Según Whitehead & Digby (1997), existen 3 tipos de rizomas: el largo, transicional y corto. El rizoma largo se caracteriza por poseer un

peso seco total mayor al de las frondes ya que es una fuente de carbohidratos, el rizoma corto tiene un menor peso fresco total, pero posee una mayor cantidad de yemas responsables de la formación de la mayoría de frondes y finalmente, el rizoma transicional posee características combinadas de ambos rizomas. Además, se determinó que el rizoma tiene una gran cantidad de yemas que favorecen la regeneración continua de las frondes y la capacidad de colonizar grandes extensiones de terreno.

Figura 1

Morfología y sección transversal del helecho del género Pteridium aquilinum (L.) Ku*hn.*



Nota. Izquierda: etapas de crecimiento del helecho. Derecha: área transversal del rizoma caracterizada por contener material harinoso en su interior. Adaptado y traducido al español por Leach, y otros (2023).

2.2.3 Taxonomía

Tabla 1

Clasificación taxonómica de Pteridium aquilinum (L.) Kuhn.

Clasificación Taxonómica

Reino	Plantae
División	Pteridophyta
Clase	Polypodiopsida
Orden	Polypodiales
Familia	Dennstaedtiaceae
Género	*Pteridium*
Especie	*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn

Nota*.* Elaboración propia a partir de Marimuthu, Fernández, Kumar, & Thangaiah (2022).

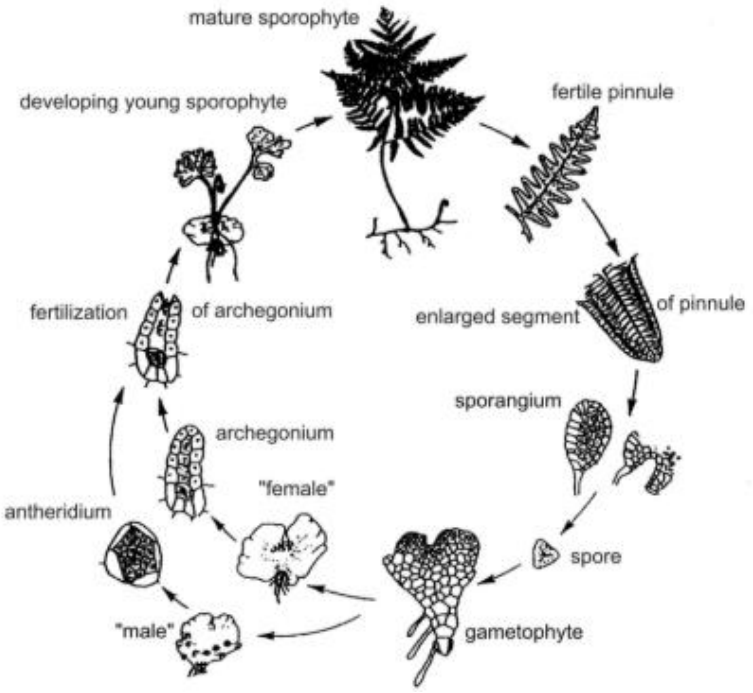
Durante mucho tiempo se pensó que el género *Pteridium* no se subdividió en subespecies, en particular, la especie *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn, pero estudios filogenéticos demuestran que esta especie se encuentra dividida en subespecies a nivel mundial según su distribución geográfica (Wolf et al., 2019).

2.2.4 Ciclo Biológico de los helechos

Los helechos presentan un ciclo biológico que se divide en dos etapas: el esporófito y el gametofito. El esporofito es la fase principal del ciclo ya que es aquella donde se puede observar a la planta en el medio ambiente. En esta etapa posee tejido vascular, rizoma, raíces, frondas y esporas que son sus estructuras reproductivas, las cuales son dispersadas por el viento y en condiciones adecuadas germinan para dar origen al gametofito. Por otro lado, el gametofito es cuando una estructura pequeña constituida por una sola capa de células se desarrolla a órganos sexuales masculinos y femeninos que en presencia de agua se fecundan; como resultado se desarrolla un cigoto sobre el gametofito originando un nuevo esporofito (Krieg & Chambers, 2022).

Figura 2

Ciclo de vida del helecho (Pteridophyta).



Nota. Reproducido a partir de Mehltreter, Walker, & Sharpe (2010).

2.2.5 Composición química

La composición química del helecho macho se caracteriza por ser muy variada con distinta actividad biológica. Diversos estudios han determinado la presencia de metabolitos secundarios tales como, terpenoides, compuestos fenólicos, flavonoides, alcaloides, taninos, entre otros. Estos compuestos le confieren distintas propiedades a la planta desde mecanismos de defensa hasta actividad antimicrobiana. Estos compuestos podrían explicar la razón por la cual este helecho ha sido utilizado tradicionalmente en varias culturas a nivel mundial. Además, ensayos cualitativos han permitido identificar otros compuestos como esteroles, polifenoles y sustancias quinónicas las cuales se encontrarán de diferente manera según el solvente utilizado en la extracción (Adou, Koné, Ipou Ipou, & N'Guessan, 2016).

Por otro lado, Adebayo, Oluremi, Ogunlakin, Gyebi, & Sonibare (2025) realizó un análisis con FTIR lo cual les permitió identificar diferentes grupos funcionales como grupos hidroxilo (-OH), carbonilo (C=O), amino (N-H), confirmando la presencia de alcoholes, fenoles, éteres, ácidos carboxílicos. Kardong, Upadhyaya, & Saikia (2013), evaluaron extractos obtenidos con etanol, metanol, éter de petróleo, cloroformo y agua y lograron identificar saponinas, terpenos, glucósidos cardiacos, alcaloides y azúcares. Esto nos quiere decir que el método de extracción influye en los metabolitos identificados y. por lo tanto en la actividad biológica.

Un estudio realizado por Gülsoy & Şimşir (2018) donde se analizó los tallos de helecho macho con el fin de evaluar su potencial como materia prima demostró que los tallos contienen holocelulosa, alfa celulosa y lignina. Asimismo, se encontró cenizas, compuestos solubles en etanol, compuestos solubles en agua, estos parámetros permiten caracterizar a nivel estructural los compuestos extraíbles del material orgánico.

2.2.6 Toxicidad en la planta

El helecho macho es una de las especies más comunes a nivel mundial, una de las razones de su supervivencia es que es capaz de sintetizar una amplia variedad de metabolitos secundarios los cuales pueden llegar a ser tóxicos para sus consumidores. Es por ello, que esta planta tiene un interés pecuario debido a que puede provocar enfermedades de curso crónico y agudo en los animales de producción (Villar & Ortiz Díaz, 2006). En los siguientes apartados se describe alguna de las toxinas más importantes presentes en *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn.

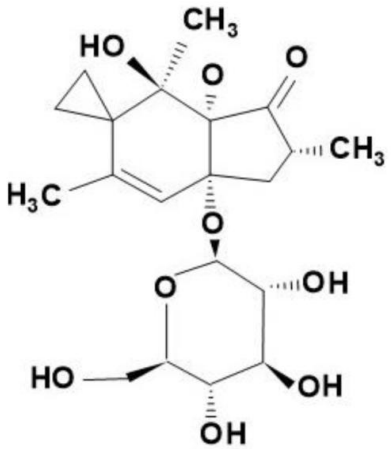
2.2.7 Ptaquilósido

Esta es la toxina más popular del helecho macho, siendo responsable de los efectos biológicos asociados al consumo de helecho. Desde el punto de vista químico es un glucósido norsesquiterpérnico perteneciente al grupo de ilúdanos que se caracterizan por ser muy inestables frente a cambios de pH y temperatura. El interés por este compuesto es debido a

que ha sido demostrada su capacidad para provocar cáncer de manera natural en animales. Su inestabilidad química permite la formación de intermediarios que pueden reaccionar con el ADN. Estudios han demostrado que la exposición prolongada al ptaquilósido puede provocar neoplasias en bovinos, roedores y otras especies, afectando principalmente al tracto digestivo y vejiga (Gomes, y otros, 2012).

Figura 3

Estructura química del ptaquilósido



Nota. Reproducido de Vetter, The Norsesquiterpene Glycoside Ptaquiloside as a Poisonous, Carcinogenic Component of Certain Ferns (2022).

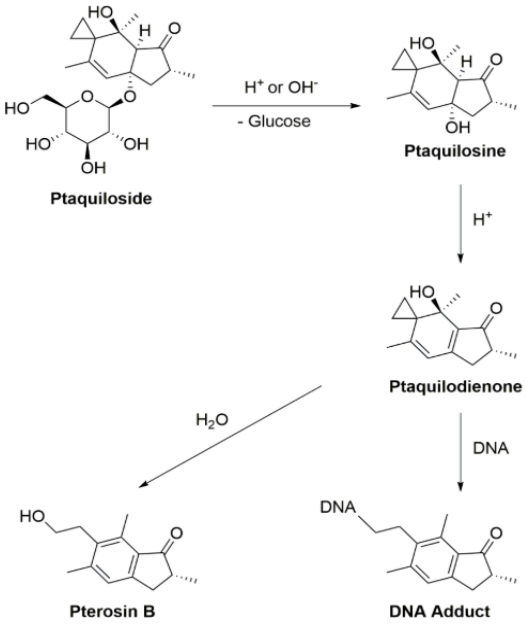
El ptaquilósido ejerce su efecto tóxico principalmente por su capacidad para actuar como un agente alquilante del ADN. Una vez ingerido el compuesto, este compuesto genera alteraciones del material genético de las células expuestas generando alteraciones. Además del daño genético directo, el ptaquilósido puede alterar los mecanismos celulares relacionados con la reparación del ADN incrementando la probabilidad de transformación de los tejidos expuestos (Gil da Costa, y otros, 2020).

A pesar de que el ptaquilósido es la toxina principal del helecho, está por sí sola no tiene la capacidad de ser tóxica ya que esta para tener su acción debe tener un conjunto de

transformaciones favorecidas por pH y temperatura. En la figura 3 se puede evidenciar claramente el mecanismo de activación del ptaquilósido, donde primeramente ocurre una hidrólisis del enlace glucosídico gracias a condiciones alcalinas o ácidas, se origina una aglicona denominada ptaquilosina. Este compuesto posee una menor estabilidad que el ptaquilósido original y continúa experimentando otras reacciones. Posteriormente, la ptaquilosina se transforma en pteridienona, esta es la verdadera molécula tóxica ya que contiene un anillo ciclopropano electrófilo que es una molécula que tiene una gran afinidad por moléculas ricas en electrones como las bases nitrogenadas presentes en el ADN. Cuando la pteridienona entra en contacto con el ADN ocurre una alquilación originando estructuras denominadas aductos de ADN ptaquilósido. La formación de los aductos interfiere con los procesos de replicación. Por otro lado, cuando la pteridienona se encuentra en presencia de agua puede sufrir una hidrólisis que conduce a la formación de pterosina B, un compuesto aromático más estable y que no tiene la capacidad de formar aductos (Vetter, The Norsesquiterpene Glycoside Ptaquiloside as a Poisonous, Carcinogenic Component of Certain Ferns, 2022).

Figura 4

Mecanismo de activación del ptaquilósido y su interacción con el ADN.



Nota. Reproducido de Malík, y otros (2024).

A nivel de la planta esta toxina no se distribuye de manera uniforme en los diferentes órganos del helecho, sino que su concentración varía según el tejido vegetal y su etapa de desarrollo. Rasmussen, Kroghsbo, Frisvad, & Hansen (2003) evaluaron cómo se distribuye esta toxina en frondas, rizomas y hojarasca y se determinó que el ptaquilósido estuvo presente en todos los órganos, aunque las concentraciones fueron más altas en las frondas.

2.2.8 Caudatósido y ptesculentósido

Además del ptaquilósido las especies del género *Pteridium* sintetizan otros compuestos del tipo illudano que presentan similitudes químicas y estructurales con la toxina principal. Entre ellos destacan el caudatósido y el ptesculentósido considerados análogos del ptaquilósido que a pesar de ser la toxina que ha recibido mayor atención por sus propiedades cancerígenas, investigaciones fitoquímicas han demostrado que estos análogos comparten un mismo esqueleto y tienen propiedades semejantes lo que sugiere que poseen una misma ruta biosintética (Fletcher, Hayes, Somerville, De Voss, & Blaney, 2010).

El caudatósido fue descrito inicialmente por Castillo, Wilkins, Lauren, Smith, & Alonso-Amelot (1997) en un estudio en *Pteridium aquilinum var.caudatum* los autores lograron aislar un

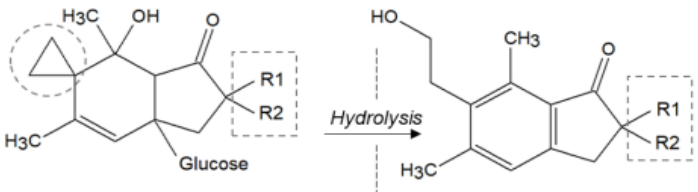
glucósido sesquiterpénico de tipo illudano el cuál es un metabolito de la especie y forma parte de los glucósidos que le atribuyen la toxicidad al helecho. A nivel estructural, este glucósido conserva el núcleo illudano el que se encuentra fusionado a un residuo de glucosa mediante un enlace glucosídico, la principal diferencia entre caudatósido y ptaquilósido se encuentra en los sustituyentes de algunos carbonos del núcleo terpénico, mientras que el ptaquilósido presenta un grupo metilo en una de sus posiciones, el caudatósido presenta un grupo hidroximetilo.

Años más tarde Fletcher, Hayes, Somerville, De Voss, & Blaney (2010) aisló un nuevo glucósido denominado ptesculentósido, el mismo fue identificado mediante HPLC, espectrometría de masas y resonancia magnética gracias a estas técnicas se logró establecer la fórmula molecular de este compuesto (C20H30O9), con modificaciones en el carbono 10 del núcleo terpénico donde se sustituye un grupo metilo por un grupo hidroximetilo.

La degradación de caudatósido y ptesculentósido ocurre mediante mecanismos semejantes a los previamente descritos para el ptaquilósido. Inicialmente se pierde la glucosa mediante una hidrólisis, originando un intermediario inestable que se reorganiza hasta formar compuestos aromáticos denominados pterosina. Una característica compartida de estos tres compuestos es que poseen un anillo ciclopropano altamente electrofílico que es responsable de su reactividad química, durante un proceso de hidrólisis el caudatósido se transforma en pterosina A, mientras que el pterculentósido se convierte en pterosina G. Esto sugiere que al tener mecanismos similares al del ptaquilósido, estos compuestos también contribuyen a la toxicidad de la planta por ello es importante realizar monitoreos ambientales y toxicológicas que no se limiten únicamente a ptaquilósido ya que los otros metabolitos pueden llegar a tener concentraciones similares o mayores (Kisielius, Markussen, Hansen, & Rasmussen, 2024).

Figura 5

Glucósidos de tipo illudano encontrados en Pteridium aquilinum (L.) Kuhn *y sus respectivas pterosina*



		Illudane glycosides	Corresponding pterosins
R1	R2		
H	CH_3	Ptaquiloside (PTA)	Pterosin B
H	CH_2OH	Ptesculentoside (PTE)	Pterosin G
CH_3	CH_2OH	Caudatoside (CAU)	Pterosin A

Nota. Tomado de Kisielius, Markussen, Hansen, & Rasmussen (2024).

2.2.9 Tiaminasas

La tiamina mejor conocida como vitamina B1, es un micronutriente hidrosoluble muy importante que desempeña funciones en el metabolismo energético ya que participa como coenzima de varias rutas metabólicas relacionadas con la obtención de energía. Además, es importante para un funcionamiento normal del sistema nervioso y cardiovascular. Su importancia radica en que puede intervenir en enzimas responsables de la descarboxilación oxidativa de alfa-cetoácidos importante para producir ATP y en la vía de las pentosas fosfato una ruta metabólica alternativa para metabolizar azúcares. La disminución de vitamina B1 puede provocar alteraciones metabólicas y enfermedades como Beriberi y la encefalopatía Wernicke. Es por esto que cualquier factor que disminuya o degrade la disponibilidad de tiamina como las tiaminasas, representa un riesgo para la salud.

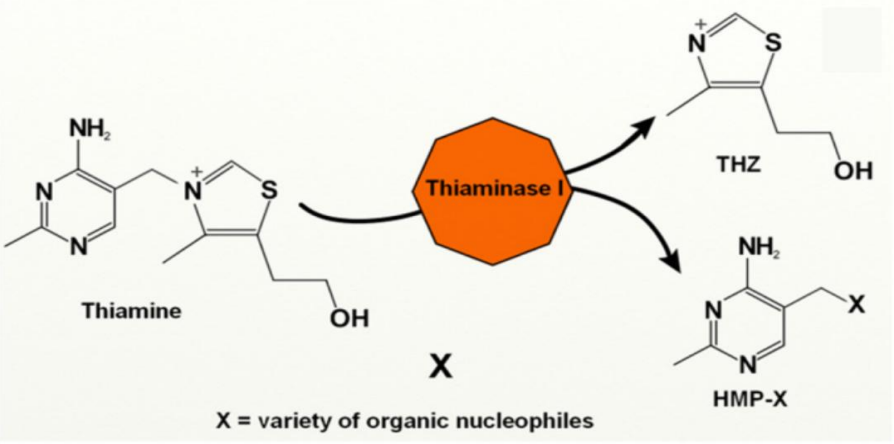
La tiaminasa es una enzima cuya función es degradar o inactivar la vitamina B1, su actividad fue descrita hace más de 6 décadas y a lo largo del tiempo se la ha detectado en diferentes organismos como plantas, bacterias, peces, etc. Hasta la fecha se han reportado dos grupos de tiaminasas; tiaminasa I y tiaminasa II. Ambas enzimas degradan o inactivan la vitamina B1 mediante un mecanismo cinético ping-pong, pero difieren en su mecanismo de acción. Por un lado, la tiaminasa I cataliza la ruptura de la molécula de tiamina mediante la

sustitución del anillo tiazólico, mientras que la tiamina II realiza una hidrólisis de la tiamina utilizando como cosustrato moléculas de agua (Hanes, Kraft, & Begley, 2007).

La tiaminasa II está ampliamente distribuida en varios reinos de la naturaleza, mientras que la tiaminasa I se encuentra más restringida a plantas y algunos microorganismos. Al estudiar la estructura de la enzima se ha logrado identificar su sitio activo y comprender con mayor detalle su mecanismo de acción. Esta enzima participa en procesos de reciclaje de precursores de tiamina catalizando la escisión de la molécula de tiamina mediante una reacción donde se sustituye la porción tiazólico (THZ) por diferentes nucleófilos orgánicos (X) y generando derivados de hidroximetilpirimidina (HMO-X) y esto provoca que la vitamina B1 se inactive.

Figura 6

Mecanismo de acción de la tiaminasa I.



Nota. Al realizarse este proceso, se inactiva la tiamina. Extraído de Sannino, Kraft, Edwards, & Angert (2018).

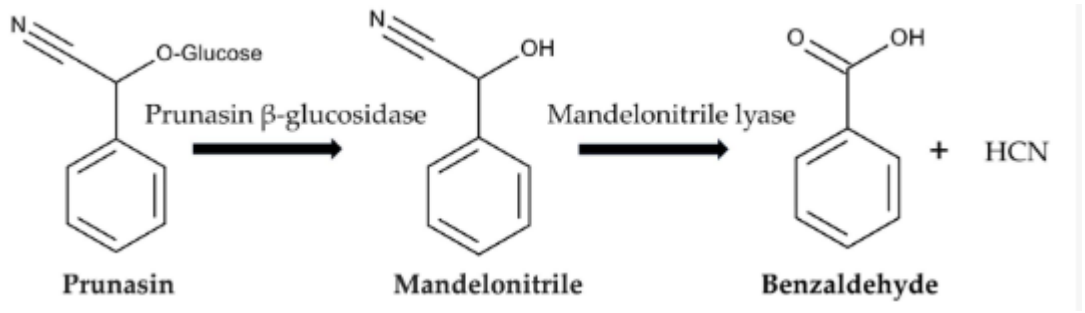
2.2.10 Prunasina

La prunasina es un glucósido cianogénico cuya principal característica es poseer el grupo ciano, que es uno de los grupos más tóxicos y le ayuda a la planta como defensa ante

herbívoros y patógenos. Esta molécula se encuentra ampliamente distribuida en diferentes especies del reino vegetal. En cuanto a su estructura, se caracteriza por poseer un grupo nitrilo unido a una glucosa capaz de liberar cianuro tras una hidrólisis enzimática. La prunasina forma parte de los principales glucósidos cianogénicos y puede ser un precursor directo de compuestos tóxicos derivados de cianuro gracias a la acción de beta-glucosidasas, las cuales hidrolizan y generan una cianohidrina inestable que es el mandelonitrilo; posteriormente, la enzima mandelonitrilo liasa libera ácido cianhídrico (HCN) y benzaldehído, reacción descrita en la siguiente figura (Cressey & Reeve, 2019).

Figura 7

Degradación enzimática de la prunasina y liberación de (HCN).



Nota. Adaptado de Kato-Noguchi & Kato (2026).

Como ya se ha mencionado antes, la prunasina cumple una función defensiva muy importante frente al ataque de herbívoros. Por ejemplo, en *Prunus serotonina,* la presencia de prunasina se relaciona con esa capacidad que tiene la especie para resistir a factores bióticos e invadir grandes extensiones de terreno (Santos Pimenta, Schilthuizen, Verpoorte, & Choi, 2014).

En cuanto a la biosíntesis de este compuesto, Ben-Yehoshua & Conn (1964) demostraron que el principal precursor de esta molécula es la fenilalanina, que es un

aminoácido que se incorpora fácilmente en la formación de la aglicona prusiana en comparación con otros compuestos.

2.2.11 Hematuria enzoótica bovina

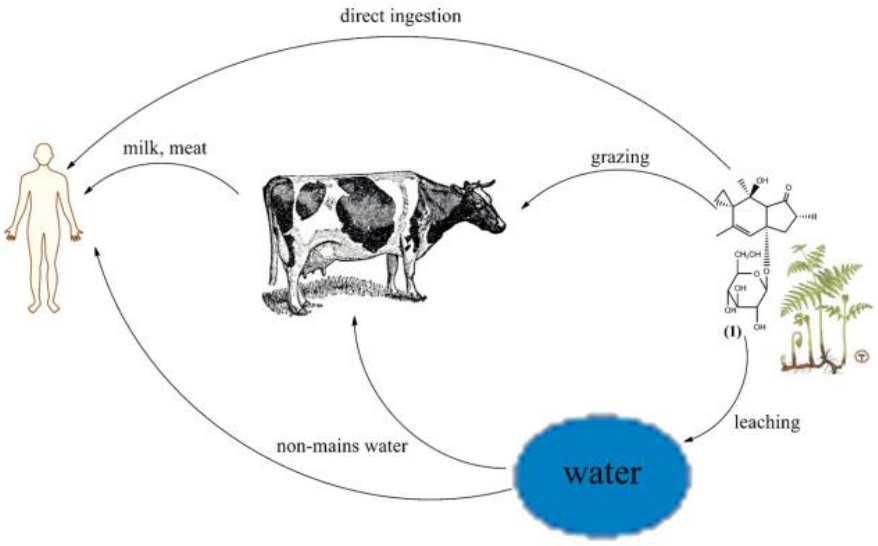
El principal riesgo de la ingestión prolongada del helecho macho es la presencia de hematuria enzoótica bovina que es una enfermedad crónica de carácter neoplásico, esto quiere decir que forma tumores, afecta principalmente a bovinos adultos. Esta enfermedad es una de las principales manifestaciones por la intoxicación de plantas de helechos del género *Pteridium* y representa un problema tanto económico como de salud en las zonas de invasión del helecho. Mientras que un consumo de una gran cantidad de la planta durante un período corto de tiempo genera una intoxicación aguda, el consumo duradero ya sea por meses o años puede favorecer la aparición de neoplasia en la vejiga. En específico esta enfermedad se relaciona directamente con el ptaquilósido presente en el helecho, ya que el mismo sufre un conjunto de transformaciones generando intermediarios capaces de interactuar con el ADN (Cavasani, y otros, 2025).

La evolución de la enfermedad suele ser lenta y progresiva, por lo que los animales pueden estar durante meses o años presentando episodios de hematuria antes de manifestar un deterioro de su estado de salud. Entre los signos clínicos que se presentan en esta enfermedad se encuentra el adelgazamiento progresivo del animal, palidez en las mucosas como consecuencia de la anemia y hematuria, la orina es rojiza o con coágulos de sangre. Existen algunos animales que presentan un sangrado intermitente lo que puede retrasar el diagnóstico. A nivel interno las lesiones se concentran en la vejiga, donde se evidencia un engrosamiento de la pared, hemorragias externas, masas polipoides que alteran la estructura normal del órgano. Estas alteraciones se suelen presentar con procesos inflamatorios crónicos lo que hace que la enfermedad sea una secuencia progresiva de neoplasias (Moreira Souto, Kommers, Barros, Rech, & Piazer, 2006).

El ptaquilósido es reconocido como el principal carcinógeno presente en *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn. Como ya se ha descrito en repetidas ocasiones este compuesto interactúa con el ADN, produciendo una alquilación de las bases nitrogenadas, roturas de cadenas y por ende mutaciones que favorecen el desarrollo de tumores urinarios y explican la elevada frecuencia de lesiones neoplásicas observadas en bovinos que presentan la enfermedad. Además, estudios in vitro han demostrado que la presencia de ptaquilósido aumenta la presencia de lesiones. Por otro lado, es importante entender que la toxina del helecho no se limita únicamente al ganado. Durante los últimos tiempos se ha demostrado que los compuestos tóxicos del helecho pueden incorporarse en la cadena alimenticia. La toxina principal del helecho ha sido detectada en leche, carne, agua y otros componentes que tienen relación con zonas donde se encuentra el helecho (Park H. , y otros, 2023). Una de las características especiales del ptaquilósido es que es una molécula que puede lixiviar desde la planta hasta el suelo para después contaminar aguas superficiales y subterráneas ampliando la exposición ambiental (Clauson-Kaas, Ramwell, Hansen, & Strobel, 2016). Es por ello que esta planta es un problema de interés veterinario como de salud pública (Gil da Costa, Bastos, Oliveira, & Lopes, 2012).

Figura 8

Rutas de exposición del ptaquilósido desde Pteridium aquilinum (L.) Kuhn.



Nota. Fuente Gil da Costa, Bastos, Oliveira, & Lopes (2012).

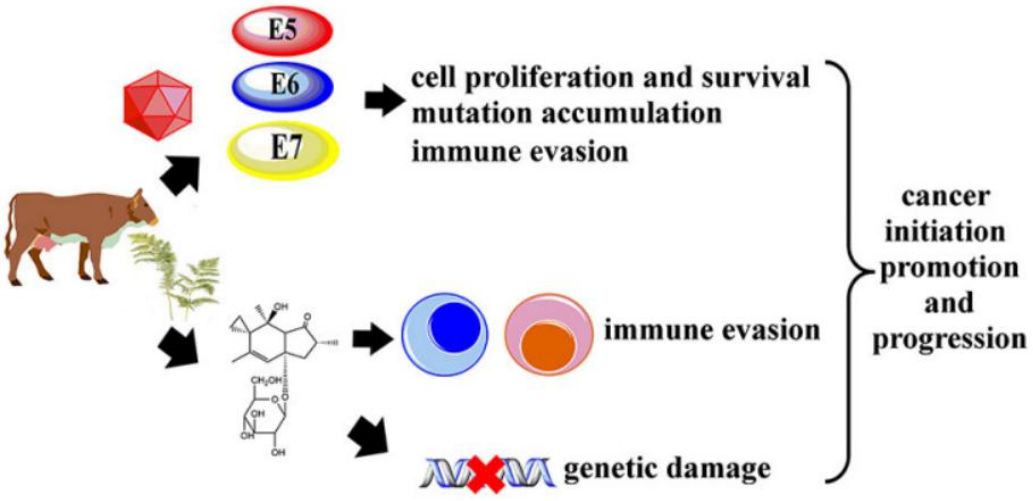
A pesar de que varios estudios han demostrado que el ptaquilósido es el motivo principal de la enfermedad, la evidencia científica demuestra que es una enfermedad multifactorial. Esto quiere decir que la hematuria no es exclusivamente resultado de la intoxicación por el helecho macho, si no de la interacción de factores químicos, inmunológicos y biológicos. El ptaquilósido produce daño mediante la formación de aductos de ADN, alterando la regulación del ciclo celular. Sin embargo, la evidencia indica que estas alteraciones al coexistir con infecciones por papilomavirus bovino, especialmente los genotipos BPV-2 y BPV-13 incrementan el riesgo de cáncer. El ptaquilósido no sólo es un agente mutagénico, sino que también altera la respuesta inmune del hospedador. Diversos estudios han demostrado que se reduce la actividad de células inmunológicas para la vigilancia haciendo que el papilomavirus bovino permanezca por períodos largos de tiempo, este es el escenario perfecto para la transformación maligna de células de la vejiga (Alcântara, Lunardi, Agnol, Alfieri, & Alfieri, 2021).

Por otro lado, el papiloma bovino desarrolla un papel importante en el progreso de los tumores ya que expresa proteínas oncogénicas, principalmente E5, E6, E7. La proteína E5 activa la proliferación celular y reduce la expresión del complejo de histocompatibilidad tipo I,

favoreciendo la evasión inmunológica. La proteína E6 induce a una proliferación celular descontrolada y la proteína E7 favorece la progresión del ciclo celular. La acción conjunta de estas proteínas permite que las células portadoras del daño genético se sigan dividiendo y acumulando nuevas mutaciones, incrementando las lesiones en la vejiga (Medeiros-Fonseca, Abreu-Silva, Medeiros, Oliveira, & Gil da Costa, 2021).

Figura 9

Interacción entre el ptaquilósido y el BPV-4 en la progresión de papiloma a carcinoma.



Nota. Tomado de Medeiros-Fonseca, Abreu-Silva, Medeiros, Oliveira, & Gil da Costa (2021).

2.2.12 Cromatografía en capa fina (TLC)

La cromatografía en capa fina (TLC) es una de las técnicas más utilizadas para la separación, identificación y evaluación cualitativa de extractos que presentan mezclas complejas. A finales de la década de 1950 se consolidó gracias al desarrollo de materiales y procedimientos de desarrollo cromatográfico convirtiéndose en una excelente técnica para productos naturales, fármacos y algunas muestras vegetales. Esta técnica fue el fundamento para que años más tarde surgieran otras técnicas más sofisticadas como la cromatografía de

alta eficiencia (HPLC), sin embargo, la TLC aún sigue siendo utilizada debido a su bajo costo, palidez y versatilidad (Fried & Sherma, 1999).

El principio de separación de la TLC se basa en la distribución de los compuestos a partir de una fase móvil y una fase estacionaria. La fase móvil corresponde a uno o una mezcla de solventes que ascienden por capilaridad a través de la placa, mientras que la fase estacionaria es aquella que recubre la placa esta puede ser de sílica gel, celulosa o alúmina, es decir a través de la fase estacionaria pasa la fase móvil y gracias a esto se quedan atrapados los compuestos y migran de acuerdo a su afinidad con el solvente o la fase estacionaria. Durante este proceso surgen algunas propiedades fisicoquímicas como la polaridad, afinidad química y solubilidad que es lo que determina la distancia de separación (Santiago & Strobel, 2013).

Uno de los parámetros fundamentales de la técnica es el factor de retención (RF), que es una medida específica de cada compuesto. Según Kumar, Jyotirmayee, & Sarangi (2013) el factor de retardo se entiende como la relación entre la distancia recorrida por el compuesto y la distancia recorrida por el solvente. Este parámetro es una característica reproducible bajo condiciones controladas, lo que permite comparar entre cromatogramas obtenidos en diferentes ensayos. El Rf puede ser aceptado para la identificación preliminar de un compuesto ya que se puede comparar con patrones de referencia. La TLC ha adquirido relevancia debido a su capacidad para generar perfiles cromatográficos que funcionan de manera similar a una huella dactilar ya que son específicos de cada extracto vegetal.

2.3 Marco conceptual

***Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn:** es una especie de helecho perenne perteneciente a la familia Dennstaedtiaceae. Es de amplia distribución mundial y se desarrolla en diversos ecosistemas, especialmente en áreas abiertas, bosques secundarios y zonas perturbadas (Royal Botanic Gardens, Kew, 2025).

Estado fenológico: hace referencia a la etapa específica del ciclo de desarrollo en la que se encuentra un organismo vegetal, procesos como la germinación, el crecimiento vegetativo, la emisión de hojas, la floración, la fructificación, la maduración y la senescencia (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2018)**.**

Ptaquilósido: es un compuesto orgánico tóxico perteneciente al grupo de los glucósidos norsesquiterpénicos. Este metabolito secundario es considerado el principal responsable de la toxicidad del helecho *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn, debido a su capacidad genotóxica y carcinogénica (Alonso-Amelot & Avendaño, 2022).

Pterosina B: es un metabolito secundario derivado del ptaquilosido, generado por procesos de degradación química y considerado un compuesto indicador de la presencia de sustancias tóxicas provenientes de especies del género *Pteridium* (Alonso-Amelot & Avendaño, 2022).

Caudatósido: es un glucósido presente en especies del género *Pteridium*, identificado como parte de los compuestos secundarios de esta planta y relacionado con la química defensiva del helecho (Alonso-Amelot & Avendaño, 2022).

Ptesculentósido: es un glucósido norsesquiterpérnico que está presente en algunas especies de helechos del género *Pteridium* (Yamada & Ojika, 2017).

Glucósidos illudanos: son un grupo de metabolitos secundarios formados por un núcleo químico de tipo illudano unido a una o más moléculas de azúcar, sus compuestos se encuentran en especies de helechos del género *Pteridium* (Yamada & Ojika, 2017).

Hidrólisis alcalina: es una reacción química en la que un compuesto se descompone por la acción del agua en presencia de una base fuerte, mediante el cual se rompen determinados enlaces químicos, dando lugar a nuevos efectos (McMury, 2021).

Glucósido cianogénico: Son metabolitos secundarios presentes en varias especies del reino vegetal capaces de liberar ácido cianhídrico (HCN) cuando los tejidos son dañados, estos compuestos participan como defensa de la planta (Park H. , Cho, Lee, Lee, & Kim, 2023).

Prunasina: Glucósido cianogénico más estudiado presente en algunos frutos y semillas (Park H. , Cho, Lee, Lee, & Kim, 2023).

Tiamina: También llamada vitamina B1, es una vitamina hidrosoluble esencial para todos los organismos vivos que participa en procesos relacionados con el metabolismo energético (Goyer, 2010).

Cofactor enzimático: Es una molécula no proteica que es necesaria para que varias enzimas puedan realizar correctamente su actividad catalítica (Goyer, 2010).

Deficiencia de tiamina: Es cuando existe una baja disponibilidad de vitamina B1 la cual hace que el organismo tenga sus necesidades metabólicas insatisfechas. Esto puede provocar alteraciones neurológicas, cardiovasculares y metabólicas (Goyer, 2010).

Aducto de ADN: es un complejo molecular que se crea por la unión de una sustancia química reactiva y la base nitrogenada del ácido desoxirribonucleico, el cual interfiere en la estructura del ADN y la reparación celular (Klaassen, 2019).

Lesiones neoplásicas: se origina por una proliferación de células descontroladas que alteran el tejido, causando cambios genéticos y epigenéticos en los mecanismos normales de crecimientos y diferenciación celular (Kumar, Abbas, & Aster, 2021).

Hematuria: se refiere a la presencia de glóbulos rojos en la orina, en medicina veterinaria, se presenta debido a la exposición de sustancias carcinogénicas, como el ptaquilósido presente en *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn (Partin, Dmochowski, Kavoussi, & Peters, 2021).

Gametofito: es la fase haploide (n) del ciclo de vida de las plantas y otros organismos, se despliegan por una espora, a través de divisiones mitóticas, su función es generar los gametos masculinos y femeninos por mitosis (Raven , Evert, & Eichhorn, 2013).

Esporofito: es la fase diploide (2n) del ciclo de vida de las plantas con alternancia de generaciones, nace a partir de la fecundación del cigoto y se encarga de producir esporas haploides. En los helechos, como *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn, el esporófito corresponde a la

planta visible y dominante, formada por raíces, rizomas y frondes, donde se desarrollan los soros que contienen los esporangios responsables de la reproducción (Raven , Evert, & Eichhorn, 2013).

Papilomavirus Bovino (BPV): es un virus de ADN bicatenario que infecta especialmente a los bovinos. La infección se genera principalmente cuando se combina con la exposición prolongada al ptaquilósido presente en *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn, causando tumores en la vejiga urinaria y en el tracto digestivo debido a un efecto carcinogénico sinérgico (MacLachlan & Dubovi, 2017).

Soro: es un conjunto de esporangios que se genera en la cara inferior de las frondes de los helechos, su función es proteger las esporas, las mismas que se crean por meiosis (Raven , Evert, & Eichhorn, 2013).

Espora: es una estructura reproductiva haploide (n) producida por meiosis en los esporangios del esporófito, cuando se dispersa y encuentra condiciones ambientales favorables, germinan y dan origen al gametófito (Raven , Evert, & Eichhorn, 2013).

Raquis: es el limbo de una fronde, la cual constituye a la continuidad del pecíolo y donde se insertan las pinnas. En los helechos proporciona soporte y contribuye a la distribución de los tejidos vasculares (Raven , Evert, & Eichhorn, 2013).

Pinna: se refiere a las divisiones primarias de la lámina de una fronde compuesta en los helechos, como *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn, en donde las pinnas se subdividen en unidades más pequeñas llamadas pínnulas, lo que incrementa la superficie fotosintética y constituye un carácter morfológico importante para la identificación taxonómica (Raven , Evert, & Eichhorn, 2013).

Neoplasia: es un proceso patológico que se determina por el incremento anormal de un grupo de células, el cual afecta al mecanismo normal del ciclo celular. Pueden ser benignas o malignas y desarrollarse en diferentes órganos (Kumar, Abbas, & Aster, 2021).

Fase móvil: es el líquido que transporta los componentes de una muestra, desplazándose a través de la fase estacionaria en un sistema cromatográfico, está constituida por uno o varios disolventes que permiten la separación de los analitos de interés (Fifield & Kealey, 2000).

Fase estacionaria: es la fase en la cual un sistema cromatográfico se mantiene inmóvil, y así, la fase móvil atraviese el sistema, logrando que los componentes de una muestra se separen (Skoog, Holler, & Crouch, 2018).

Alquilación: es una reacción química en la que un grupo alquilo se une a una molécula a través de la formación de un nuevo enlace covalente (McMury, 2021).

Polaridad: es una propiedad química de las moléculas que corresponden a la distribución disímil de las cargas eléctricas en sus enlaces, se origina por contrastes de electronegatividad entre los átomos que las conforman (Atkins & Jones, 2018).

Capítulo III

3.1 Metodología

3.1.1 Enfoque de investigación

La presente investigación tiene un enfoque cuantitativo, debido a que se basó en obtener y analizar los datos experimentales generados mediante el uso de diferentes técnicas de laboratorio para determinar la ausencia o presencia de diferentes toxinas como el ptaquilósido en el helecho en muestras de *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn en el estado fenológico maduro e inmaduro. La información obtenida se registró de manera objetiva. Según Hernández-Sampieri & Mendoza Torres (2018), el enfoque cuantitativo recolecta datos para crear una hipótesis con análisis estadístico con el fin de poder comprobar teorías.

Como complemento a la relación entre la hematuria enzoótica bovina y el helecho macho, se realizaron entrevistas a ganaderos de la zona de Cuellaje en la provincia de Imbabura con el propósito de obtener información sobre la distribución del helecho en esa área, su presencia en las zonas de pastoreo y la incidencia de hematuria en los bovinos, estos datos ayudan a entender los factores de riesgo en esta parroquia.

3.1.2 Tipo y diseño de investigación

El presente estudio es de tipo descriptivo-correlacional debido a que, busca generar conocimiento útil sobre la presencia de compuestos tóxicos en *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn en una parroquia rural Cuellaje, donde no se han realizado anteriormente estos análisis; según Bernal (2016), la investigación aplicada se caracteriza por utilizar el conocimiento científico para contribuir con la solución de problemas específicos.

Tiene un alcance descriptivo-comparativo. Según Hernández-Sampieri & Mendoza Torres (2018), los estudios descriptivos son aquellos que especifican las propiedades, características y perfiles de personas, grupos o fenómenos que sean sometidos a análisis. Este tipo de alcance es el adecuado para este estudio porque en el mismo se caracterizan los

compuestos tóxicos de muestras recolectadas de helecho macho. Por otro lado, tiene un toque comparativo porque se busca evaluar estadísticamente si existe alguna diferencia significativa entre la presencia o ausencia de la toxina al comparar los estados fenológicos maduros e inmaduro.

En cuanto al diseño de la investigación, correspondió a un diseño no experimental ya que las variables de estudio no fueron modificadas o alteradas de forma intencional, limitándose a la observación, muestreo, recolección y análisis de muestras obtenidas en condiciones naturales y sin ninguna alteración. Hernández-Sampieri & Mendoza Torres (2018) mencionaron que los diseños no experimentales son aquellos donde el fenómeno se observa y se recolecta en su entorno natural y real sin ningún cambio realizado por el investigador para su posterior análisis. Además, la investigación presentó un enfoque transversal, ya que este diseño permite definir las variables o fenómenos de interés sin un seguimiento en el tiempo de las muestras estudiadas. En el caso de la investigación se asocia con este tipo de diseño debido a que la información y muestras fueron recolectadas en un único período de tiempo.

Es importante mencionar que la investigación también tuvo dos fases, una de campo y otra de laboratorio. La fase de campo ocurrió en la parroquia rural de Cuellaje, donde las muestras se extrajeron directamente del lugar y se realizaron las entrevistas a ganaderos de la zona, mientras que en el laboratorio se incluyó todos los procesos de análisis y procesamiento de la muestra.

3.2 Población y muestra

3.2.1 Área de estudio

La presente investigación se desarrolló en 3 fincas lecheras activas localizadas geográficamente en Ecuador, en la provincia de Imbabura, Valle de Intag, Cantón Cotacachi, parroquia de Cuellaje, estas fincas fueron seleccionadas por presentar pastizales con poblaciones de *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn donde el ganado era susceptible a una interacción con la especie vegetal y que registraba antecedentes de sintomatología de

hematuria bovina (HEB). Los sitios de muestreo fueron georreferenciados mediante coordenadas geográficas obtenidas durante el trabajo de campo utilizando la aplicación wikiloc, permitiendo identificar de manera exacta cada punto de recolección.

Tabla 2

Coordenadas Geográficas de los puntos de muestreo.

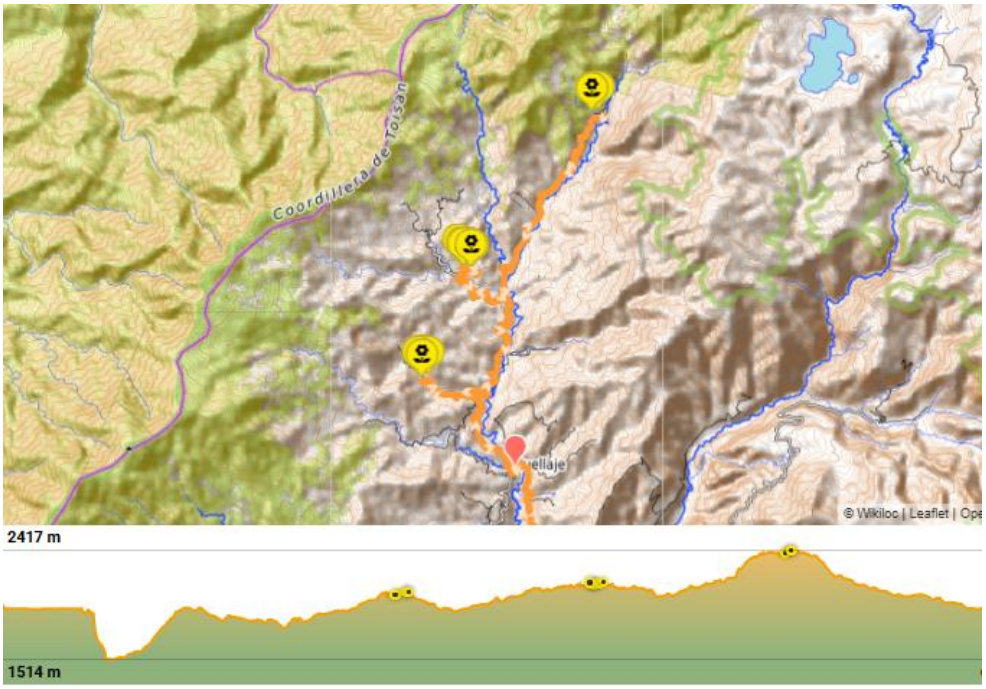
Finca	Código	Localidad	Latitud	Longitud	Altitud (m.s.n.m)
Finca 1	CJ-F1-Z1-M1	Cuellaje	0,423117	-78,548687	2054
	CJ-F1-Z1-I1	Cuellaje	0,423117	-78,548687	2054
	CJ-F1-Z1-M2	Cuellaje	0,4230095	-78, 548430	2046
	CJ-F1-Z1-I2	Cuellaje	0,4230095	-78, 548430	2046
	CJ-F1-Z2-M1	Cuellaje	0,4232243	-78,549082	2058
	CJ-F1-Z2-I1	Cuellaje	0,4232243	-78,549082	2058
	CJ-F1-Z2-M2	Cuellaje	0,422980	-78,549753	2070
	CJ-F1-Z2-I2	Cuellaje	0,422980	-78,549753	2070
Finca 2	CJ-F2-Z1-M1	Cuellaje	0,451997	-78,536768	2125
	CJ-F2-Z1-I1	Cuellaje	0,451997	-78,536768	2125
	CJ-F2-Z1-M2	Cuellaje	0,451360	-78,535522	2118
	CJ-F2-Z1-I2	Cuellaje	0,451360	-78,535522	2118
	CJ-F2-Z2-M1	Cuellaje	0,451658	-78,537882	2123

Finca	Código	Localidad	Latitud	Longitud	Altitud (m.s.n.m)
	CJ-F2-Z2-I1	Cuellaje	0,451658	-78,537882	2123
	CJ-F2-Z2-M2	Cuellaje	0,452203	-78,538223	2118
	CJ-F2-Z2-I2	Cuellaje	0,452203	-78,538223	2118
Finca 3	CJ-F3-Z1-M1	Cuellaje	0,493273	-78,503498	2382
	CJ-F3-Z1-I1	Cuellaje	0,493273	-78,503498	2382
	CJ-F3-Z1-M2	Cuellaje	0,493238	-78,502505	2368
	CJ-F3-Z1-I2	Cuellaje	0,493238	-78,502505	2368
	CJ-F3-Z2-M1	Cuellaje	0,493025	-78,503708	2376
	CJ-F3-Z2-I1	Cuellaje	0,493025	-78,503708	2376
	CJ-F3-Z2-M2	Cuellaje	0,493118	-78,503860	2377
	CJ-F3-Z2-I2	Cuellaje	0,493118	-78,503860	2377

Nota. Elaboración propia a partir de las coordenadas geográficas realizadas durante el trabajo de campo mediante la aplicación Wikiloc (2026).

Figura 10

Ubicación geográfica de los sitios de muestreo de Pteridium aquilinum (L.) Kuhn.



Nota. Adaptado de Wikiloc (2026).

3.2.2 Población

La población del estudio estuvo conformada por la comunidad de *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn presente en *fincas* ganaderas ubicadas en la parroquia de Cuellaje, cantón Cotacachi, provincia de Imbabura donde se han reportado la presencia del helecho en zonas donde alimenta el ganado o zonas cercanas a la planta, Además, en zonas donde se han reportado casos compatibles con hematuria enzoótica bovina.

3.2.3 Muestra

La muestra de este estudio fueron 24 individuos de *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn, dentro de este grupo 12 individuos con un estado fenológico inmaduro y 12 maduros, recolectados de fincas ganaderas en la parroquia de Cuellaje en la zona de pastoreo o zonas cercanas. Para la selección de la muestra se realizó un muestreo no probabilístico por conveniencia, según lo descrito por Espinosa, Bieski, & Martins (2012). Para la recolección de la muestra se consideró la accesibilidad a las fincas, antecedentes de hematuria bovina

enzoótica o sintomatología relacionada y presencia evidente del helecho. Se excluyeron de la investigación las fincas localizadas fuera de la parroquia de Cuellaje, fincas donde se hubieran aplicado herbicidas químicos que puedan afectar el crecimiento normal del helecho común y finalmente muestras que presentaban daños físicos muy graves o muestras con signos de infección.

3.3 Técnica e instrumento

3.3.1 Recolección de las muestras

La recolección de muestras se realizó en las fincas seleccionadas previamente, donde se identificaron poblaciones del helecho que cumplieron con los criterios de inclusión y que estén en un buen estado, es decir que estuvieran libres de plagas, enfermedades o algún daño físico. Las frondas fueron cortadas manualmente utilizando tijeras de poda previamente desinfectadas para evitar cualquier tipo de contaminación.

Con la ayuda de una lupa se fueron identificando las frondas maduras e inmaduras, las mismas de manera separada fueron envueltas delicadamente en papel aluminio con el fin de evitar la exposición prolongada al sol y evitar la degradación de cualquier metabolito de interés. Una vez protegidas se codificó de acuerdo a los códigos asignados con el fin de mantener la trazabilidad durante todo el estudio. Para determinar el estado fenológico maduro e inmaduro se consideró parámetros cómo la expansión foliar, coloración de los soros, estructuras desarrolladas y coloración del tallo.

Finalmente, las muestras fueron almacenadas en una caja térmica de manera temporal hacia su transporte al laboratorio, donde fueron procesadas en los siguientes procesos.

Figura 11

Muestreo de ejemplares de Pteridium aguilinum (L.) Kuhn *en campo.*



Nota. A la izquierda, observación de morfología del helecho; a la derecha, acondicionamiento de las muestras con papel aluminio. Elaboración propia durante la salida de campo (2026).

3.3.2 Codificación y transporte de muestras

El transporte de la muestra se llevó a cabo en un cooler portátil desde la parroquia de Cuellaje hasta el Centro de nanociencia y nanotecnología (CENCINAT) de la Universidad de las Fuerzas Armadas E.S.P.E. ubicada en Sangolquí, durante el recorrido se buscó minimizar la exposición de las muestras a cualquier condición que pueda afectar la estabilidad de los metabolitos.

Por otro lado, para tener un control y mantener la trazabilidad de las muestras se realizó una codificación para las muestras mediante un sistema de codificación con números y con letras que estaban relacionados con información relacionada con el muestreo. Cada código fue registrado en las etiquetas de las fundas.

Tabla 3

Sistema de codificación utilizado durante todo el estudio para las muestras de helecho macho.

Elemento	**Significado**
CJ	Cuellaje
F (1,2,3)	Número de Finca

Z (1,2)	Número de zona
M (1,2)	Estado fenológico Maduro
I (1,2)	Estado fenológico Inmaduro

Nota. El sistema de codificación fue utilizado para garantizar la identificación, organización y trazabilidad de las muestras en los diferentes procedimientos realizados con las mismas.

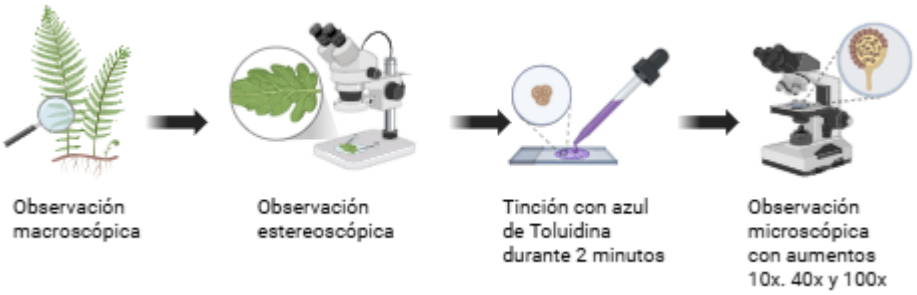
3.3.3 Caracterización botánica

La caracterización botánica de las muestras se realizó con el propósito de verificar las características morfológicas de la especie, también para identificar las posibles diferencias entre los estadios fenológicos del helecho maduro e inmaduro. Inicialmente se realizó la evaluación macroscópica de las muestras completas considerando aspectos como el tamaño, disposición de los segmentos foliares, coloración, entre otros parámetros. Esta observación permitió reclasificar entre frondas en diferentes estados fenológicos y corroborar que las características sean las de la especie *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn.

Después de este procedimiento se realizó una observación más detallada utilizando un estereoscopio, para examinar estructuras presentes en las frondas como la superficie foliar, disposición y coloración de los soros. Finalmente, en este proceso se obtuvieron las esporas del helecho macho con ayuda de agujas, las mismas fueron teñidas por un tiempo de cinco minutos con el tinte azul de Toluidina que es muy utilizado debido a que tiene la capacidad de resaltar algunas estructuras celulares y permite diferenciar entre ellas. Posteriormente se colocaron en una placa y se observaron las esporas en diferentes aumentos de 10x, 40x y 100x.

Figura 12

Resumen visual de la caracterización botánica



Nota. Elaboración propia con apoyo del programa Biorrender.

3.3.4 Secado del material vegetal

Las frondas de helecho macho fueron pesadas en fresco y transferidas a bolsas de papel previamente codificadas según correspondía, después las muestras fueron sometidas a un proceso de secado en estufa marca ESCO con sistema de vacío durante cuatro días a una temperatura de 35°C, con el propósito de retirar toda el agua presente en la planta favoreciendo la conservación de los metabolitos presentes en la planta y asegurando el buen estado de la muestra.

Las muestras fueron pesadas en una balanza marca Briden durante todos los días para evaluar la pérdida de humedad, hasta el día cuatro donde no hubo variación entre el día tres y cuatro. Durante todo el proceso de secado se realizaron aperturas de la puerta de la estufa para facilitar la entrada de aire y la eliminación de la humedad. Adicionalmente la posición de las bolsas de papel se reportó con el fin de que todas las muestras tengan un correcto secado.

3.3.5 Molienda

Una vez que se verificó que las muestras hayan tenido un correcto secado se procedió a la molienda con el propósito de aumentar el área superficial de la muestra. Este aumento de área superficial hace que exista una mejor interacción solvente del helecho macho facilitando la liberación de metabolismo secundarios.

Para la molienda se cortó trozos de la muestra de aproximadamente 1 cm para facilitar su procesamiento, después se colocó los fragmentos en un molino de cuchillas hasta alcanzar

un tamaño de partícula de 0,2 mm, se procedió a pesar cada muestra y se colocó en tubos Falcón con la codificación correspondiente.

Figura 13

Proceso de molienda del material vegetal



Nota. A la izquierda, molienda del material mediante el molino de cuchillas; a la derecha, material vegetal hecho polvo. Elaboración propia durante el procedimiento de laboratorio (Hernández, 2026).

3.3.6 Macerado

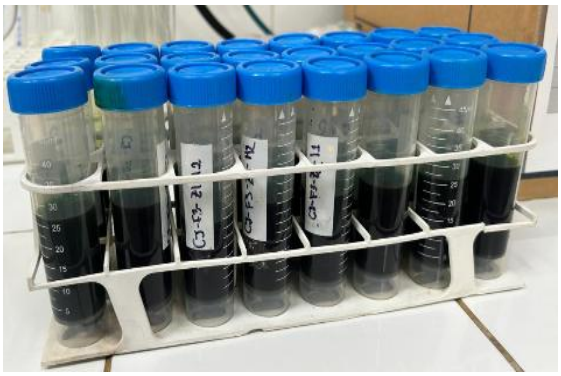
Para la extracción de los metabolitos secundarios se pesó 2 g de la muestra molida, y se guardó el restante en bolsas herméticas metalizadas. Posteriormente la muestra fue colocada en tubos Falcon de 50mL y se añadieron 20 mL de etanol al 100%, se realizó una relación 1:10 (p/v). Las muestras se agitaron por tres días utilizando un agitador orbital a 150 rpm con el fin de favorecer el contacto solvente-muestra. Al pasar los tres días, los extractos fueron sometidos a ultra sonicación en un baño de agua ultrasónico durante 30 minutos.

Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 10000 r.p.m durante 10 minutos para contribuir a la separación del solvente y la muestra. El sobrenadante que se obtuvo fue

separado cuidadosamente y colocado en otro tubo falcón de 50 mL, mientras que a la otra parte se le colocó 20 mL de etanol al 70% para poder incrementar el rendimiento de la extracción, se dejó macerar por dos días más. Después, con la segunda etapa de extracción se repitió el proceso de ultrasonido y centrifugación. Finalmente se combinaron los dos sobrenadantes en un mismo tubo, extracto que será utilizado en las etapas posteriores.

Figura 14

Maceración etanólico de las muestras de Pteridium aquilinum (L.) Kuhn



Nota. Macerado etanólico de las muestras de helecho macho. Elaboración propia (2026).

3.3.7 Concentración del extracto etanólico

Después de combinar los sobrenadantes se tomó 5 mL del extracto etanólico y se colocó en un tubo delgado de vidrio previamente identificado. Posteriormente, las muestras fueron colocadas en un concentrador de muestras configurado a una temperatura de 50°C y adaptado a una corriente de nitrógeno. Bajo estas condiciones el solvente fue eliminado de los tubos en un tiempo de 1 hora y 30 minutos. Las muestras fueron concentradas hasta sequedad y posteriormente suspendidas en metanol acuoso.

Figura 15

Etapa de concentración del extracto etanólico de helecho macho mediante una corriente de nitrógeno.



Nota. A la izquierda se observa el concentrador de muestras utilizado para evaporar el solvente; a la derecha se observa el extracto etanólico antes de la concentración y la concentración a sequedad. Elaboración propia durante el procedimiento de laboratorio (2026).

3.3.8 Eliminación de Clorofila

Para lograr reducir la presencia de clorofilas y otros compuestos lipofílicos, se realizó una etapa de desengrase o eliminación de la clorofila mediante una extracción líquido- líquido utilizando 3 mL de n-heptano y 3 mL del extracto metanólico teniendo una relación 1:1. Primero se colocó el extracto en un embudo de decantación y después el n-heptano. La mezcla se sometió a una agitación orbital durante 3 minutos a 150 r.p.m, se recuperó la fase inferior y se descartó la fase superior

Figura 16

Etapa de eliminación de clorofila mediante una extracción líquido-líquido utilizando un embudo de decantación.



Nota. A la izquierda se observa el embudo de decantación acoplado al agitador orbital; a la derecha se observa la separación entre fases donde la fase superior corresponde a la fracción rica en clorofilas y compuestos lipofílicos, mientras que la fase inferior corresponde al extracto con los metabolitos de interés. Elaboración propia durante el procedimiento de laboratorio (2026).

3.3.9 Hidrólisis básica

Una vez obtenida la fracción libre de clorofila se procedió a realizar la hidrólisis básica con el fin de realizar algunas modificaciones químicas. Se empezó midiendo el pH inicial de cada muestra, después se ajustó el pH en un rango de 10 a 11 unidades de pH mediante la adición de hidróxido de sodio (NaOH). Una vez alcanzado el pH las muestras fueron incubadas

en baño María durante 1 hora a 40 °C. Finalmente, el pH fue neutralizado con ácido clorhídrico (HCL). Siguiendo el protocolo modificado descrito por Cáceres-Peña *et al.* (2013)

3.3.10 Cromatografía en capa fina (TLC)

La identificación de los compuestos presentes en el extracto se realizó mediante TLC, se utilizó placas de sílica gel como fase estacionaria y como fase móvil una solución de diclorometano (DCM) y metanol en una proporción 9:1. Previo a la corrida cromatográfica se trazó una línea base a 1,5 cm de distancia del borde inferior de la placa sobre el cual se aplicaron las muestras y el estándar de pterosina A con una concentración de 6 ppm. Los puntos se aplicaron a una distancia de 1cm entre ellos y 1,5 cm del borde con el fin de evitar las interferencias por efecto borde. En cada aplicación de las muestras se esperó un lapso de tiempo para que la mancha seque completamente. Posteriormente se insertó la placa en la cámara correspondiente y la corrida se realizó hasta el 80% de la longitud de la placa.

Después, las placas fueron reveladas con una solución de anisaldehído al 5% utilizando un pulverizador con bomba verificando una distribución uniforme del revelador. Las placas fueron sometidas a calentamiento con el fin de visibilizar algunos compuestos. Finalmente, las plantas fueron observadas bajo luz visible y bajo luz ultravioleta, se registró la presencia de manchas y se procedió a sacar los factores de retardo (Rf) correspondientes.

Figura 17

Desarrollo y revelado cromatográfico de los extractos del helecho macho mediante TLC



Nota. A la izquierda se observa la corrida cromatográfica en una cámara previamente saturada con DCM: metanol (9:1); a la derecha se observa el calentamiento de la placa cromatográfica después del revelado. Elaboración propia durante el procedimiento de laboratorio (2026).

3.3.11 Análisis estadístico

Los datos fueron organizados en hojas de cálculo de Excel y procesados en el programa estadístico R estudio, versión 4.5.2. En el primer objetivo al ser netamente cualitativo no se ocupó estadística, para el segundo objetivo correspondiente a la evaluación de la presencia de toxinas, se clasificó según la señal detectables aquellas que tenían presencia y ausencia de esta señal. Se calcularon frecuencias absolutas y porcentajes.

3.4 Consideraciones éticas

La presente investigación se desarrolló respetando los criterios de responsabilidad ética. Además, se realizó una consideración ética hacia el entorno natural. Durante las actividades de campo, la recolección de las muestras de *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn se efectuó de manera controlada en presencia de técnicos del GAD de Cuellaje y el tutor de tesis, procurando evitar cualquier alteración de las poblaciones naturales presentes en la zona de muestreo.

De igual manera, la recopilación de información mediante entrevistas contó con la participación libre y voluntaria de los propietarios de las fincas donde se realizó el muestreo. Los datos personales de las personas entrevistadas son totalmente confidenciales.

El presente estudio no involucró procedimientos invasivos, ni intervención directa sobre animales. El trabajo se limitó a la obtención y análisis de muestras vegetales de *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn. Finalmente, todas las etapas de investigación fueron desarrolladas siguiendo principios de objetividad, rigurosidad científica y transparencia metodológica. Los datos obtenidos fueron registrados, analizados e interpretados de manera imparcial, garantizando la veracidad de los resultados y el cumplimiento de la honestidad (Ministerio del Ambiente del Ecuador, s.f.).

Capítulo IV

Análisis y discusión de los resultados

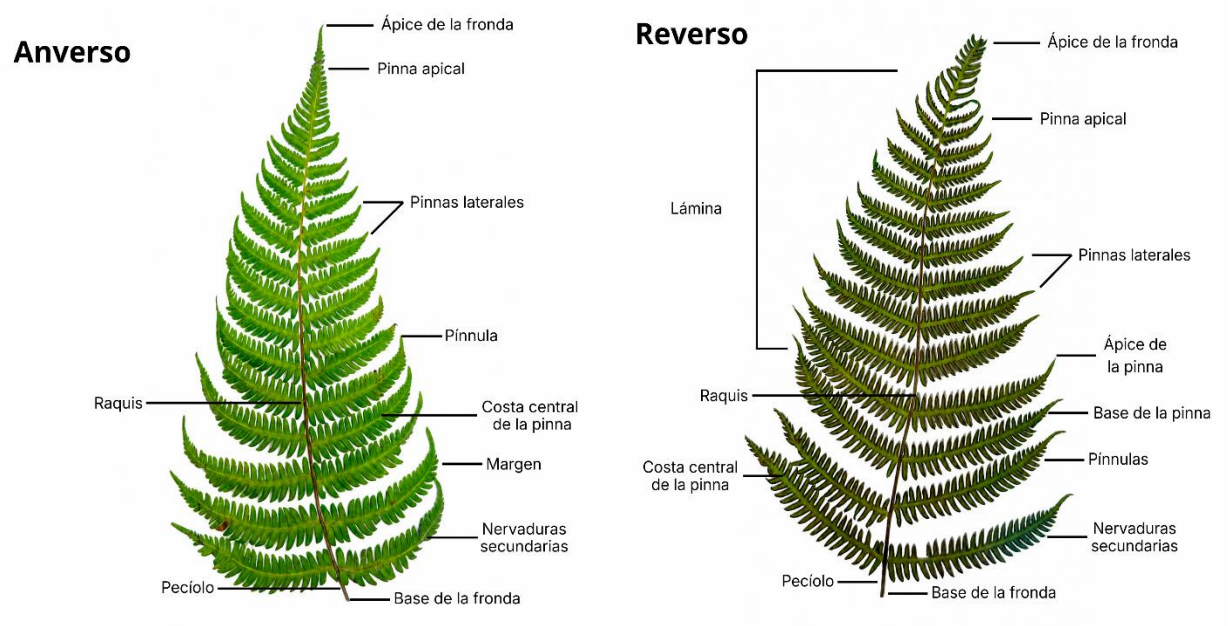
4.1 Caracterización Botánica del Helecho *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn.

La evaluación de la caracterización se orientó al reconocimiento y descripción de las características morfológicas visibles en los diferentes estados fenológicos encontrados en el muestreo, en este apartado se consideró parámetros como la forma, división, coloración y organización de sus estructuras. La caracterización se realizó mediante observaciones a nivel macroscópico, estereoscópico y microscópico.

A continuación, se presentan las observaciones fenotípicas.

Figura 18

Caracterización macroscópica de la superficie abaxial y abaxial de una lámina de Pteridium aquilinum (L.) Kuhn.



Nota. A la izquierda, el anverso. Se identifica el ápice de la fronda, la pinna apical, las pinnas laterales, las pínulas, el raquis, la costa central de las pinnas, las nervaduras secundarias, el

margen, el pecíolo y la base de la fronda. A la derecha, el reverso, se observan las mismas estructuras y la superficie abaxial. Fuente: elaboración propia.

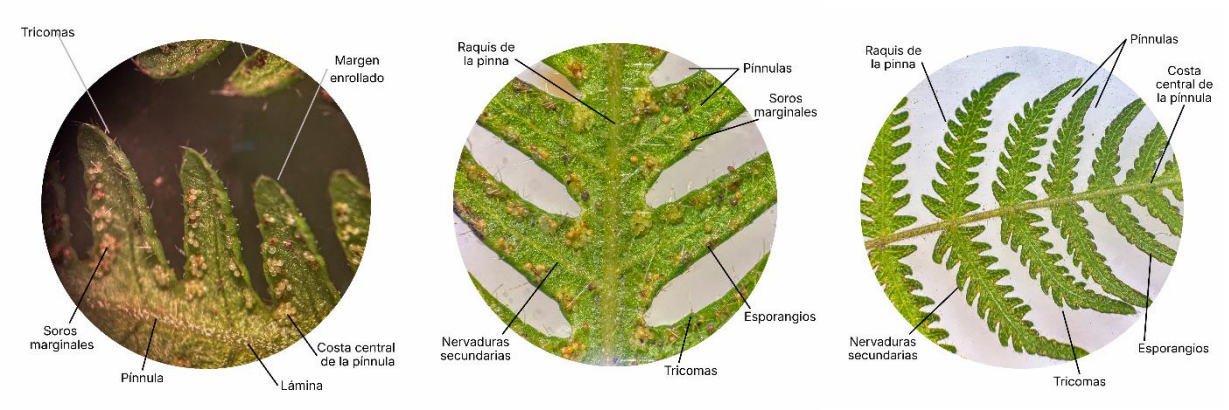
La observación morfológica de las muestras recolectadas permitió reconocer una estructura foliar dividida con numerosas pínulas dispuestas lateralmente que a medida que se acercan al ápice van disminuyendo su tamaño, dándole esa forma de pluma característica de los helechos del género *Pteridium* (Thomson, 2016). El autor se refiere a un sistema de ramificación foliar organizado, debido a que, su construcción incorpora una secuencia de unidades que van decreciendo su volumen.

Encontramos una diferenciación entre la superficie abaxial y el margen de las pínulas entre el lado anverso y reverso, ya que, en la superficie abaxial podemos ver claramente la colocación de las nervaduras y las zonas de la lámina. Es decir, que el reverso nos ayuda a obtener una descripción y orientación taxonómica. También, fue visible la reducción gradual de las pinnas desde la base hacia el ápice, su silueta triangular y como las pinnas se encuentran divididas en pínulas estrechas y consecutivas que se unen a través de la costa central; es así, que el raquis cumple la función de eje de soporte de la fronda (Page, 1976).

La denominación *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn ha sido utilizada para agrupar numerosos hechos del mismo género, teniendo afinidad con los taxones gondwánica que están distribuidos por el hemisferio sur, en el occidente y norte de Sudamérica, además de las islas Galápagos (Schwartsburd, Yañez, & Prado, 2018).

Figura 19

Caracterización estereoscópica del revés de Pteridium aquilinum (L.) Kuhn en una fronda inmadura.



Nota. Se muestran ampliaciones de la superficie abaxial de la fronda, en las que se identifican los soros marginales, esporangios, tricomas, nervaduras secundarias, consta central de la pínnula y margen enrollado. Fuente: elaboración propia.

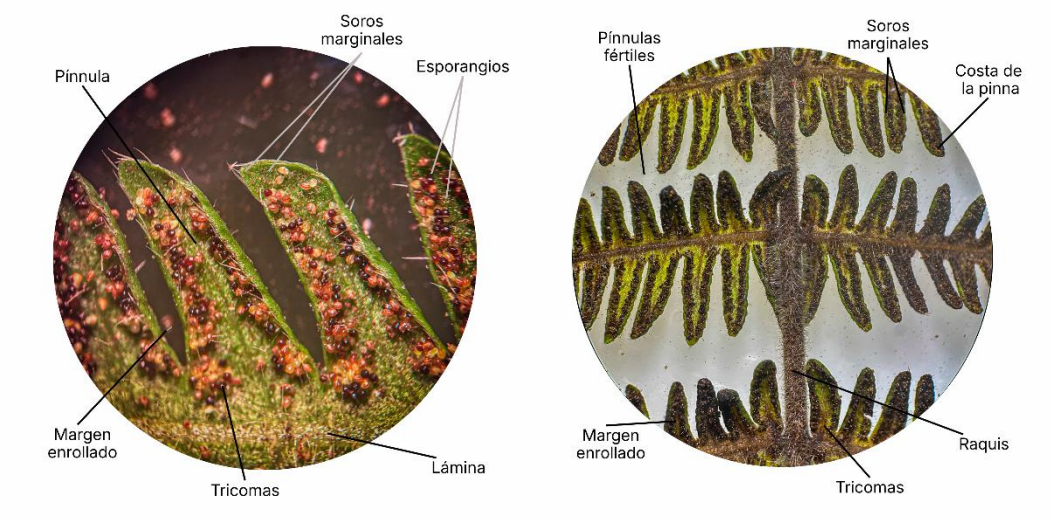
La observación estereoscópica nos permite examinar su estado fenológico, observamos que en el ejemplar inmaduro mantiene una coloración verde en la lámina y las nervaduras; pero en su estructura un tono más claro. Se puede distinguir los soros distribuidos en posición marginal, acompañados por esporangios y protegidos por el margen enrollado de las pínnulas. Esta disposición constituye un rasgo característico del género *Pteridium*, en el que los soros forman líneas continuas cerca al borde de la lámina, los cuales están cubiertos por un indusio interno (Brownsey & Brownsey, 1989).

No todas las estructuras presentaron un mismo desarrollo, algunas pínnulas los soros marginales se observaron como depósitos verdes y marrones, mientras que en otras se confunden con el tejido foliar, esa diferenciación se debe a la maduración progresiva de los esporangios dentro de una fronda, la cual, conforme va madurando y debido al envejecimiento de los tejidos, los soros toman un color más oscuro asociado a estructuras reproductivas más florecientes y próximas a la liberación de esporas. Es decir, que la diferenciación de tonalidades son un indicador del avance del ciclo reproductivo y no significan la ausencia de soros.

Además de las estructuras reproductivas, los tricomas están distribuidos sobre la lámina y las nervaduras, en la muestra inmadura estos destacaron por su contraste con el tejido verde; la costa central y las nervaduras secundarias se extienden hacia los bordes donde se desarrollan los soros, confirmando así que las acumulaciones provienen de las estructuras reproductivas. Zenkteler, Michalak, & Nowak (2022) describieron que los soros de *Pteridium* se encuentran asociados con un receptáculo marginal y con indusios membranosos cuya forma y grado de desarrollo pueden modificar su apariencia externa.

Figura 20

Caracterización estereoscópica del revés de Pteridium aquilinum (L.) Kuhn en una fronda madura.



Nota. Se observan soros marginales en el borde de las pínnulas; los esporangios, tricomas, el margen enrollado, la lámina, la costa de la pinna y el raquis. Fuente: elaboración propia.

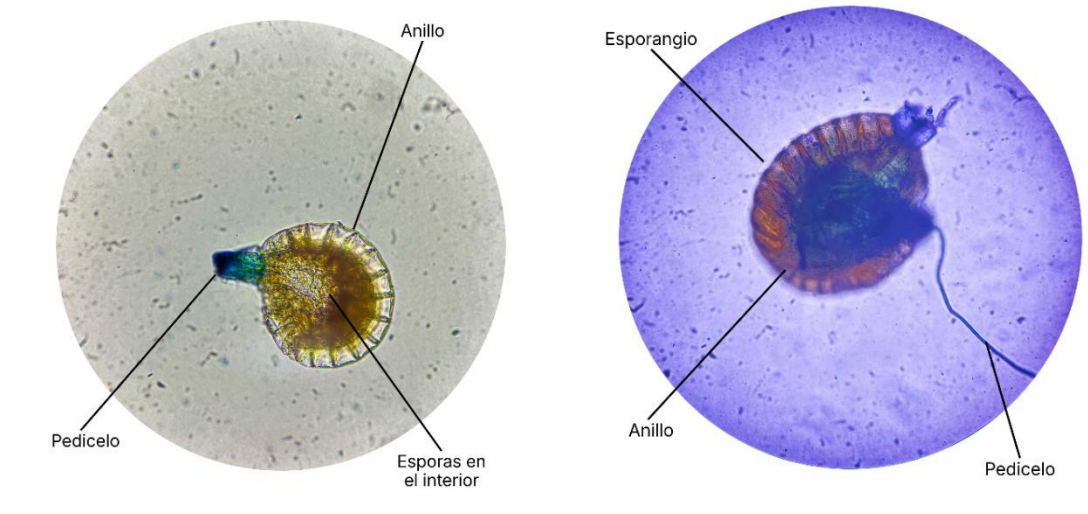
En la muestra se observan soros marginales más densos, continuos y diferenciados del tejido foliar. Los esporangios tienen tonalidades rojizas, el margen enrollado persistió como una organización preventiva de la zona soral y totalmente visible. También, se visualizan tricomas sobre la superficie abaxial junto a la costa de la pinna y el raquis, los cuales tienen una tonalidad más oscura que del material inmaduro.

En la fronda madura presenciamos una organización reproductiva más definida que la muestra inmadura, sobro todo por la continuidad de los soros en el margen de las pínnulas y por la gran ostentación de los esporangios. En *Pteridium*, los soros se desarrollan sobre un receptáculo marginal y se encuentran protegidos por estructuras membranosas y por el borde reflejo de la lámina; cuando estas estructuras alcanzan un mayor grado de desarrollo, la línea soral se vuelve más evidente y uniforme (Zenkteler, Michalak, & Nowak, Characteristics of indusia and sori in the two subspecies of *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn occurring in Poland, 2022).

Algunas otras diferencias son que en la fronda inmadura todavía notamos la presencia de zonas verdes y soros poco parecidos, la materia madura mostro tejidos reproductivos más espesos, además, la apariencia de pínnulas fértiles que permitieron distar las regiones reproductivas de las porciones vegetativas de la lámina.

Figura 21

Caracterización microscópica de esporangios de Pteridium aquilinum (L.) Kuhn en estados fenológicos inmaduro y maduro.



Nota. Esporangio inmaduro de inmaduro y esporangio maduro. Fuente: Elaboración propia.

Mediante la caracterización microscópica reconocimos en ambas muestras el pedicelo, la capsula del esporangio y el anillo. En el ejemplar inmaduro destacamos la presencia de una cápsula amarillenta en cuyo interior se encuentran cuantiosas partículas relacionadas con esporas retenidas. Y en el material maduro, el esporangio tiene una apariencia más compacta, una pared más delimitada y un anillo diferente, debido a que el hilo de células especializadas abre la cápsula para la liberación de esporas. En *P. aquilinum*, las esporas maduras presentan morfología globosa, condición trilete y ornamentación granulada, caracteres que respaldan el valor de la observación microscópica para estudiar la fase reproductiva de la especie (Eslava-Silva, Jiménez-Durán, Jiménez Estrada, & Muñiz Díaz de León, 2020).

En el esporangio inmaduro presenciamos que la cápsula mantiene a las esporas en su interior, mientras que en el esporangio maduro el anillo ocupa una parte de la pared y el pedicelo, siendo lo que une al receptáculo del soro. Ramírez-Trejo, Pérez-García, Mendoza-Ruiz, Valdez-Avila, & Espinosa-Matías (2013) trabajaron con pinnas fértiles que presentaban esporangios maduros y señalaron que el secado del material favorecía la liberación de las esporas, lo que demuestra que la madurez y la pérdida de humedad están estrechamente relacionadas con la apertura del esporangio. Cabe recalcar, que ambas muestran mantienen la misma organización básica, pero se distinguen debido a que la muestra madura representa una fase más próxima a la dispersión y la inmadura se encuentra un proceso de formación de esporas. La observación microscópica nos permite constatar su estado estructural, Sheffield, y otros (1993) encontraron esporangios externamente no abortivos y esporas aparentemente bien formadas, aunque algunas presentaron alteraciones y diferencias en su capacidad de germinación.

4.2 Evaluación de la presencia de toxinas en *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn

Como parte del proceso de extracción y determinación del ptaquilósido se realizó un proceso de secado con el fin de garantizar la estandarización del material vegetal utilizado en la extracción, para ello se evaluó la masa cada 24 horas durante los 4 días de secado. Las muestras estuvieron divididas por estado fenológico maduro e inmaduro. El comportamiento durante el secado se evalúo en la tabla encontrada en la parte inferior.

Tabla 4

Variación de masa en muestras de Pteridium aquilinum (L.) Kuhn durante el proceso de secado según el estado fenológico.

Estado fenológico	n	Masa inicial (g)	Día 1 (g)	Día 2 (g)	Día 3 (g)	Día 4 (g) Masa final
Inmaduro	12	28,61±6,37	18,92±4,78	14,85±3,27	10,78±2,14	10,72±2,13
Maduro	12	26,90±8,23	16,52±3,90	13,62±2,94	10,72±2,69	10,67±2,68
Total	24	27,75±7,25	17,72±4,44	14,24±3,11	10,75±2,38	10,70±2,37

Nota. Los valores corresponden a la media ±desviación estándar. Masa inicial corresponde a la masa antes del secado, es decir el material fresco y el Día 4 representa la masa seca al final.

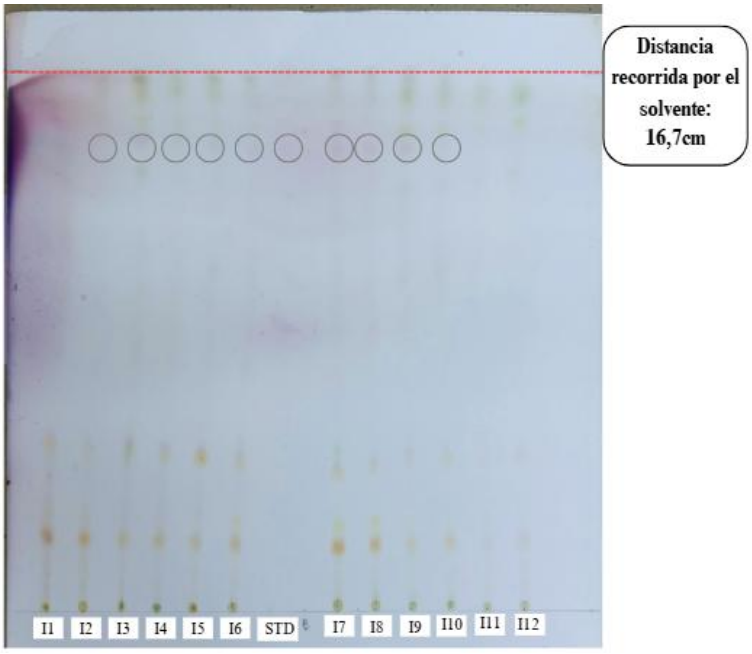
Como se puede observar en la tabla ambos estados fenológicos presentaron una disminución progresiva durante el proceso de secado, las muestras inmaduras pasaron de 28,61± 6,37 g a 10,72±2,13 g, mientras que las muestras maduras pasaron de 26,90±8,23 g a 10,67± 2,68 g, donde la mayor pérdida de agua ocurrió en los primeros días. Al finalizar el secado, las masas en los días 3 y 4 fueron semejantes, con una variación de 0,06 g en las masas finales, como se pudo observar al día 4 la masa se volvió constante razón por la cual no se continuó con el proceso de secado. Babu, Kumaresan, Antony Aroul Raj, & Velraj (2020)

trabajaron con el secado de hojas y en su investigación establecieron un criterio donde las muestras se consideran secas cuando la modificación de su masa entre mediciones consecutivas fue menor al 1%. Por otro lado, la dispersión observada en las masas se relaciona principalmente con la diferencia en el peso inicial de las muestras independientemente del estado fenológico o la finca. Esto quiere decir que las unidades experimentales son uniformes en cuanto a material vegetal.

Una vez iniciado el 4 día, el material fue pulverizado para favorecer la homogeneidad y aumentar la superficie de contacto con el solvente durante la extracción. De esta manera se pudo obtener extractos más comparables para el análisis cromatográfico. La Cromatografía en capa fina (TLC) permitió obtener y comparar los perfiles cromatográficos de los estados fenológicos maduros e inmaduros.

Figura 22

Perfil cromatográfico de los extractos de frondas inmaduras de Pteridium aquilinum (L.) Kuhn observado bajo la luz visible.



Nota. Los carriles del I1 al I12 corresponden a los extractos de frondas inmaduras de las muestras de helecho macho y el carril STD es el estándar de Pterosina. La separación se realizó empleando una fase móvil de Diclorometano: Metanol (9:1). Los círculos grises encierran a las manchas coincidentes con pterosina A. La distancia de corrida del solvente fue de 16,7cm.

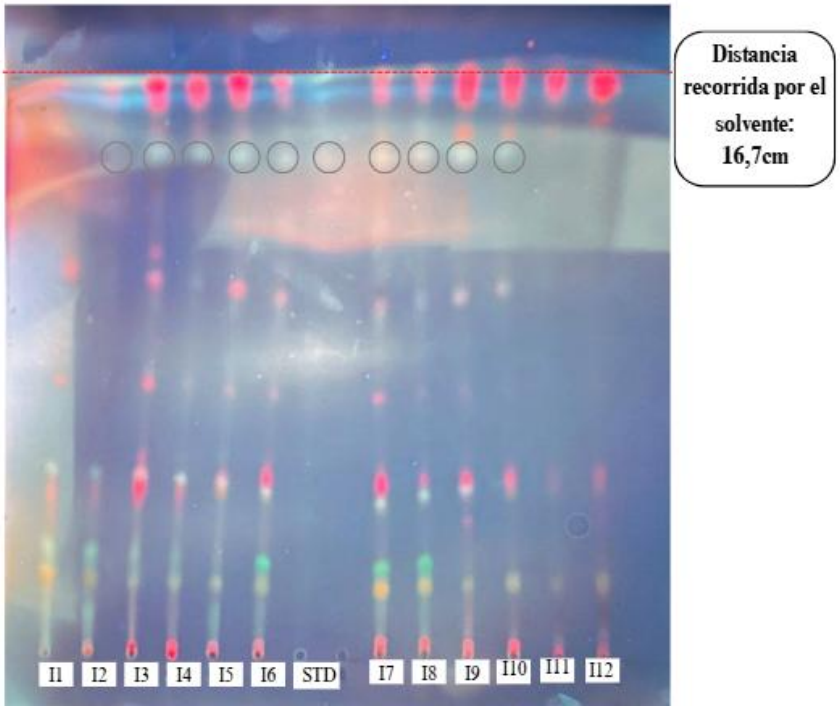
En la placa cromatográfica se observaron manchas de baja intensidad distribuidas en diferentes alturas, en la parte inferior predomina manchas naranjas claro visibles en la mayoría de carriles, en diferente intensidad. Las manchas fueron más evidentes en el carril I1, I2, I3, I4, I5, I7 Y I8.

En la parte superior, muy cercano a la línea de corrida del solvente se observaron manchas verdes amarillentas difusas. Por otro lado, lo que más destacó fue la zona delimitada por los círculos grises, ya que con un Rf= 0,8263 estas manchas fueron similares a las del estándar en distancia recorrida y tonalidad. La baja intensidad de las señales hace que estas manchas se registren como presuntivamente compatibles con la pterosina. La coloración violeta irregular observada en el borde derecho no forma parte de un carril definido, por lo que se considera una alteración relacionada con el proceso de revelado.

Con el propósito de caracterizar el perfil cromatográfico de los extractos de frondas maduras, se midió la distancia recorrida por cada uno de las manchas y se calculó su respectivo Rf, tomando en cuenta la distancia de corrida del solvente de 16,7 cm dio como resultado un Rf de 0,826.

Figura 23

Perfil cromatográfico de los extractos de frondas inmaduras de Pteridium aquilinum (L.) Kuhn observado bajo la luz UV de onda larga.



Nota. Los carriles I1 al I12 corresponden a la separación cromatográfica de los extractos de frondas maduras analizadas del helecho macho, el carril de STD corresponde al estándar de pterosina A. La placa fue observada bajo luz ultravioleta de onda larga a los 365nm. Los círculos señalan bandas blancas fluorescentes localizadas a 13,8 cm desde la línea base.

Al observar la placa cromatográfica bajo luz ultravioleta permitió distinguir diversas señales fluorescentes. En la parte superior se observaron manchas naranjas amarillento fluorescente a una distancia de 2,2 cm y con un Rf de 0,1317, esta mancha está a la misma distancia que la mancha naranja claro. Se observaron manchas naranja-amarillentas en la mayoría de carriles. Al observar con luz UV se puede evidenciar claramente la banda correspondiente al estándar de pterosina A de un color blanco pálido fluorescentes a una distancia de 13,8 cm con un Rf de 0,8263, esta mancha lo presentan todos los carriles a excepción de I1, I11 Y I12.

Tabla 5

Detección presuntiva de Pterosina A enfrondas inmaduras de Pteridium aquilinum (L.) Kuhn.

Carril	Código de muestra	Rf observado	Color aparente	Resultado cualitativo
I1	CJ-F1-Z1-I1	-	-	Ausencia
I2	CJ-F1-Z1-I2	0,826	Blanco pálido	Presencia
I3	CJ-F1-Z2-I1	0,826	Blanco pálido	Presencia
I4	CJ-F1-Z2-I2	0,826	Blanco pálido	Presencia
I5	CJ-F2-Z1-I1	0,826	Blanco pálido	Presencia
I6	CJ-F2-Z1-I2	0,826	Blanco pálido	Presencia
I7	CJ-F2-Z2-I1	0,826	Blanco pálido	Presencia
I8	CJ-F2-Z2-I2	0,826	Blanco pálido	Presencia
I9	CJ-F3-Z1-I1	0,826	Blanco pálido	Presencia
I10	CJ-F3-Z1-I2	0,826	Blanco pálido	Presencia
I11	CJ-F3-Z2-I1	-	-	Ausencia
I12	CJ-F3-Z2-I2	-	-	Ausencia

Nota. Se consideró la presencia de las muestras que presentaron una mancha blanca fluorescente en el perfil cromatográfico con un valor de Rf similar al que marca el estándar.

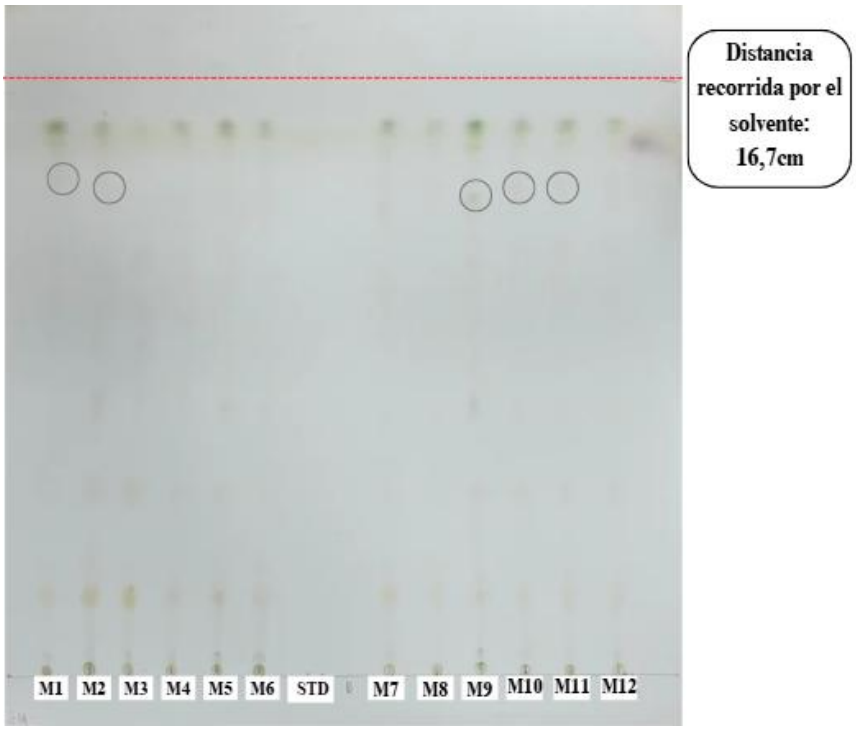
Se identificaron manchas compatibles con pterosina A en las frondas maduras 9 de 12 muestras analizadas obtuvieron el mismo Rf con el estándar, representando un 75%. Lams muestras donde se evidenció presencia fueron I2, I3, I4, I5, I6, I7, I8, I9, I10. Por el contrario, en el 25% de las muestras analizadas no se observó ninguna señal definida.

Al analizar los resultados finca por finca, se obtuvo en la finca 1 se detectaron 3 manchas de 4 muestras analizadas correspondiente al 75%, la finca 2 presentó 4 de las muestras analizadas presentaron cualitativamente pterosina A correspondiente al 100%, la

finca 3 registró el 50% de las señales de interés. Por lo tanto, la mayor frecuencia de detección se presentó en la finca 2.

Figura 24

Perfil cromatográfico de los extractos de frondas maduras de Pteridium aquilinum (L.) Kuhn observado bajo la luz visible.



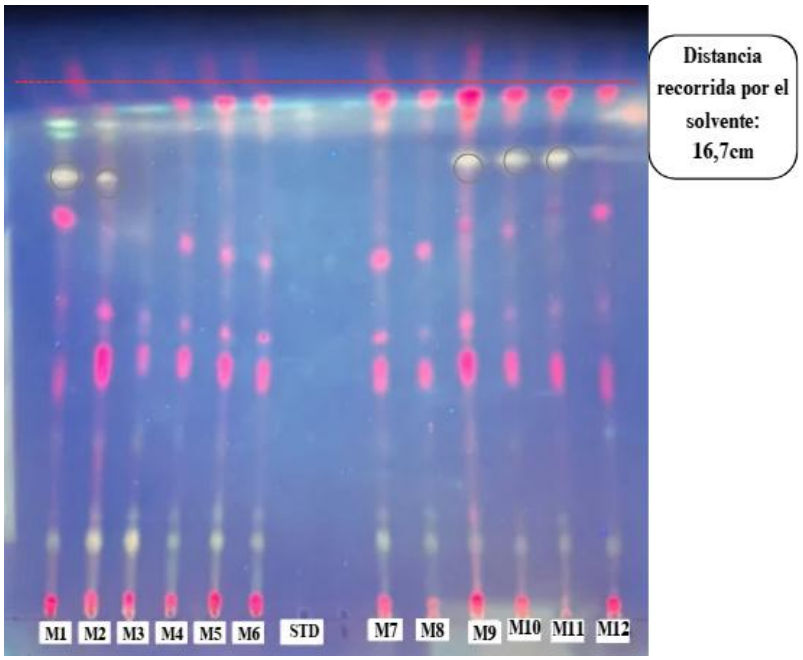
Nota. Los carriles desde M1 al M12 corresponden a los extractos obtenidos de frondas maduras de helecho macho y el carril STD corresponde el estándar de pterosina A. Debido a la baja intensidad de las manchas el estándar no se logró distinguir en esta fotografía.

Bajo luz visible se presentó unas pocas manchas visibles, pero de baja intensidad en diferentes tonalidades, en la parte inferior de la placa se logró observar la mancha amarilla clara, misma que estaba presente en todos los carriles con diferente intensidad. Cerca de la línea donde corrió el solvente se evidenciaron manchas verde-amarillentas. En la región de interés que sería la de los círculos grises se lograron distinguir manchas violetas muy pálidas,

en los carriles M1, M2, M9, M10, M11, mientras que en los otros carriles no se reportó la presencia de señales relacionadas con la pterosina.

Figura 25

Perfil cromatográfico de los extractos de frondas maduras de Pteridium aquilinum (L.) Kuhn observado bajo la luz UV lejana.



Nota. La placa fue examinada bajo luz ultravioleta de onda larga a 365nm. STD es el estándar cuya banda no se distingue con claridad.

Al observar la placa bajo luz ultravioleta se pudo apreciar de mejor manera el perfil cromatográfico. Un patrón que se repite tanto en las muestras maduras e inmaduras es la mancha en tonalidades naranjas ubicada a una distancia de 2,1 y con un Rf de 0,12. Con un Rf de 0,826 se logró identificar la posible presencia de pterosina A en los carriles M1, M2, M9, M10, M11.

Tabla 6

Detección presuntiva de Pterosina A enfrondas inmaduras de *Pteridium aquilinum (L.) Kuhn.*

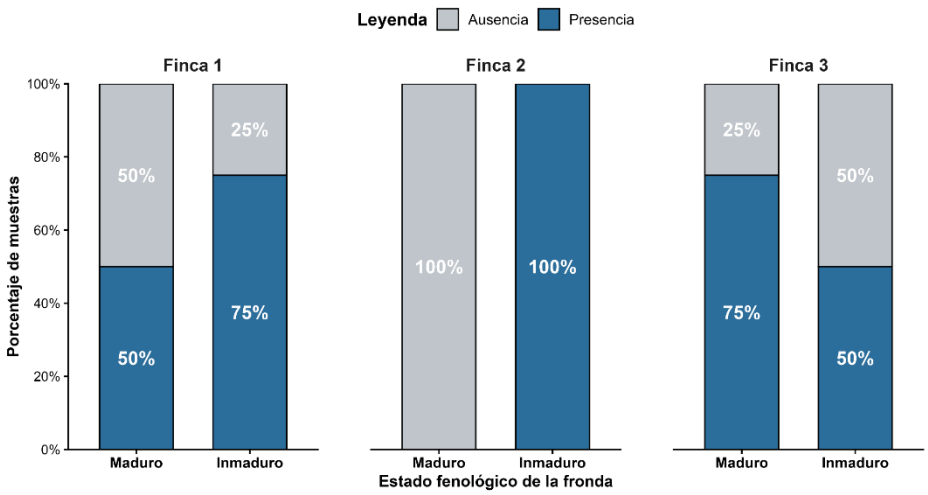
Carril	Código de muestra	Rf observado	Color aparente	Resultado cualitativo
M1	CJ-F1-Z1-M1	0,826	Blanco	Presencia
M2	CJ-F1-Z1-M2	0,826	Blanco	Presencia
M3	CJ-F1-Z2-M1	-	-	Ausencia
M4	CJ-F1-Z2-M2	-	-	Ausencia
M5	CJ-F2-Z1-M1	-	-	Ausencia
M6	CJ-F2-Z1-M2	-	-	Ausencia
M7	CJ-F2-Z2-M1	-	-	Ausencia
M8	CJ-F2-Z2-M2	-	-	Ausencia
M9	CJ-F3-Z1-M1	0,826	Blanco	Presencia
M10	CJ-F3-Z1-M2	0,826	Blanco	Presencia
M11	CJ-F3-Z2-M1	0,826	Blanco	Presencia
M12	CJ-F3-Z2-M2	-	-	Ausencia

Nota. El Rf establecido por el estándar es de 0,826; (-) significa la ausencia de una banda visible que permitiera describir el Rf.

En la tabla 6 se presentaron los resultados cualitativos de 12 muestras de helecho águila en estado maduro. Se logró identificar la presencia del compuesto de interés en 5 de las 12 muestras, en los carriles M1, M2, M9, M10 y M11. En todas las muestras anteriormente mencionadas se registró una mancha color blanca con un Rf de 0,826 similar a la del estándar de pterosina A, es por esta razón que se les clasificó de manera cualitativa dentro de las muestras con presencia del compuesto.

Figura 26

Gráfico de barras apiladas y estratificado por fincas de Cuellaje según el estado fenológico de las muestras de las frondas de Pteridium aquilinum (L.) Kuhn.



Nota. Cada barra representa el 100% de las muestras analizadas en cada finca y según su estado fenológico: maduro e inmaduro. Los segmentos representan la proporción en % de la cantidad de muestras donde se presentó ausencia o presencia aparente de la toxina.

La distribución de los porcentajes de los resultados presentó que existen algunas variaciones entre fincas. Por ejemplo, en la finca 1 las muestras registraron igual proporción en presencia y ausencia de pterosina A en el estado fenológico inmaduro, mientras tanto en el estado fenológico inmaduro el 75% registraron presencia de este compuesto. Por otro lado, en la finca 2 fue muy evidente la diferencia entre los estados fenológicos maduro e inmaduro; donde se registraron valores de 0% y 100% de presencia respectivamente. La finca 3 presentó resultados positivos con un 75% en frondas maduras y una distribución igual en las frondas inmaduras con un 50% de presencia y 50% de ausencia de pterosina A.

El comportamiento de las bandas observadas con presencia aparente de pterosina A se puede comparar con lo informado por Otgonsugar, Undrakhbayar, & Byambajav (2018) quienes analizaron extractos de *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn mediante el uso de TLC sobre sílica gel F254 y emplearon como fase móvil diclorometano y metanol en una proporción 9:1. En este estudio se obtuvo un Rf para pterosina B análogo estructural de pterosina A de 0,84 dando una

diferencia de 0,013 unidades s comparamos con el Rf medido en este ensayo, esta proximidad indica que estas pterosina pueden desplazarse de manera similar en una misma fase móvil. Es por esto que se puede interpretar una compatibilidad cromatográfica con la pterosina A. Sin embargo, los resultados brindados por TLC fueron complementados mediante cromatografía de alta resolución (HPLC), donde las muestras tuvieron un tiempo de retención que coincidía con el estándar por lo que se comprobó la presencia de la toxina en dicho estudio. Es así como se puede evidenciar que la TLC sirve como prueba preliminar relevante que debería estar acompañada de otra técnica más robusta.

Como se evidenció previamente la mayor frecuencia de manchas compatibles con la del estándar fue en los helechos recolectados en estado inmaduro. Esto coincide con lo descrito por Alonso-Amelot & Avendaño (2022) quienes encontraron una relación negativa entre el desarrollo de la fronda del helecho macho y las cantidades de ptaquilósido, pterosina B y pterosina A. En este estudio se demostró que a medida que la planta se iba desarrollando las concentraciones de estos compuestos disminuían, llegando a presentar un 5% de los valores iniciales las frondas completamente desarrolladas. Este antecedente coincide con los resultados obtenidos, mostrando que la presencia de glucósidos de tipo illudano, detectable en una prueba cualitativa como TLC puede estar estrechamente relacionada con el estado fenológico.

Así mismo, Ribeiro, Keller, & Soto-Blanco (2020) mencionaron que en brotes de *Pteridium arachnoideum* se encontraban mayores concentraciones de ptaquilósido y pterosina B en comparación con las frondas maduras. En brotes las concentraciones de ptaquilósido variaron entre 12,5 y 18,8 mg/g, mientras que en frondas maduras 2,49 y 2,75 mg/g. Para la pterosina B se registraron valores entre 4,03 a 10,42mg/g en brotes y 0,68 y 0,88 en frondas maduras. Estos resultados respaldan que en brotes inmaduros o jóvenes existe una mayor acumulación de la toxina. En este sentido, se debería mencionar que el caudatósido se

encuentra muy relacionado al ptaquilósido estructuralmente ya que ambos pertenecen al grupo de los glucósidos illudanos.

El caudatósido adquiere principal relevancia en los resultados obtenidos ya que es el glucósido illudano precursor de pterosina A. Kisielius, y otros (2020) establecieron la relación entre los glucósidos presentes en el helecho y sus respectivos productos de hidrólisis. Esto respalda el uso de un estándar de pterosina A en esta tesis ya que fue utilizado como una evidencia indirecta sobre la posible presencia previa de caudatósido en las muestras recolectadas.

Uno de los hallazgos más interesantes reportados por Kisielius, y otros (2020) es que el caudatósido a pesar de no ser la toxina principal constituye un componente importante dentro de los helechos del género *Pteridium*. Los autores analizaron muestras secas de helechos del mismo género obtenidas de seis continentes, se registraron concentraciones máximas previo a la hidrólisis de hasta 2200 u/g de caudatósido. Por otra parte, las concentraciones de ptaquilósido fueron de hasta 2100 u/g. Estos valores evidencian que el caudatósido puede encontrarse en valores similares o incluso superiores al ptaquilósido. Esto guarda relación con la tesis ya que después de la hidrólisis la señal de pterosina A obtenida podría representar la transformación de caudatósido presente originalmente en la planta.

La hidrólisis realizada en esta tesis se respaldó en el trabajo de Cáceres-Peña, Naya, Calcagno-Pissarelli, & Alonso-Amelot (2013), quienes convirtieron glucósidos de tipo illudano mediante su tratamiento con NaOH y neutralización con HCl. Bajo esas mismas condiciones el caudatósido fue transformado a pterosina A al poseer similitud estructural. Sin embargo, la baja intensidad de las manchas puede indicar que la reacción alcalina fue insuficiente. Además, Cáceres-Peña, Naya, Calcagno-Pissarelli, & Alonso-Amelot (2013) demostraron que el rendimiento de la reacción de hidrólisis depende de las etapas previas realizadas antes del análisis. Por ejemplo, la etapa de secado, donde se demostró que un secado a 70°C permite perder el 76% de pterosina A, este resultado evidencia que una señal débil en la TLC no

significa ausencia de caudatósido, si no una concentración muy baja resultado de una pérdida del compuesto en etapas previas.

4.3 Correlación entre la presencia de HEB y las toxinas presentes en *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn

Para explicar el último objetivo se analizó la distribución de la hematuria enzoótica bovina en las fincas donde se recolectaron las muestras de *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn. Debido a la heterogeneidad de los datos entre fincas porque cada una de ellas poseía una cantidad diferente de vacas, la frecuencia de la enfermedad se expresó como porcentajes de vacas afectadas respecto al total del muestreo en cada finca para obtener valores comparables.

Tabla 7

Distribución de vacas muestreadas y casos de posible HEB según la finca

Finca	Vacas muestreadas	Vacas con HEB	Proporción de HEB	IC 95 % de Wilson
Finca 1	13	0	0,00%	0,00–22,81 %
Finca 2	20	2	10,00%	2,79–30,10 %
Finca 3	22	3	13,64%	4,75–33,33 %
Total	55	5	9,09%	3,95–19,58 %

Nota. Los datos corresponden a las encuestas realizadas en las tres fincas donde se recolectaron las muestras de helecho macho.

A partir de las encuestas realizadas en las tres fincas donde fueron recolectadas las muestras, se incluyó información de 55 vacas, de las cuales 5 presentaron signos compatibles con HEB, el que más destacaba era la hematuria. Esto representó una frecuencia o prevalencia del 9,09%. La distribución de los casos no fue uniforme. En la fina 1 no existió vacas con sintomatología de HEB, mientras que en la finca 2 y 3 se identificaron 2 y 3 casos respectivamente. En la finca 2 se registró un porcentaje del 10% y en la finca 3 del 13,64%.

Los intervalos de confianza eran amplios principalmente por el reducido número de casos presentados. A pesar de que en la finca 1 no se registre la posible presencia de HEB esto no quiere decir que la enfermedad esté completamente ausente en esa población, simplemente que no se registró en esa población. La prueba exacta de Fisher-Freeman-Halton no evidenció diferencias significativas entre las tres fincas (p-valor=0,430), por lo que no puede afirmarse que la frecuencia de la enfermedad haya sido diferente entre las fincas estudiadas.

Tabla 8

Correlación ecológica entre la prevalencia observada de HEB y la presencia aparente de pterosina A en Pteridium aguilinum (L.) Kuhn.

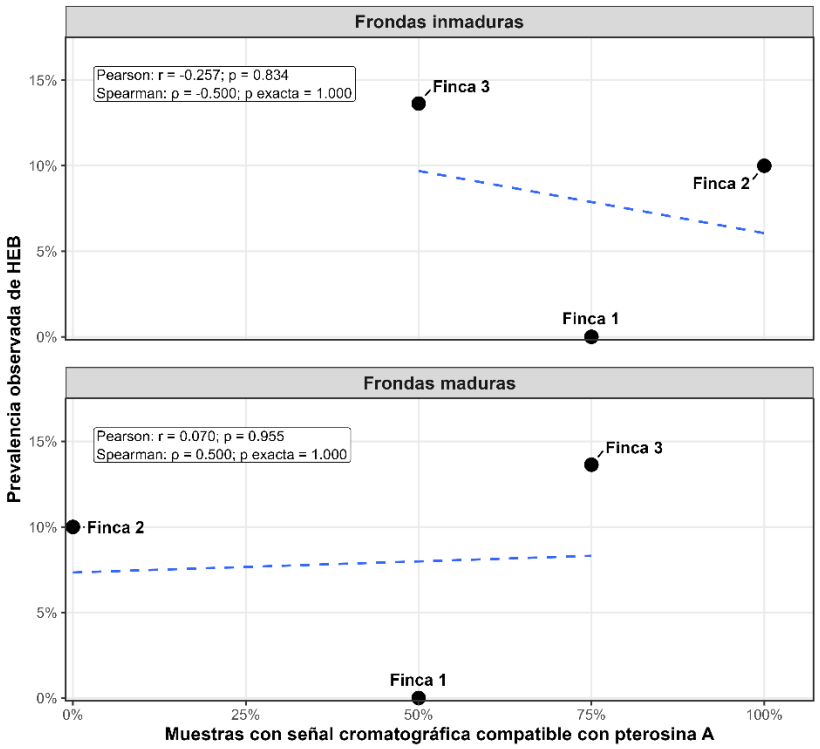
Indicador de pterosina A	Pearson (r)	(p) paramétrico	Spearman (rho)	(p) exacto	Interpretación descriptiva
Frondas inmaduras	−0,257	0,834	−0,500	1,000	Estadísticamente no significativo
Frondas maduras	0,070	0,955	0,500	1,000	Estadísticamente no significativo
Positividad total	−0,260	0,832	0,000	1,000	Estadísticamente no significativo
Número de fincas	3		3		Análisis exclusivamente exploratorio

Nota. Los valores p de Pearson corresponden a una prueba paramétrica convencional, mientras que Spearman se obtuvo realizando 6 permutaciones posibles, debido a que sólo se incluyeron tres fincas.

La asociación entre la prevalencia de HEB y la posible presencia de pterosina A se evalúo por finca usando el coeficiente Pearson y Spearman. En frondas inmaduras se obtuvo una correlación negativa y débil (r=-0,257; p=0,834) y una correlación de Spearman de -0,500 y un p exacto=1. Por otro lado, las frondas maduras presentaron correlación lineal, es decir nula (r = 0,070; p=0,955) y una correlación de Spearman de 0,500 y un p exacto=1. Ninguna de las asociaciones tuvo significación estadística.

Figura 27

Relación entre la prevalencia de HEB y la posible presencia de pterosina A.



Nota. Cada punto representa una finca. La línea entrecortada representa la tendencia lineal de Pearson.

En la imagen se puede evidenciar que tanto la proporción de casos de HEB y la posible presencia de pterosina A muestran comportamientos diferentes independientemente del estado fenológico. En las frondas maduras. La finca 1 no mostró caso de HEB, pero registró un 75% de posible presencia de pterosina A. La finca 2 registró una prevalencia de HEB del 10% y todas sus muestras mostraron posible presencia de compuesto de interés y finalmente la finca 3 mostró la mayor prevalencia de HEB con un 13,63%, pero sólo un 50% de señal compatible.

En conjunto, la figura no muestra una asociación entre HEB y la posible presencia de pterosina A en ninguno de sus dos estados fenológicos. Sin embargo, estos resultados no demuestran la inexistencia de una relación biológica debido a que el análisis se realizó sólo con tres fincas, lo que limita la capacidad estadística para identificar asociaciones. Algo que se debe tomar en cuenta es que HEB es una enfermedad crónica relacionada con exposiciones durante un tiempo prolongado, mientras que la TLC corresponde a una medición puntual.

A pesar de que estadísticamente no hubo correlación, es importante mencionar que diversos estudios han demostrado la relación HEB y los glucósidos de tipo illudano. La HEB es una enfermedad crónica que aparece después del consumo repetido y prolongado del helecho macho. Rai, y otros (2017) describieron animales con cuadros de hematuria cuya evolución se iba extendiendo durante meses e incluso años, relacionaron directamente el consumo del helecho con la enfermedad. Por lo tanto, una medición puntual de la planta no representa no representa la dosis que recibe la vaca durante el desarrollo de lesiones neoplásicas.

Por otro lado, algunos autores como Martano, y otros (2013) sugieren que la interacción entre las toxinas del helecho y el virus papiloma tipo 2 (BPV-2) tienen un efecto inmunosupresor que puede influir en el % de HEB, esto demuestra que esta enfermedad puede ser resultado de exposición prolongada, acción inmunosupresora de las toxinas, infección previa con BPV-2, edad del animal, y susceptibilidad individual. Por lo tanto, no se puede afirmar que en la zona no existe una correlación. En este sentido, HEB debe comprenderse

como una enfermedad más profunda que orinar sangre, que a pesar de que este si sea un síntoma clave se debe evaluar las alteraciones crónicas y progresivas en la vejiga urinaria que deben evaluarse cada caso por separado.

Carvalho, Pinto, & Peleteiro (2006) encontraron diferentes estadios de las lesiones neoplásicas como: lesiones inflamatorias, alteraciones epiteliales y diversidad de tumores en el tejido en vejigas de bovinos, esto quiere decir que cada vaca que presenta la hematuria un signo de alarma presenta lesiones de diferente tipo. Dos vacas con hematuria pueden encontrarse en etapas patológicas diferentes. Esto indica que la HEB no debe concebirse únicamente un problema urinario o porque el animal presenta hematuria. Además, la enfermedad puede venir acompañada de leucopenia, anemia y reducción de la concentración de hemoglobina.

Capítulo V

5.1 Conclusiones

La caracterización botánica permitió identificar y confirmar que los ejemplares recolectados en la parroquia Cuellaje correspondieron a *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn, mediante la evaluación de características morfológicas propias de la especie, como la organización de las frondas, la disposición de las pinnas, el raquis, la lámina foliar y la presencia de soros marginales. Asimismo, se evidenciaron diferencias entre frondas maduras e inmaduras, principalmente en el desarrollo y coloración de las estructuras reproductivas, lo que permitió establecer el estado fenológico de las plantas y disponer de una base confiable para el análisis de la variabilidad química de la especie.

El análisis de cromatografía de capa fina (TLC), que incluyó el estándar de pterosina A como referencia, presentó un factor de retención (Rf) de 0,826 para los tratamientos de la investigación. Los resultados obtenidos evidenciaron una mayor compatibilidad cromatográfica o presencia de toxinas en las frondas inmaduras, lo que sugiere una mayor presencia de

metabolitos secundarios asociados a los mecanismos de defensa de los tejidos jóvenes. Además, se confirmó que la cromatografía de capa fina constituye una herramienta útil, accesible y de bajo costo para la evaluación preliminar de compuestos relacionados con la toxicidad del helecho macho.

La correlación realizada entre la presencia de la toxina en los extractos de las muestras de helecho macho, y la incidencia de hematuria enzoótica bovina, permitió comprender que la presencia de esta enfermedad en el ganado bovino de la zona de estudio, responde a un proceso multifactorial, en el que intervienen el tiempo de exposición al consumo del helecho, las condiciones ambientales, la disponibilidad de forraje y la susceptibilidad individual de los animales. En este sentido, los resultados obtenidos aportan evidencia de que la presencia de compuestos relacionados con la toxicidad de *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn constituye un factor importante dentro del desarrollo de la enfermedad, contribuyendo a una mejor comprensión de la dinámica epidemiológica de la hematuria enzoótica bovina en las fincas evaluadas de la parroquia Cuellaje. Esta información es de utilidad para futuras investigaciones y estrategias de prevención y manejo.

5.2 Recomendaciones

- Se considera necesario continuar el estudio mediante el uso de una técnica analítica de mayor sensibilidad como Cromatografía de alta eficiencia (HPLC), esta técnica tiene una mayor separación y reproducibilidad en comparación con TLC. Su aplicación permitiría confirmar la presencia de pterosina A y B. Además, permite no solo la identificación de la presencia de la toxina, sin su cuantificación en las concentraciones de la investigación.
- Se recomienda adquirir un estándar analítico de pterosina B e incorporarlo en futuros ensayos cromatográficos, su utilización permitiría compara de manera precisa las bandas observadas en los extractos vegetales.

- Para mejorar la conservación del material vegetal, se recomienda emplear como método de secado la liofilización en futuras investigaciones. Este procedimiento permite eliminar el aguar mediante bajas temperaturas y reduce el tiempo de estabilización de las muestras conservando de mejor manera los metabolitos secundarios y permitiría un secado más uniforme.
- En futuras investigaciones se recomienda trabajar con diferentes concentraciones del estándar para poder establecer el límite visual de detección y comparar las intensidades de coloración de las distintas con las concentraciones.
- Para fortalecer la robustez de los resultados de la relación HEB y la toxina, se recomienda fortalecer los estudios en campo y laboratorio aumentando el número de estados fenológicos de la planta y de otros segmentos de la misma, incrementar variables como épocas del año y mayor número de fincas como unidad experimental.

5.3 Referencias

Abera, D., Jibat, T., Sori, T., Feyisa, A., & Beyene, T. (2014). Assessment of Plant and Chemical Poisoning in Livestock in Central Ethiopia. *Journal of Environmental & Analytical Toxicology, 4*(215), 1–5. doi:10.4172/2161-0525.1000215

Aboling, S. (2023). Do Poisonous Plants in Pastures Communicate Their Toxicity? Meta-Study and Evaluation of Poisoning Cases in Central Europe. *Animals, 13*(24), 3795. doi:10.3390/ani13243795

Adebayo, O. T., Oluremi, B. B., Ogunlakin, A. D., Gyebi, G. A., & Sonibare, M. A. (2025). Pharmacognostic evaluation and antimicrobial activity of *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn leaves (Onocleaceae) via in vitro and in silico perspectives. *PLOS ONE, 20*(4), e0318943. doi:10.1371/journal.pone.0318943

Adou, L. M., Koné, M. W., Ipou Ipou, J., & N'Guessan, E. K. (2016). Ethnobotanique et analyse phytochimique qualitative de *Pteridium aquilinum* (L.) Kühn (Dennstaedtiaceae), une Ptéridophyte utilisée comme plante médicinale en Côte d'Ivoire. *International Journal of Biological and Chemical Sciences, 10*(4), 1783–1792. doi:10.4314/ijbcs.v10i4.27

Agnew, M., & Lauren, D. (1991). Determination of ptaquiloside in bracken fern (*Pteridium esculentum*). *Journal of Chromatography, 538*, 462–468.

Alcântara, B. K., Lunardi, M., Agnol, A. M., Alfieri, A. A., & Alfieri, A. F. (2021). Detection and Quantification of the E6 Oncogene in Bovine Papillomavirus Types 2 and 13 From Urinary Bladder Lesions of Cattle. *Frontiers in Veterinary Science, 8*, 673189. doi:10.3389/fvets.2021.673189

Alonso-Amelot, M., & Avendaño, M. (2022). Human carcinogenesis and bracken fern: A review of the evidence. *Current Medicinal Chemistry*, 675-686.

Aranha, P., Hansen, H., Rasmussen, L., Strobel, B., & Friis, C. (2014). Determination of ptaquiloside and pterosin B derived from bracken (*Pteridium aquilinum*) in cattle plasma, urine and milk. *Journal of Chromatography B, 951–952*, 44–51. doi:10.1016/j.jchromb.2014.01.022

Atkins, P., & Jones, L. (2018). *Principios de química: Los caminos del descubrimiento.* Madrid: Editorial Médica Panamericana.

Austin, D. F. (2004). *Florida ethnobotany.* CRC Press.

Babu, A. K., Kumaresan, G., Antony Aroul Raj, V., & Velraj, R. (2020). Experimental Investigations of Thin-layer Drying of Leaves in a Heat-Pump Assisted Tray-type Batch Drying Chamber. *Strojniški Vestnik – Journal of Mechanical Engineering, 66*(4), 254–265. doi:10.5545/sv-jme.2019.6510

Ben-Yehoshua, S., & Conn, E. (1964). Biosynthesis of Prunasin, the Cyanogenic Glucoside of Peach. *Plant Physiology, 39*(3), 331–333. doi:10.1104/pp.39.3.331

Bernal, C. A. (2016). *Metodología de la investigación: Administración, economía, humanidades y ciencias sociales.* Bogotá, Colombia: Pearson Educación.

Brownsey, P., & Brownsey, P. (1989). The taxonomy of bracken (*Pteridium*: Dennstaedtiaceae) in Australia. *Australian Systematic Botany, 2*, 113–12. doi:10.1071/SB9890113

Cáceres-Peña, Y., Naya, M., Calcagno-Pissarelli, M., & Alonso-Amelot, M. (2013). Influence of bracken fern (*Pteridium caudatum* L. Maxon) pre-treatment on extraction yield of illudane glycosides and pterosins. *Phytochemical Analysis, 24*(3), 290-295. doi:10.1002/pca.2409

Calderón Tobar, Á., Sánchez, L., Mancebo, B., Marrero, E., Chiriboga, X., & Silva, J. (2014). Residualidad del ptaquilósido en la leche procedente de granjas bovinas en tres cantones de la provincia de Bolívar, Ecuador. *Revista de Salud Animal, 36*(1), 19–27.

Cando Barbecho, L., & Guzmán Cabrera, X. (2024). *Análisis del impacto económico del sector ganadero en la región Sierra–Ecuador, en los últimos 5 años (2017–2021).* Cuenca: Universidad Politécnica Salesiana.

Carvalho, T., Pinto, C., & Peleteiro, M. (2006). Urinary Bladder Lesions in Bovine Enzootic Haematuria. *Journal of Comparative Pathology, 134*(4), 336–346. doi:10.1016/j.jcpa.2006.01.001

Castillo, U. F., Wilkins, A. L., Lauren, D. R., Smith, B. L., & Alonso-Amelot, M. E. (1997). Isoptaquiloside and caudatoside, illudane-type sesquiterpene glucosides from *Pteridium aquilinum* var. caudatum. *Phytochemistry, 44*(5), 901–906. doi:10.1016/S0031-9422(96)00651-0

Cavasani, J., Sabino, L., Santos, Í., Gomes, F., Machado, M., Athayde Filho, F., . . . Furlan, F. (2025). Bovine enzootic hematuria in the Southern Cone of Rondônia. *Pesquisa Veterinária Brasileira, 45*, e07772. doi:10.1590/1678-5150-PVB-7772

Cherrill, A., & Lane, A. (1994). Bracken (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn) infestation of rough hill grazing land in the Tyne river catchment, northern England. *Watsonia, 20*, 105–114.

Clauson-Kaas, F., Ramwell, C., Hansen, H. C., & Strobel, B. W. (2016). Ptaquiloside from bracken in stream water at base flow and during storm events. *Water Research*, 155–162. doi:10.1016/j.watres.2016.09.049

Cortinovis, C., & Caloni, F. (2013). Epidemiology of Intoxication of Domestic Animals by Plants in Europe. *The Veterinary Journal, 197*(2), 163–168. doi:10.1016/j.tvjl.2013.03.007

Cressey, P., & Reeve, J. (2019). Metabolism of cyanogenic glycosides: A review. *Food and Chemical Toxicology, 125*, 225–232. doi:https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.01.002

Diaz, G. (2011). Toxic Plants of Veterinary and Agricultural Interest in Colombia. *International Journal of Poisonous Plant Research, 1*(1), 1–19.

El Mahdy, C., Popescu, S., & Borda, C. (2017). Plants that Can Be Poisonous for Cows. A Review. *Bulletin of the University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Animal Science and Biotechnologies, 74*(2), nd.

Eslava-Silva, F., Jiménez-Durán, K., Jiménez Estrada, M., & Muñiz Díaz de León, M. (2020). Morfo-anatomía del ciclo de vida del helecho *Pteridium aquilinum* (Dennstaedtiaceae) en cultivo in vitro. *Revista de Biología Tropical*, 12-22.

Espinosa, M. M., Bieski, I. G., & Martins, D. T. (2012). Diseño de muestreo probabilístico en estudios etnobotánicos de plantas medicinales. *Revista Brasileira de Farmacognosia, 22*, 1362–1367.

Fenwick, G. (1988). Bracken (*Pteridium aquilinum*): Toxic effects and toxic constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 46*(3), 243–250. doi:10.1002/jsfa.2740460302

Fernández, H., & Sierra, L. (2022). *Pteridium aquilinum*: A Threat to Biodiversity and Human and Animal Health. En Marimuthu, J., Fernández, H., Kumar, A., & Thangaiah, S., *Ferns: Biotechnology, Propagation, Medicinal Uses and Environmental Regulation* (págs. 697–713). Singapore: Springer Nature Singapore. doi:10.1007/978-981-16-6170-9_30

Fifield, F., & Kealey, D. (2000). *Principles and Practice of Analytical Chemistry.* Oxford: Blackwell Science.

Fletcher, M. T., Hayes, P. Y., Somerville, M. J., De Voss, J. J., & Blaney, B. J. (2010). Ptesculentoside, a novel norsesquiterpene glucoside from the Australian bracken fern *Pteridium esculentum*. *Tetrahedron Letters, 51*(15), 1997–1999. doi:10.1016/j.tetlet.2010.02.021

Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2018). *Phenology*. Obtenido de FAO: https://www.fao.org

Franco-Crespo, C., Morales Carrasco, L., Lascano Aimacaña, N., & Cuesta Chávez, G. (2019). Dinámica de los pequeños productores de leche en la Sierra centro de Ecuador. *LA GRANJA. Revista de Ciencias de la Vida, 30*(2), 103–120. doi:10.17163/lgr.n30.2019.10

Fried, B., & Sherma, J. (1999). *Thin-Layer Chromatography.* ND: Marcel Dekker.

Gil da Costa, R. M., Bastos, M. M., Oliveira, P. A., & Lopes, C. (2012). Bracken-associated human and animal health hazards: Chemical, biological and pathological evidence. *Journal of Hazardous Materials, 203–204*, 1-12. doi:10.1016/j.jhazmat.2011.12.046

Gil da Costa, R. M., Oliveira, P. A., Vasconcelos-Nóbrega, C., Arantes-Rodrigues, R., Pinto-Leite, R., Colaço, B., . . . Ferreira-Cardoso, J. (2020). Ptaquiloside from bracken (*Pteridium spp*.) promotes oral carcinogenesis initiated by HPV16 in transgenic mice. *Food & Function, 11*(4), 3347–3359. doi:10.1039/D0FO00207K

Giurgiu, G., Mircean, M., Scurtu, I., & Popovici, C. (2008). Epidemiological, clinical and paraclinical investigations in cattle enzootic haematuria in an area from N-W of Transilvania. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Veterinary Medicine, 65*(2), 12–15. doi:https://doi.org/10.15835/buasvmcn-vm:65:2:1511

Gomes, J., Magalhães, A., Michel, V., Amado, I. F., Aranha, P., Ovesen, R. G., . . . Touati, E. (2012). *Pteridium aquilinum* and its ptaquiloside toxin induce DNA damage response in

gastric epithelial cells, a link with gastric carcinogenesis. *Toxicological Sciences, 126*(1), 60–71. doi:10.1093/toxsci/kfr329

Goyer, A. (2010). Thiamine in plants: Aspects of its metabolism and functions. *Phytochemistry, 71*(14-15), 1615–1624. doi:10.1016/j.phytochem.2010.06.022

Gülsoy, S. K., & Şimşir, S. (2018). Chemical Composition, Fiber Morphology, and Kraft Pulping of Bracken Stalks (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn). *Drvna Industrija, 69*(1), 23–33. doi:10.5552/drind.2018.1725

Hanes, J. W., Kraft, C. E., & Begley, T. P. (2007). An assay for thiaminase I in complex biological samples. *Analytical Biochemistry, 368*(1), 33–38. doi:10.1016/j.ab.2007.06.001

Henchion, M., Moloney, A., Hyland, J., Zimmermann, J., & McCarthy, S. (2021). Trends for meat, milk and egg consumption for the next decades and the role played by livestock systems in the global production of proteins. *Animal*(Supplement 1 (o Suplemento 1, si tu versión de Word está en español)), 100287. doi:10.1016/j.animal.2021.100287

Hernández-Sampieri, R., & Mendoza Torres, C. P. (2018). *Metodología de la investigación: Las rutas cuantitativa, cualitativa y mixta.* Mexico: McGraw-Hill Interamericana.

Jones, C., & Firn, R. (1979). Some allelochemicals of *Pteridium aquilinum* and their involvement in resistance to Pieris brassicae. *Biochemical Systematics and Ecology, 7*(3), 187–192.

Kardong, D., Upadhyaya, S., & Saikia, L. R. (2013). Screening of phytochemicals, antioxidant and antibacterial activity of crude extract of *Pteridium aquilinum* Kuhn. *Journal of Pharmacy Research, 6*(1), 179–182. doi:10.1016/j.jopr.2012.11.037

Kato-Noguchi, H., & Kato, M. (2026). *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn—A Review of Its Toxicology, Pharmacology, and Phytochemistry. *Plants, 15*(3), 469. doi:10.3390/plants15030469

Kenten, R. (1958). Manometric studies of bracken (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn) thiaminase. *Biochemical Journal, 69*(3), 439–448. doi:https://doi.org/10.1042/bj0690439

Kisielius, V., Lindqvist, D., Thygesen, M., Rodamer, M., Hansen, H., & Rasmussen, L. (2020). Fast LC-MS quantification of ptesculentoside, caudatoside, ptaquiloside and corresponding pterosins in bracken ferns. *Journal of Chromatography B, 1138*, 121966. doi:https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.121966

Kisielius, V., Markussen, B., Hansen, H. C., & Rasmussen, L. H. (2024). Geographical distribution of caudatoside and ptaquiloside in bracken ferns in Northern Europe. *Environmental Sciences Europe, 36*, 186. doi:10.1186/s12302-024-01012-6

Klaassen, C. (2019). *Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons* (9.ª edición ed.). New York: McGraw-Hill Education.

Krieg, C. P., & Chambers, S. M. (2022). The ecology and physiology of fern gametophytes: A methodological synthesis. *Applications in Plant Sciences, 10*(2), e11464. doi:10.1002/aps3.11464

Kumar, S., Jyotirmayee, K., & Sarangi, M. (2013). Thin Layer Chromatography: A Tool of Biotechnology for Isolation of Bioactive Compounds from Medicinal Plants. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research, 18*(1), 126–132.

Kumar, V., Abbas, A., & Aster, J. (2021). *Robbins y Cotran. Patología estructural y funcional.* Philadelphia: Elsevier.

Leach, F., Davidson, J., Burtenshaw, M., Harris, G., Tomlin, T., & Davis, P. (2023). The New Zealand bracken fern rhizome, *Pteridium* esculentum (G.Forst): A toxic food plant of pre-European Māori. *Archaeology in Oceania, 58*(2), 135–171. doi:10.1002/arco.5285

Low, V., & Thomson, J. (1990). Cyanogenesis in Australian bracken (*Pteridium esculentum*): Distribution of cyanogenic phenotypes and factors influencing activity of the cyanogenic glucosidase. En J. Thomson, & R. Smith, *Bracken biology and management* (págs. 105–111). Melbourne, Australia: Australian Institute of Agricultural Science.

MacLachlan, N., & Dubovi, E. (2017). *Fenner's Veterinary Virology.* London: Academic Press (Elsevier).

Malík, M., Mika, O. J., Navrátilová, Z., Killi, U. K., Tlustoš, P., & Patočka, J. (2024). Health and environmental hazards of the toxic bracken fern *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn. *Plants, 13*(1), 18. doi:10.3390/plants13010018

Marimuthu, J., Fernández, H., Kumar, A., & Thangaiah, S. (2022). *Ferns: Biotechnology, Propagation, Medicinal Uses and Environmental Regulation.* Singapore: Springer Nature Singapore. doi:10.1007/978-981-16-6170-9

Marrero Faz, E., & Calderón Tobar, Á. (2012). Plantas tóxicas e inocuidad alimentaria: Hematuria Enzoótica Bovina por *Pteridium* spp. un problema relevante de salud. *Revista de Salud Animal, 34*(3), 137–143. Obtenido de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2012000300001&lng=es&tlng=es

Marrs, R. H., & Watt, A. S. (2006). Biological Flora of the British Isles: *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn. *Journal of Ecology, 94*, 1272–1321. doi:10.1111/j.1365-2745.2006.01177.x

Martano, M., Roperto, F., Stocco, R., Russo, V., Borzacchiello, G., Paciello, O., . . . Roperto, S. (2013). Bovine Papillomavirus Type 2 Infection and a Series of Mesenchymal Tumors of the Urinary Bladder in Cattle. *BioMed Research International*, 814635. doi:10.1155/2013/814635

McKenzie, R. (1978). Bovine enzootic haematuria in Queensland. *Australian Veterinary Journal, 54*(2), 61–64. doi:https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1978.tb00344.x

McMury, J. (2021). *Química Orgánica.* Boston: Cengage Learning.

Medeiros-Fonseca, B., Abreu-Silva, A. L., Medeiros, R., Oliveira, P. A., & Gil da Costa, R. M. (2021). *Pteridium* spp. and Bovine Papillomavirus: Partners in Cancer. *Frontiers in Veterinary Science, 8*, 758720. doi:10.3389/fvets.2021.758720

Mehltreter, K., Walker, L. R., & Sharpe, J. M. (2010). *Fern Ecology* (1 ed.). Cambridge: Cambridge University Press. doi:10.1017/CBO9780511844898

Meyer, P. (1989). Thiaminase activities and thiamine content of *Pteridium aquilinum*, Equisetum ramosissimum, Malva parviflora, Pennisetum clandestinum and Medicago sativa. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research, 56*(2), 145–146.

Moreira Souto, M. d., Kommers, G. D., Barros, C. S., Rech, R. R., & Piazer, J. V. (2006). Neoplasmas da bexiga associados à hematúria enzoótica bovina. *Ciência Rural, 36*(5), 1647–1650. doi:10.1590/S0103-84782006000500050

Oliveros-Bastidas, A., & Alonso-Amelot, M. (2010). Cyanogenic polymorphism in bracken, *Pteridium arachnoideum* and P. *caudatum*, from the northern Andes. *Química Nova, 33*(7), 1520–1524. doi:https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000700018

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (julio de 2026). *La ganadería y el medio ambiente*. Obtenido de Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura: https://www.fao.org/livestock-environment/es

Otgonsugar, P., Undrakhbayar, T., & Byambajav, T. (2018). Determination of ptaquiloside in *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn. *Mongolian Journal of Agricultural Sciences, 25*(3), 37–42. doi:10.5564/mjas.v25i03.1169

Page, C. (1976). The taxonomy and phytogeography of bracken—A review. *Botanical Journal of the Linnean Society, 73*, 1–34. doi:10.1111/j.1095-8339.1976.tb02010.x

Pamukcu, A. (1957). Tumors of the urinary bladder in cattle and water buffalo affected with enzootic bovine hematuria. *Zentralblatt für Veterinärmedizin, 4*, 185–197.

Park, H., Cho, Y., Lee, J. E., Lee, K. M., Kim, H. J., Lee, J., . . . Son, J. (2023). Evaluation and Monitoring of the Natural Toxin Ptaquiloside in Bracken Fern, Meat, and Dairy Products. *Toxins, 15*(3), 231. doi:10.3390/toxins15030231

Park, H., Cho, Y., Lee, J., Lee, K., & Kim, H. (2023). Evaluation and Monitoring of the Natural Toxin Ptaquiloside in Bracken Fern, Meat, and Dairy Products. *Toxins*, 231.

Partin, A., Dmochowski, R., Kavoussi, L., & Peters, C. (2021). *Campbell-Walsh-Wein Urology.* Elsevier: Philadelphia.

Potter, D., & Baird, M. (2000). Carcinogenic effects of ptaquiloside in bracken fern and related compounds. *British Journal of Cancer, 83*(7), 914–920. doi:10.1054/bjoc.2000.1368

Puga-Torres, B., Aragón Vásquez, E., Ron, L., Álvarez, V., Bonilla, S., Guzmán, A., . . . De la Torre, D. (2022). Milk Quality Parameters of Raw Milk in Ecuador between 2010 and 2020: A Systematic Literature Review and Meta-Analysis. *Foods, 11*(21), 3351. doi:https://doi.org/10.3390/foods11213351

Rai, S., Sharma, R., Kumari, A., Rasmussen, L., Patil, R., & Bhar, R. (2017). Survey of ferns and clinico-pathological studies on the field cases of enzootic bovine haematuria in Himachal Pradesh, a north-western Himalayan state of India. *Toxicon, 138*, 31–36. doi:10.1016/j.toxicon.2017.08.010

Ramírez-Trejo, M., Pérez-García, B., Mendoza-Ruiz, A., Valdez-Avila, R., & Espinosa-Matías, S. (2013). Observations of the spore, gametophyte and young sporophyte of *Pteridium caudatum* (L.) Maxon using scanning electron microscopy. *Micron, 45*, 37–44. doi:10.1016/j.micron.2012.10.011

Rasmussen, L., Kroghsbo, S., Frisvad, J., & Hansen, H. (2003). Occurrence of the carcinogenic bracken constituent ptaquiloside in fronds, topsoil and organic soil layers in Denmark. *Chemosphere, 51*(2), 117–127. doi:10.1016/S0045-6535(02)00808-0

Raven , P., Evert, R., & Eichhorn, S. (2013). *Biología de las plantas.* Barcelona: Editorial Reverté.

Ribeiro, D., Keller, K., & Soto-Blanco, B. (2020). Ptaquiloside and pterosin B levels in mature green fronds and sprouts of *Pteridium arachnoideum*. *Toxins, 12*(5), 288. doi:10.3390/toxins12050288

Roos, K. (2010). *Tropical bracken, a powerful invader of pastures in South Ecuador: Species composition, ecology, control measures, and pasture restoration.* Bayreuth: Universidad de Bayreuth.

Roperto, S., Borzacchiello, G., Brun, R., Leonardi, L., Maiolino, P., Martano, M., . . . Roperto, F. (2010). A Review of Bovine Urothelial Tumours and Tumour-Like Lesions of the Urinary Bladder. *Journal of Comparative Pathology, 142*(2-3), 95–108. doi:10.1016/j.jcpa.2009.08.156

Royal Botanic Gardens, Kew. (2025). *Pteridium aquilinum (L.) Kuhn*. Obtenido de Plants of the World Online: https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:17174820-1

Sannino, D. R., Kraft, C. E., Edwards, K. A., & Angert, E. R. (2018). Thiaminase I provides a growth advantage by salvaging precursors from environmental thiamine and its analogs in Burkholderia thailandensis. *Applied and Environmental Microbiology, 84*(18), e01268-18. doi:10.1128/AEM.01268-18

Santiago, M., & Strobel, S. (2013). Thin Layer Chromatography. En M. Santiago, & S. Strobel, *Methods in Enzymology* (págs. 303–324). ND: Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-420067-8.00024-6

Santos Pimenta, L., Schilthuizen, M., Verpoorte, R., & Choi, Y. (2014). Quantitative Analysis of Amygdalin and Prunasin in Prunus serotina Ehrh. using ^{1}H-NMR Spectroscopy. *Phytochemical Analysis, 25*(2), 122–126. doi:10.1002/pca.2476

Scala, C., Ortiz, K., Catinaud, J., & Lemberger, K. (2014). Hematuria and Urinary Bladder Lesions Compatible with Bracken Fern (*Pteridium aquilinum*) Intoxication in Captive Fallow Deer (Dama dama). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine, 45*(2), 380–385. doi:10.1638/2013-0274R1.1

Schwartsburd, P., Yañez, A., & Prado, J. (2018). Formal recognition of six subordinate taxa within the South American bracken fern, *Pteridium esculentum* (P. esculentum subsp. arachnoideum s.l.—Dennstaedtiaceae), based on morphology and geography. *Phytotaxa, 333*(1), 22–40. doi:10.11646/phytotaxa.333.1.2

Sheffield, E., Wolf, P. G., Rumsey, F., Robson, D., Ranker, T., & Challinor, S. (1993). Spatial distribution and reproductive behaviour of a triploid bracken (*Pteridium aquilinum)* clone in Britain. *Annals of Botany*, 231–237.

Skoog, D., Holler, F., & Crouch, S. (2018). *Principios de análisis instrumental.* México: Cengage Learning.

Stewart, G., Cox, E., Le Duc, M., & Pakeman, R. (2008). Control of *Pteridium aquilinum*: Meta-analysis of a multi-site study in the UK. *Annals of Botany, 101*(7), 957–970. doi:https://doi.org/10.1093/aob/mcn020

Thomson, J. A. (2016). Free axial lobes: An important diagnostic character in Pteridium (Dennstaedtiaceae). *Telopea, 19*, 193–200. doi:10.7751/telopea10722

Torres-Inga, C., Aguirre-de Juana, Á., Guevara-Viera, R., Alvarado-Dávila, P., & Guevara-Viera, G. (2025). Are Andean Dairy Farms Losing Their Efficiency? *Agriculture, 16*(1), 17. doi:10.3390/agriculture16010017

Vetter, J. (2009). A Biological Hazard of Our Age: Bracken Fern [*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn]—A Review. *Acta Veterinaria Hungarica, 57*(1), 183–196. doi:10.1556/AVet.57.2009.1.18

Vetter, J. (2022). The Norsesquiterpene Glycoside Ptaquiloside as a Poisonous, Carcinogenic Component of Certain Ferns. *Molecules, 27*(19), 6662. doi:10.3390/molecules27196662

Villar, D., & Ortiz Díaz, J. J. (2006). *Plantas tóxicas de interés veterinario: Casos clínicos.* Barcelona: Masson.

Waret-Szkuta, A., Jégou, L., Lucas, M., Gaide, N., Morvan, H., & Martineau, G.-P. (2021). A case of eagle fern (*Pteridium aquilinum*) poisoning on a pig farm. *Porcine Health Management, 7*(1), 2. doi:https://doi.org/10.1186/s40813-020-00185-9

Whitehead, S. J., & Digby, J. (1997). The morphology of bracken (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn) in the North York Moors—a comparison of the mature stand and the interface with

heather (Calluna vulgaris (L.) Hull). 2. The rhizome. *Annals of Applied Biology, 131*(2), 291–305. doi:10.1111/j.1744-7348.1997.tb05400.x

Wikiloc. (2026). *Wikiloc*. Obtenido de Cuellje: https://es.wikiloc.com/rutas-senderismo/cuellaje-252923785

Wolf, P., Rowe, C., Kinosian, S., Der, J., Lockhart, P., Shepherd, L., . . . Thomson, J. (2019). Worldwide relationships in the fern genus *Pteridium* (bracken) based on nuclear genome markers. *American Journal of Botany, 106*(10), 1365–1376. doi:10.1002/ajb2.1365

Wosiacki, S., Claus, M., Alfieri, A., & Alfieri, A. (2006). Bovine papillomavirus type 2 detection in the urinary bladder of cattle with chronic enzootic haematuria. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 101*(6), 635–638. doi:https://doi.org/10.1590/S0074-02762006000600009

Yamada , K., & Ojika, M. (2017). *Bioactive Natural Products from Ferns.* Cham: Springer International Publishing.

Yoshihira, K., Fukuoka, M., Natori, S., Umeda, M., Moroshi, T., Enomoto, M., & Saito, M. (1978). Chemical and toxicological studies on bracken fern, *Pteridium aquilinum var*. *latisculum*. I. Introduction, extraction and fractionation of constituents, and toxicological studies including carcinogenicity tests. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 26*(8), 2346–2364.

Zenkteler, E., & Nowak, O. (2019). Application of morphometric study to discriminate Pteridium aquilinum (L.) Kuhn subsp. pinetorum (C. N. Page & R. R. Mill 1995) J. A. Thomson in Poland. *Biodiversity: Research and Conservation, 56*, 1–12. doi:10.2478/biorc-2019-0015

Zenkteler, E., Michalak, K., & Nowak, O. (2022). Characteristics of indusia and sori in the two subspecies of *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn occurring in Poland. *Biodiversity: Research and Conservation, 67*, 1–8. doi:10.2478/biorc-2022-0010