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 Peñaherrera.

Idrovo Muñoz, Leonardo Efraín

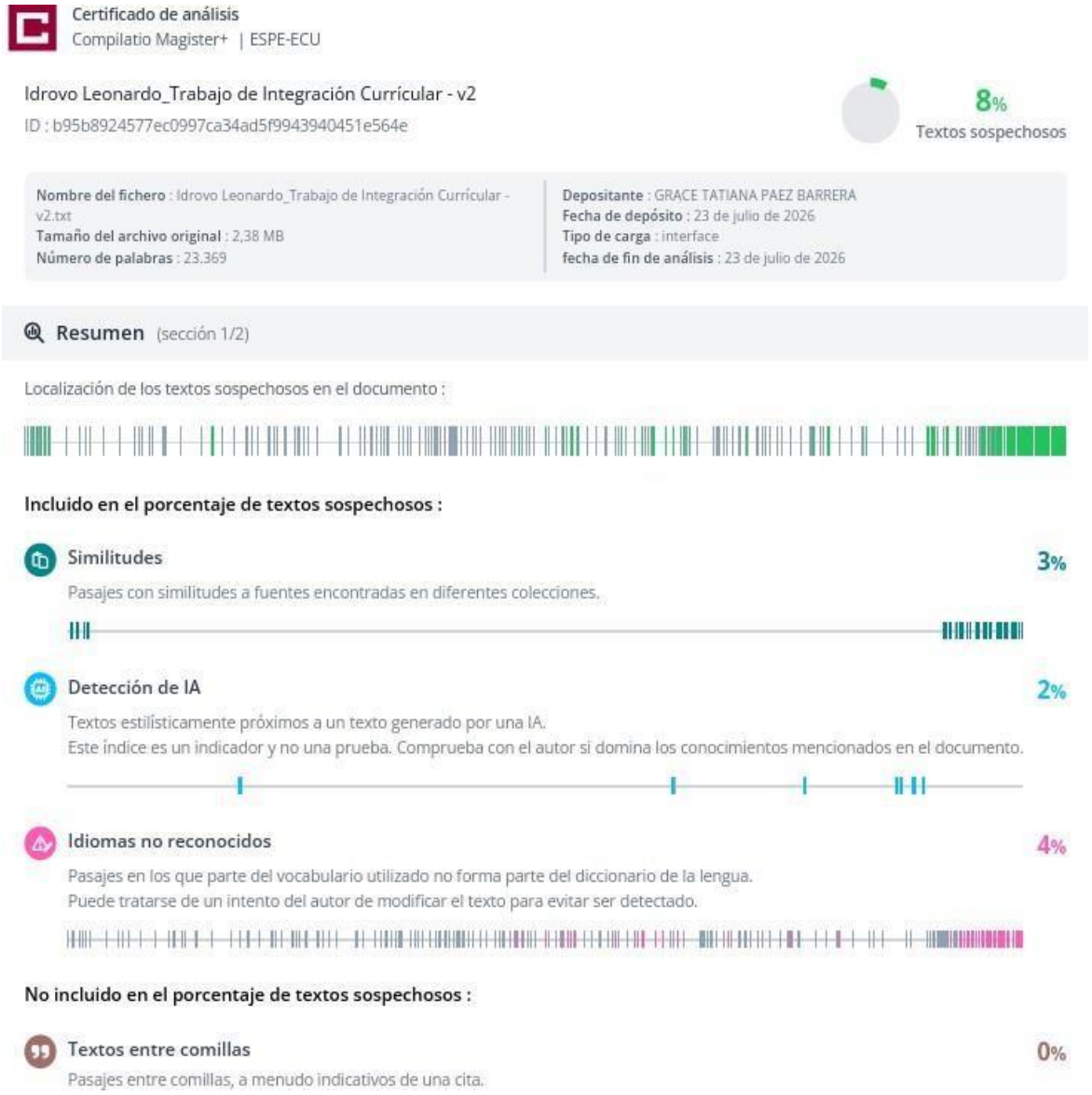
Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniero Biotecnólogo

MSc. Páez Barrera, Grace Tatiana

05 de agosto del 2026



Certificado de análisis
Compilatio Magister+ | ESPE-ECU

Idrovo Leonardo_Trabajo de Integración Curricular - v2
ID : b95b8924577ec0997ca34ad5f9943940451e564e

8%
Textos sospechosos

Nombre del fichero : Idrovo Leonardo_Trabajo de Integración Curricular - v2.txt
Tamaño del archivo original : 2,38 MB
Número de palabras : 23.369

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 3%
Pasajes con similitudes a fuentes encontradas en diferentes colecciones.

Detección de IA 2%
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 4%
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

MSc. Páez Barrera, Grace Tatiana

Directora

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 Peñaherrera**" fue realizado por el señor **Idrovo Muñoz, Leonardo Efraín,** 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 del 2026

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

MSc. Páez Barrera, Grace Tatiana

Directora

C.C.: 1710134626

Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Idrovo Muñoz, Leonardo Efraín**, con cédula de ciudadanía Nro. 2350023319, declaro 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 Peñaherrera** es de mi 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 del 2026

Validar únicamente en FirmaEC.
Firmado electrónicamente por:
LEONARDO EFRAIN
IDROVO MUÑOZ

Idrovo Muñoz, Leonardo Efraín

C.C.: 2350023319

Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo **Idrovo Muñoz, Leonardo Efraín**, con cédula de ciudadanía Nro. 2350023319, autorizo/autorizamos 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 Peñaherrera,** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi/nuestra responsabilidad.

Sangolquí, 19 de agosto del 2026

Validar únicamente en FirmaEC.
Firmado electrónicamente por:
LEONARDO EFRAIN
IDROVO MUÑOZ

Idrovo Muñoz, Leonardo Efraín

C.C: 2350023319

Dedicatoria

Dedico principalmente mi obra a Dios, quien me ha permitido tener el razonamiento e inteligencia necesaria para poder abordar siempre mis temas académicos, personales y sociales.

También a mis padres, quienes me han tenido paciencia durante todas mis épocas de vida, incluso en aquellas en las cuales no me comprendía ni yo mismo.

A mi hermano, por quien he tratado de ser un ejemplo del cuál se sienta orgulloso y, sobre todo, sea una inspiración para que llegue a ser mucho mejor hombre que yo.

A Camila, porque siempre estuvo conmigo a mi lado, a pesar de todas las situaciones adversas del camino, ella ha sido siempre quien me ha escuchado, aconsejado y querido con gran autenticidad y de forma incondicional.

A Nina, por acompañarme todas aquellas noches de desvelo, días de solitario y por amarme y verme con ojos de amor.

A mi abuela Marina y abuelo Emilio, quienes me cuidan desde el cielo y que extraño en gran nivel. A mis abuelos Angela y Santos, porque nunca dejaron de creer en mí y siempre aconsejaron continuar este proceso con gran entusiasmo y esperanza.

Y a mis familiares y amistades cercanas, por haber hecho el camino más ligero y ayudarme en cada etapa de mi vida de forma incondicional.

Agradecimiento

Expreso mi más sincero agradecimiento a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, por haberme dado la instrucción necesaria para poder emprender este camino profesional y por darme las herramientas adecuadas para este fin.

A la ingeniera Tatiana Páez, por haber sido mi mayor soporte académico durante mucho tiempo, la quiero y estimo con gran autenticidad.

A la docente Blanca Naranjo, por su guía y consejos en el área de fitoquímica, fundamental para el desarrollo metodológico de este estudio.

Al Laboratorio de Productos Naturales de la Universidad Regional Amazónica IKIAM, en especial a la Dra. Gabriela Salazar, por su apoyo con los insumos esenciales para llevar a cabo esta investigación.

Al CENCINAT, por brindar el espacio y los recursos necesarios para llevar a cabo este trabajo. De manera especial, agradezco al Ing. Wilson Navas y a las ingenieras Geovanna Arroyo y Katherine Garay, Mgtr., por todos los consejos, el apoyo, el acompañamiento y la guía brindada durante el desarrollo experimental.

Al Dr. Danny Zambrano director del Proyecto Social Institucional Apoyo Técnico a las comunidades rurales del Ecuador por parte de las Fuerzas Armadas y la academia y al Gobierno Autónomo Descentralizado Parroquial Rural de Plaza Gutiérrez.

Finalmente, a las personas que me han apoyado en todo este proceso; mis padres, hermano, a Camila, mis amigas y amigos.

Índice de contenidos

Certificación 3

Responsabilidad de Autoría 4

Dedicatoria 6

Agradecimiento 7

Índice de Figuras 11

Índice de Tablas 15

Resumen 17

Abstract 18

Capítulo I 19

Introducción 19

Planteamiento del problema 19

Formulación del problema o pregunta de investigación 20

Objetivos 20

Justificación 20

Capítulo II 23

Estado del arte 23

Avances en la evaluación toxicológica global de *Pteridium aquilinum* L. (Kuhn) 23

Estudios de variación de toxinas por estado fenológico en América del Sur 24

Avances metodológicos en la detección y cuantificación de toxinas en *Pteridium aquilinum* L. (Kuhn). 26

Estado de investigación sobre HEB en Ecuador y la región andina 28

Vacíos de conocimiento en el marco de esta investigación 30

Marco teórico 32
Taxonomía y clasificación de *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn 32
Morfología y caracteres botánicos 34
Distribución geográfica y relación dentro de los ecosistemas 35
Ecología, fenología y plasticidad fenotípica 37
Perfil fitoquímico general 38
Ptaquilósido, Caudatósido, tiaminasas y otras toxinas del helecho: Estructura y propiedades 40
Mecanismo de acción toxicológico 43
Variación de toxinas según estado fenológico 45
Definición y epidemiología de la HEB 46
Agroecología de Peñaherrera e Imbabura y Ganadería bovina 48
Métodos de detección o cuantificación de toxinas vegetales 50
Estrategias de control de *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn 52
Marco conceptual 53
Pteridium aquilinum (L.) Kuhn 53
Estado fenológico 53
Metabolito secundario 53
Glucósido ilúdano 53
Ptaquilósido (PTA) 54
Caudatósido (CTA) 54
Pterosina A 54
Genotoxicidad 54
Hematuria Enzoótica Bovina (HEB) 55
Cromatografía de capa fina 55

Capítulo III 56
Metodología 56
Enfoque de investigación 56
Tipo y diseño de investigación 56
Población y muestra 57
Técnica e instrumento 59
Estadística 71
Consideraciones éticas 72
Capítulo IV 74
Análisis y discusión de los resultados 74
Análisis de resultados 74
Discusión de resultados 96
Capítulo V 102
Conclusiones 102
Recomendaciones 107
Bibliografía 108

Índice de Figuras.

Figura 1. Correlación con presencia de hematuria y la existencia de helecho Pteridium aquilinum (L.) Kuhn dentro de Bolívar..... 27

Figura 2. Filogenia resumida de las traqueófitas, que muestra las relaciones entre las familias de licófitas y helechos..... 32

Figura 3. Foto a detalle del envés de una fronda de Pteridium aquilinum (L.) Kuhn..... 33

Figura 4. Soros a detalle de Pteridium aquilinum (L.) Kuhn 34

Figura 5. Cambios de distribución en Pteridium aquilinum (L.) Kuhn, según las épocas climáticas. (a) Helecho en pleno crecimiento. (b) Helecho en primavera. (c) Helecho en verano. (d) Helecho en invierno..... 35

Figura 6. Mapa de calor de distribución en una área específica en bosques de Europa..... 36

Figura 7. Respuesta general a nivel de rizoma a diferentes altitudes de Pteridium aquilinum (L.) Kuhn. (a), (b) y (c) biomasa de rizoma; (d), (e) y (f) longitud de rizoma; (g), (h) e (i) número de brotes.. 37

Figura 8. Análogos de ptaquilósido y pterosinas identificados en Pteridium aquilinum (L.) Kuhn. 38

Figura 9. Análisis con HPLC-MS del material vegetal de Pteridium aquilinum (L.) Kuhn, donde se evidencia que la concentración es variable respecto a estado fenológico..... 39

Figura 10. Intermediarios de degradación del Ptaquilósido 40

Figura 11. Hidrólisis ácida y básica de la molécula Ptaquilósido, descomposición y metabolismo 41

Figura 12. Mecanismo de reacción por parte de la tiaminasa I. 42

Figura 13. Aductos de ADN formados por la reacción de la Dienona de ptaquilósido, generando eventos de genotoxicidad..... 43

Figura 14. Contenido de ptaquilósido en distintos estados fenológicos del Pteridium aquilinum (L.) Kuhn. En los cuales II, III y IV, corresponden a estados fenológicos inmaduros y el resto maduros..... 44

Figura 15. Distribución de casos de HEB por zona altitudinal en Ecuador 46

Figura 16. Respuesta clásica de sinergismo entre taninos y saponinas, así como presencia de toxinas dentro de Pteridium aquilinum (L.) Kuhn 47

Figura 17. Zonas de deforestación en Peñaherrera (zonas moradas) y de pastizales (zonas amarillas). Las zonas deforestadas son fácilmente invadidas por Pteridium aquilinum (L.) Kuhn 48

Figura 18. Porcentaje del tipo de clima presente en Peñaherrera..... 48

Figura 19. Cromatogramas obtenidos de HPLC-UV detector (a) estándar de ptaquilósido 200 ug/mL (b) a partir de muestras maceradas de Pteridium aquilinum (L.) Kuhn..... 49

Figura 20. Espectro de masas de iones producto observado para el ptaquilósido (PTA) con ion precursor de m/z 399 en una disolución patrón. En este espectro de espectrometría de masas en tándem se observan tres iones producto..... 50

Figura 23. Resultados obtenidos de líneas de tendencia en poblaciones de Pteridium aquilinum (L.) Kuhn, sin tratamiento (Untr), control mecánico (Cutx) y control químico (aerosol) 51

Figura 22. Distribución de las unidades muestrales de Pteridium aquilinum L. (Kuhn) recolectadas en fincas lecheras de la parroquia de Peñaherrera. 57

Figura 23. Observación de cercanía, mediante una lupa, para determinar el estado de los soros en Pteridium aquilinum (L.) Kuhn 59

Figura 24. Pteridium aquilinum (L.) Kuhn que presenta soros de color negro, acorde a un estado fenológico maduro..... 59

Figura 25. Ilustración geográfica obtenida de Wikiloc..... 60

Figura 26. Almacenamiento de ejemplares de Pteridium aquilinum (L.) Kuhn, para disminuir problemas de oxidación..... 61

Figura 27. Proceso de secado y almacenamiento de muestras de Pteridium aquilinum (L.) Kuhn. 62

Figura 28. Proceso de caracterización botánica para identificación de estructuras morfológicas en Pteridium aquilinum (L.) Kuhn..... 63

Figura 29. Muestras en tubos falcón, previamente rotuladas y pesadas para el macerado..... 64

Figura 30. Ubicación de los 2 mL representativos de los macerados para posterior concentración..... 65

Figura 31. Concentrado hasta sequedad obtenido después de evaporar los solventes 66

Figura 32. Diagrama del proceso para maceración estandarizado para las toxinas de Pteridium aquilinum (L.) Khun 66

Figura 33. Muestra metanólica mezclada con N-Heptanol, en embudo de decantación 68

Figura 34. Esquema de la división de la placa cromatográfica de sílica gel..... 68

Figura 35. Parte posterior de una fronda madura de Pteridium aquilinum (L.) Kuhn, vista bajo macroscopio y con luz blanca. 74

Figura 38. Parte posterior de una fronda inmadura de Pteridium aquilinum (L.) Kuhn, vista bajo macroscopio y con luz blanca. 75

Figura 39. Visualización en microscopio óptico a 40x de esporas pertenecientes de una fronda madura de Pteridium aquilinum (L.) Kuhn, teñida con azul de toluidina. 76

Figura 40. Visualización en microscopio óptico a 40x de esporas pertenecientes de una fronda inmadura de Pteridium aquilinum (L.) Kuhn, teñida con azul de toluidina diluido 77

Figura 41. Corrida del estándar de Pterosina A, bajo mismas condiciones de fase móvil y sílica. 80

Figura 42. Resultado de primera placa cromatográfica TLC, vista bajo UV lejano. Corresponde a las muestras biológicas del estado fenológico "Inmaduro" de Pteridium aquilinum (L.) Kuhn..... 81

Figura 43. Resultado de segunda placa cromatográfica TLC, vista bajo UV lejano. Corresponde a las muestras biológicas del estado fenológico "Inmaduro" de Pteridium aquilinum (L.) Kuhn..... 82

Figura 44. Resultado de primera placa cromatográfica TLC, vista bajo UV lejano. Corresponde a las muestras biológicas del estado fenológico "Maduro" de Pteridium aquilinum (L.) Kuhn 84

Figura 45. Resultado de segunda placa cromatográfica TLC, vista bajo UV lejano. Corresponde a las muestras biológicas del estado fenológico "Maduro" de Pteridium aquilinum (L.) Kuhn 84

Figura 46. Presencia porcentual de Pterosina A, según la finca..... 87

Figura 47. Presencia de Pterosina A según la zona..... 88

Figura 48. Presencia de Pterosina A según el estado fenológico 89

Figura 49. Prevalencia observada de hematuria enzoótica bovina por finca analizada 92

Figura 50. Positividad toxicológica de Pteridium aquilinum (L.) Kuhn. Comparación por estado de madurez y toxicidad total 93

Figura 51. Relación entre la positividad toxicológica total del helecho macho (Pteridium aquilinum (L.) Kuhn) y la prevalencia observada de hematuria enzoótica bovina en las fincas evaluadas de la parroquia de Peñaherrera. 94

Índice de Tablas.

Tabla 1. Concentración de ptaquilósido en leche de vacas expuestas directamente a Pteridium aquilinum (L.) Kuhn en zonas montañosas de Ecuador..... 24

Tabla 2. Niveles de ptaquilósido en distintos estados fenológicos de Pteridium aquilinum (L.) Kuhn registrados en Colombia..... 25

Tabla 3. Resumen de métodos analíticos para detección de ptaquilósido 26

Tabla 4. Porcentaje de humedad de las muestras biológicas de Pteridium aquilinum (L.) Kuhn después del proceso de desecado 77

Tabla 5. Porcentajes de humedad promedio y materia seca promedio, segmentado según las fincas de donde proviene la muestra biológica. 79

Tabla 6. Porcentajes promedio de humedad y materia seca para las 24 muestras recolectadas. 79

Tabla 7. Resumen de Rfs obtenidos en la cromatografía de capa fina TLC, correspondiente a muestras biológicas de Pteridium aquilinum (L.) Kuhn inmaduras..... 82

Tabla 8. Resumen de Rfs obtenidos en la cromatografía de capa fina TLC, correspondiente a muestras biológicas de Pteridium aquilinum (L.) Kuhn maduras..... 85

Tabla 9. Frecuencia general de presencia para Pterosina A 86

Tabla 10. Porcentaje en cada finca, de presencia de Pterosina A 86

Tabla 12. Frecuencia porcentual en la presencia de Pterosina A según la zona 87

Tabla 13. Porcentaje de presencia de Pterosina A basado en el estado fenológico..... 88

Tabla 14. Coordenadas de las muestras biológicas, recolectadas en la parroquia de Peñaherra, tanto en la finca 1, 2 y 3 90

Tabla 15. Prevalencia observada de HEB por finca..... 91

Tabla 16. Positividad toxicológica de helechos en estado fenológico inmaduro y maduro..... 92

Tabla 17. Correlación entre toxicidad del helecho macho y prevalencia de HEB..... 94

Resumen

El helecho macho (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn) es un tipo de arvense, cosmopolita, abundante en zonas de pastoreo, que se caracteriza por su complejo perfil fitoquímico. Dentro de su estructura, se han identificado compuestos fenólicos, flavonoides, alcaloides, taninos, terpenoides y toxinas. Debido a esto, la especie vegetal ha sido relacionada con problemas de salud en animales de pastoreo, siendo una de las más complejas afecciones, la denominada hematuria bovina enzoótica. Son los grupos funcionales de los metabolitos secundarios de esta especie, los que inciden en que tenga una alta toxicidad, entre los principales grupos ciano, terpelactonas y anillos sulfúricos. Sin embargo, aunque tiene compuestos que podrían producir astringencia o amargor, la planta resulta palatable para el ganado bovino, sobre todo en el estado fenológico inmaduro de la especie, esto además considerando que las fincas evaluadas no realizan labores culturales para disminuir la población del helecho macho, además de la pobreza de suelo y pasto, el ganado lo consume como complemento a su dieta habitual. Este estudio, buscó relacionar la alta incidencia de hematuria enzoótica bovina reportada en la parroquia de Peñaherrera en Cotacachi - Imbabura, causada por el consumo del helecho macho por parte del ganado vacuno, el cual demostró mediante técnicas de cromatografía de capa fina, que contiene toxinas que causan esta enfermedad.

Palabras clave: Helecho macho, *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn, Hematuria enzoótica bovina (HEB), cromatografía de capa fina, pterosina A.

Abstract

Bracken fern (Pteridium aquilinum (L.) Kuhn) is a cosmopolitan weed abundant in grazing areas, characterized by its complex phytochemical profile. Phenolic compounds, flavonoids, alkaloids, tannins, terpenoids, and toxins have been identified within their structure. Because of this, the plant species has been linked to health problems in grazing animals, one of the most complex conditions being enzootic bovine hematuria. The functional groups of the secondary metabolites of this species, particularly cyano groups, terpelactones, and sulfur rings, are responsible for its high toxicity. However, although it contains compounds that could produce astringency or bitterness, the plant is palatable to cattle, especially in its immature phenological stage. This is further supported by the fact that the farms evaluated do not implement any management practices to reduce the male fern population, and given the poor soil and pasture conditions, the cattle consume it as a supplement to their regular diet. This study sought to link the high incidence of bovine enzootic hematuria reported in the parish of Peñaherrera in Cotacachi, Imbabura, to the consumption of male fern by cattle. Thin-layer chromatography techniques demonstrated that the fern contains toxins that cause this disease.

Keywords: Male fern, *Pteridium alquilinum* (L.) Kuhn, Enzootic Bovine Hematuria (EBH), thin layer chromatography, pterosin A.

Capítulo I

Introducción

Planteamiento del problema

El helecho macho es una especie del tipo arvense, que se considera una planta venenosa por las sustancias tóxicas que comprenden dentro de su complejo perfil fitoquímico. Sustancias como la prunasina y el ptaquilósido, han sido citadas en varías referencias actuales, las cuales lo correlacionan con problemas de salud animal, tales como son la intoxicación aguda por cianuro, hematuria, atrofia retiniana, inmunodeficiencia y trastornos lifoproliferativos incidiendo altamente en la aparición de carcinomas, en ganado bovino principalmente. (Kato-Noguchi & Kato, 2026).

La plasticidad fenotípica de la especie *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn es un tema complejo para considerar respecto a las modificaciones que sufre a nivel fitoquímico, dado principalmente por las influencias ambientales en el que crece y reproduce. Adicional a esto, *Pteridium* puede persistir en condiciones climáticas adversas y cuenta con características clásicas de especie competitiva; siendo así, un gran atributo la capacidad de alta reproducción, argumento por el cuál su proliferación en hábitats no controlados se da de forma descomunal (Marss & Watt, 2006).

En la parroquia rural de Peñaherrera, se ha observado que el helecho macho es palatable para el ganado bovino, sobre todo en épocas de sequía, donde el pasto común es escaso. Dada esta situación, de forma generalizada en zonas de pastoreo con ganado, ha resultado en un consumo masivo de dicha especie y, por ende, la salud animal ha empeorado notablemente. Estudios recientes han documentado que una de las enfermedades con mayor prevalencia, en ganado que se encuentra críado en dichas condiciones, es la hematuria enzoótica bovina (HEB) (Micheloud et al., 2017).

La HEB es un síndrome crónico de sangre en la orina, relacionada con anemia y tumores vesicales que resulta en la muerte del ganado. Este particular es ocasionado directamente, por el

consumo en potreros invadidos por *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn (Mejía Pacheco & Malo Cevallos, 2020).

Formulación del problema o pregunta de investigación.

A partir de lo anterior, la pregunta de investigación se plantea, basándose en evidencias científicas halladas y dentro existentes sobre la correlación entre las toxinas del helecho macho *Pteridium aquilinum* y la incidencia de HEB. El cuestionamiento específico es: ¿Cómo se relacionan las toxinas presentes en *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn con la alta incidencia de hematuria enzoótica bovina, diagnosticada en ganado lechero de la parroquia rural Peñaherrera, en Cotacachi - Imbabura?

Objetivos

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

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 Peñaherrera.

Justificación.

La especie *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn, es una especie pteridofítica con distribución prácticamente cosmopolita y marcada capacidad de invasión de pastizales y áreas degradadas. Según Kato-Noguchi & Kato (2026), la especie presenta una notable adaptabilidad a diferentes regímenes

climáticos, así como una alta capacidad de rebrote; siendo persistente en potreros destinados para criar al ganado.

En este sentido, el helecho macho representa actualmente una amenaza real para la salud animal, enfatizada principalmente por la distribución global de la especie, rápida propagación mediante sus esporas y palatabilidad agradable para las vacas; así también se ha convertido en una planta que amenaza por su rápida reproducción a los ecosistemas, especialmente en bosques nativos andinos (Velazco et al., 2024).

La parroquia rural de Peñaherra, es una localidad que se encuentra en la provincia de Imbabura, cuyo territorio presenta un clima del tipo “Bosque húmedo”, propicio para el desarrollo del helecho (Kato-Noguchi & Kato, 2026). Su pequeña población, depende económicamente de actividades agrícolas y de la crianza de animales domésticos como el ganado bovino y la venta de leche o subproductos lácteos. El plan de desarrollo económico y de sostenibilidad para la parroquia se ha visto seriamente afectado, debido al gran aumento de casos de enfermedades en ganado, principalmente reportándose sangre en orina (Hematuria Bovina Enzoótica) y muerte seguida (Pereira et al., 2022).

Peñaherrera tiene una superficie de 122,4 km2 con un rango altitudinal desde los 1181 msnm (Aguagrún) a 3490 msnm (Cordillera de Toisán). La variación permite que la especie problema pueda crecer prácticamente en todo el territorio, notablemente abundante en zonas de ganadería o agricultura. Adicional a esto, las precipitaciones de la parroquia son en frecuencias regulares, mismo que, contribuye al desarrollo normalizado del helecho (Magdalena et al., 2025).

El ganado no puede evitar el contacto directo con el helecho, incluso si existen cerramientos limitantes en los terrenos destinados a protero. Como se ha enfatizado, las toxinas dentro del perfil fitoquímico del helecho son de fácil movilidad, por encontrarse naturalmente en forma de glicósidos dando como resultado un ataque masivo tanto al tracto digestivo del ganado, suelo y agua cercana (Gil da Costa et al., 2024).

Uno de los problemas clínicos más documentados asociados con la ingestión de partes vegetativas de *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn, es la hematuria enzoótica bovina (HEB), una patología crónica que se caracteriza por anemia y lesiones neoplásicas de la vejiga en bovinos, estrechamente vinculada a la ingestión prolongada de este helecho. La causalidad es debido a la toxina ptaquilósido; un sesquiterpeno de carácter aromático, que se encuentra en distintas concentraciones según el estado fenológico del helecho, su consumo continuado desencadena procesos carcinogénicos que culminan en tumores vesicales y otras anomalías del tracto urinario de los animales (Kim et al., 2023).

García-Jorgensen et al., (2021) han analizado frondes de *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn en distintos estados fenológicos, observándose que las toxinas varían en niveles de concentración según el proceso de crecimiento por el que esté atravesando el helecho. De hecho, el análisis toxicológico en el estado fenológico inmaduro ha arrojado resultados alarmantes (Malík et al., 2024). Cabe resaltar que, el ganado prefiere las hojas tiernas por tener un sabor mucho menos amargo y más dulce, considerando esto, el problema es mucho más incontenible (Ribero & Soto-Blanco, 2020).

Capítulo II

Estado del arte.

Avances en la evaluación toxicológica global de *Pteridium aquilinum* L. (Kuhn).

El helecho macho es considerado por diversos autores y fundaciones sobre la biodiversidad, como una de las plantas que se encuentra ampliamente distribuida a nivel global; en este sentido, es una planta sumamente común, dentro de los pastizales, montañas, áreas verdes, entre otros. Por ello, es catalogada como cosmopolita (Malík et al., 2024; Sheidai, et al., 2026; Schlegel & Riesen, 2021).

Atribuyendo a su gran capacidad de formar colonias dominantes mediante sus rizomas subterráneos, es por lo cual, se considera en muchas zonas del mundo como una planta parásita. Y no solamente en esto, sino, en la alta reproducibilidad mediante sus esporas; misma que, es favorecida por cambio climático, incendios o agricultura del tipo “rosa-tumba-quema”, de modo tal que, la regeneración forestal es prácticamente inexistente (Esclava-Silva et al., 2020; Carvalho et al., 2022).

Debido a la facilidad de expansión e invasión por parte de *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn, es de alta relevancia sus reportes de aparición tanto en potreros como pastizales de América Latina, como son los países de Colombia, Ecuador, Venezuela, Bolivia y Brasil; aconteciendo en los mismos un impacto negativo en gran porcentaje, sobre todo en la biodiversidad, producción ganadera y salud animal (retando a la humana) (Rincón et al., 2016).

Hacía ya varios años, aproximadamente desde 1998 el helecho macho y en general, el género *Pteridium*, ha tomado una relevancia por las toxinas con las que se lo relaciona; principalmente glucósidos norsesquiterpénicos del tipo iludiano como el ptaquilósido (PTA), Caudatósido (CAU) y ptesculentósido (PTE), así como los productos de hidrólisis de estos, que en su mayoría son pterosinas (Pterosina A y B principalmente). Y adicional a esto, su perfil químico contiene tiaminasas, prunasina y compuestos alelopáticos (Kato-Noguchi & Kato, 2026).

Las razones por las cuáles *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn es analizado fitológicamente, es porque su consumo siempre se ha visto envuelto en graves consecuencias para el ganado bovino principalmente; entre estos, están la aparición de hematuria bovina enzoótica, carcinogénesis a nivel de vejiga y tracto urinario y anemia moderada; causando en muchos casos, la muerte del animal (Sierra et al., 2025).

En otros aspectos, el Caudatósido y PTE, resultan ser poco estudiados debido a las bajas concentraciones encontradas en las frondas del helecho; sin embargo, los mecanismos de intoxicación son similares o iguales al de PTA. Dentro de los productos de degradación de dichos compuestos, se encuentran pterosinas, que han sido detectadas en tejidos vegetales, suelos y fluidos biológicos (como son la leche o sangre); y por ello, son usadas como biomarcadores indirectos a la exposición de toxinas parentales (Kisielius et al., 2020; Kim et al., 2023).

La alquilación del ADN es considerada uno de los riesgos más predominantes dados por la intoxicación de helecho; esto debido a la formación de aductos en posiciones N3 de adenina y N7 de guanina; conduciendo de este modo a la escisión de bases y daño en la doble hélice. El daño genético es traducido a mutaciones puntuales que promueven la generación de cáncer; inclusive, en complicaciones cromosómicas por inestabilidad (Rodríguez-Salazar & Chacón-Villalobos, 2023).

Según Sierra et al., 2025, en ensayos de genotoxicidad realizados en la especie *Drosophila melanogaster* han validado la alta capacidad mutagénica y recombino génica de extractos puros de *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn, que se conocía, tenían elevadas concentraciones de ptaquilósido.

Estudios de variación de toxinas por estado fenológico en América del Sur.

Pteridium aquilinum (L.) Kuhn tiene una dinámica fenológica y, por ende, en la concentración toxicológica depende en el estado de la planta. Usualmente, se han analizado en dos estados fenológicos principales; maduro e inmaduro. En un estado inicial, especialmente cuando los frondes son jóvenes, los niveles de toxina como PTA y CAU, son sumamente altos, Mientras que, en frondas maduras

o adultas, la concentración se ve moderadamente disminuida. Es relevante mencionar que, en rizomas, las toxinas no suelen acumularse, y por ello, la mayor cantidad de toxina se encuentra en partes aéreas de la planta (García-Jorgensen et al., 2021; Kisielius et al., 2020).

En este sentido, no solo influye el estado fenológico como un factor determinante al contenido de toxinas de la planta, sino también del cambio climático, genética de población, altitud y composición del suelo (Kato-Noguchi & Kato, 2026). Por ejemplo, se ha denotado que, en regiones andinas, la presencia del género *Pteridium* es sumamente acentuada, porque se ha documentado que su crecimiento es exponencial en condiciones de suelos ácidos, pobres en nutrientes y altitudes que varían desde los 1800-3200 msnm (Rodríguez-Salazar & Chacón-Villalobos, 2023).

Por otro lado, la transferencia de PTA, CAU y pterosinas, ha sido reportada sobre todo en leche de vacas y agua cercana a crecimiento masivo del helecho macho. En Ecuador, se han detectado niveles residuales de PTA en el 82.76% de muestras analizadas de leche y sangre bovina; reportando incluso concentraciones máximas de hasta 2219.67 ug/mL y un promedio de 805 ug/mL (Calderón Tobar et al., 2015).

Tabla 1.

Concentración de ptaquilósido en leche de vacas expuestas directamente a Pteridium aquilinum (L.) Kuhn en zonas montañosas de Ecuador.

Cantón	% muestras positivas	Concentración máxima (ug/mL)	Concentración promedio (ug/mL)
San Miguel de Bolívar	82.76	2219.67	805.42
Chimbo	89.29	2641.13	894.13
Echendía	89.29	2130.12	N/D

Nota: Resultados obtenidos de (Calderón Tobar et al., 2015).

Se han llevado a estimaciones generales con los promedios obtenidos en diversos estudios realizados sobre la presencia de PTA en los residuos de leche bovina y sangre. Usualmente, por la composición química general que tiene el PTA, la excreción de la toxina es sumamente fácil y en un porcentaje directamente correlacionado con la ingestión del helecho (Rincón et al., 2016).

Tabla 2.

Niveles de ptaquilósido en distintos estados fenológicos de Pteridium aquilinum (L.) Kuhn registrados en Colombia.

Sitio de recolección	Estado fenológico	ug/g de ptaquilósido
Zona alta	Inmaduro estado I	41
Zona media alta	Inmaduro estado II	1194
Zona media baja	Maduro estado III	961
Zona rocosa	Inmaduro estado I	23

Nota: Resultados dados por (Rincón et al., 2016).

Avances metodológicos en la detección y cuantificación de toxinas en *Pteridium aquilinum* L. (Kuhn).

La detección y cuantificación de toxinas vegetales es uno de los apartados más estudiados dentro del marco de análisis de *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn. En principio, la separación cromatográfica ha sido la más relevante para la detección y cuantificación de PTA, sin embargo, gracias al avance basto de nuevas técnicas de cromatografía, se ha llegado al "Gold standard", siendo así, el uso de el acoplamiento a espectrometría de masas.

La técnica LC-MS/MS o HPLC-MS es una de las metodologías con mayor sensibilidad, especificidad y capacidad para este tipo de muestra vegetal, en la cual, acontece en contener distintos tipos de compuestos químicos en trazas, que varían incluso desde los ppm hasta los ppb (partes por billón). En general, la técnica va desde una adecuada maceración en fase sólida SPE, la utilización de una columna C18 con gradientes y el uso del espectrofotómetro de masas en modo MRM (Park et al., 2023).

La conservación de las muestras es un tema para considerar cuando se trabaja con *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn, porque la inestabilidad de sus toxinas es algo sumamente recurrente. Lo que se ha observado en diversas investigaciones, es el uso de tampones ácidos, compuestos principal por acetato de amonio a un pH de 5.5 y las muestras suelen ser congeladas hasta el análisis (Park et al., 2023).

Actualmente, con finalidades prácticas se suele realizar homogenizaciones en las muestras previamente maceradas con solventes polares o con polaridad moderada; seguido de una limpieza con cartuchos SPE o la tecnología QuEChERS y un filtrado con microfiltros de 0,22 um antes de la inyección al sistema de cromatografía (Clauson-Kaas et al., 2016; Hao et al., 2021).

En estudios recientes, la correlación entre los niveles de pterosinas encontrados en *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn y la frecuencia de mosaicismo en *Drosophila*, ha resultado con tendencia positiva. En este aspecto, el biomarcador resulta ya validado, actualmente, para monitorear la exposición ante el helecho macho y el riesgo genotóxico que presupone dicho elemento dentro de un ambiente no controlado (Feito et al., 2026; Pitchakarn et al., 2021).

Todos estos métodos analíticos, particularmente utilizados para la detección y cuantificación de toxinas derivadas de *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn, son guiados en general por normativa internacional; sobre todo por la consideración de que la PTA es oncogénica, por lo tanto, la evaluación requiere alta selectividad y especificidad, sin alterar la matriz analizada (Park et al., 2023).

Tabla 3.

Resumen de métodos analíticos para detección de ptaquilósido.

Método	Matriz	LOD (ug/L)	LOQ (ug/L)	Características
HPLC-UV	Vegetal y leche	Aprox. 1	Aprox. 2	Accesible pero menos sensible
LC-MS/MS	Vegetal, leche, agua y carne	0.046-2.5	0.37-5	Mayor sensibilidad y especificidad

ELISA	Suero bovino	Aprox. 10	Aprox. 20	Rápido, pero con baja especificidad

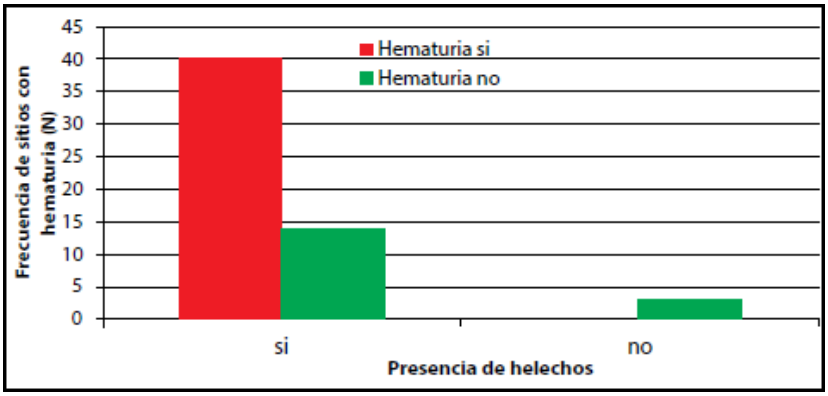
Nota: Adaptado de (Sierra et al., 2025).

Estado de investigación sobre HEB en Ecuador y la región andina.

Actualmente, la Hematuria Enzoótica Bovina (HEB) representa una enfermedad endémica, sobre todo en regiones ganaderas de Sierra ecuatoriana, Colombia, Venezuela, Bolivia y Brasil; donde principalmente se ha denotado una alta invasión en potreros por *Pteridium aquilinum* y *Pteridium arachnoideum* (García-Jorgensen et al., 2021). Por ejemplo, en Ecuador, los estudios documentan una prevalencia de alrededor del 8.7% para la HEB y una correlación sin precedentes de helecho macho (Calderón Tobar et al., 2015).

Figura 1.

Correlación con presencia de hematuria y la existencia de helecho Pteridium aquilinum (L.) Kuhn dentro de Bolívar.



Nota: Obtenido de: Calderón Tobar et al., 2015.

Dentro del estudio realizado por Calderón Tobar et al., 2015, se observó que al menos en el 60% de los casos analizados, la aparición de HEB era sumamente prevalente y las muertes de bovinos era recurrente; con un odds ratio de 19.55 para HEB y 6.77 para las muertes reportadas, derivadas de dicha sintomatología.

Generalmente el diagnóstico clínico y epidemiológico en la región andina de la sierra ecuatoriana, es basada en la observación de sangre en orina; seguida de una fuerte anemia, seguida de pérdida de peso acentuada y como final, la aparición de lesiones ulcerativas y tumores de vejiga o en el tracto urinario (estos últimos confirmados por análisis histopatológico mediante la necropsia) (Rodríguez-Salazar & Chacón-Villalobos, 2023).

Es de conocimiento veterinario que la enfermedad que conlleva la ingestión de *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn, afecta principalmente a los animales que son mayores a 2 años, y por condiciones de vulnerabilidad, es mucho más frecuente en hembras gestantes o que recientemente dieron parto (posparto) (Calderón Tobar et al., 2015; Gomes et al., 2012).

En los pastizales de la sierra ecuatoriana, se registra una alta presencia de ptaquilósido en leche de vacas que han sido expuestas de forma continua a *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn; sobre todo, en cantones como San Miguel de Bolívar y otros cantones cercanos, donde se han detectado niveles residuales en un porcentaje de 82.76-89.29% de las muestras analizadas, con concentraciones sumamente altas (Calderón et al., 2013; Cáceres-Peña et al., 2013). Con esto, los hallazgos confirman el riesgo potencial para la salud pública, especialmente en comunidades rurales que consumen la lecha sin pasteurizarse.

El diagnóstico de HEB en campo se suele apoyar en las tiras reactivas urinarias y análisis microscópico del sedimento urinario, de forma tal que, son suficientes para detectar HEB y elementos celulares asociados a daño renal y vesical (Chenard et al., 2025). La sensibilidad y especificidad de dichas metodologías han sido validadas para confirmar distintas alteraciones bioquímicas.

Así también, el tratamiento de animales afectados suele darse a partir de los primeros síntomas evidentes; en este sentido, la mayoría de los agricultores pasan desapercibidos distintos signos de enfermedades silenciosas, y al final, en la aparición de sangre en orina, en muchos casos, el animal ya se encuentra en una etapa final o casi terminal. Dentro de sus presupuestos y capacidades, los

tratamientos siguen siendo inciertos y costosos, mediante la administración de antibióticos, vitaminas y suplementos (Verde et al., 2017).

En los últimos 5 años, se ha venido utilizando técnicas de teledetección, también conocidas como fotometría NDVI; una herramienta sumamente eficaz para mapear y monitorear la expansión de *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn, en las áreas agrícolas y ganaderas. Basado en este contexto, se permite la detección temprana de las invasiones y aplicación selectiva de controles, sean estos físicos o químicos (Sierra et al., 2025).

Vacíos de conocimiento en el marco de esta investigación.

Incluso después de diversas investigaciones tanto de identificación como de cuantificación de las toxinas representativas de *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn, actualmente hay muchos vacíos importantes, sobre todo en la variabilidad genética y química de poblaciones principalmente de las sudamericanas. Debido a que varios estudios han sido realizados en zonas de Europa y Asia, las investigaciones sistemáticas en regiones andinas de Latinoamérica son sumamente escasas (Kisielius et al., 2020; Sierra et al., 2025).

Con respecto a la estabilidad de las toxinas dentro de las distintas matrices en las que se encuentra, la estandarización de un método adecuado de maceración y conservación han sido debatidas durante muchos años. Por lo cual, estudios recientes como el realizado por (Park et al., 2023), han estandarizado el uso de solventes orgánicos polares como butanol y etanol. Así también, la reconcentración mediante cartuchos SPE, previo al análisis cromatográfico (Kisielius et al., 2022).

En este sentido, surge la necesidad de poder contemplar protocolos que sean reproducibles, estandarizados y económicos; con esto en mente, las consideraciones científicas deben ser debidamente validadas y comprobadas mediante rigurosas técnicas de análisis cualitativo y cuantitativo, si requiere el caso. Es necesario hacer estudios comparativos y en distintas condiciones ambientales (Sierra et al., 2025).

Faltan estudios epidemiológicos longitudinales, con la finalidad de buscar correlaciones dentro de exposición e incidencia de cáncer bovino; ahora, en este aspecto, aunque mucho más abarcado, también se incluye conocer la incidencia de cáncer gástrico y otras patologías en poblaciones humanas, que consumen leche sin pausterizar o carne mal cocida, dentro de la región andina (Rincón et al., 2016).

La evaluación se debería definir dentro de biomarcadores de exposición y efecto en humanos y bovinos; de este modo, actualmente, uno de los métodos más utilizados es mediante el análisis de pterosinas, por ser los productos degradados directos de PTA y CAU, pero falta robustez en el análisis aplicado para las mismas (Malík et al., 2024).

Marco teórico

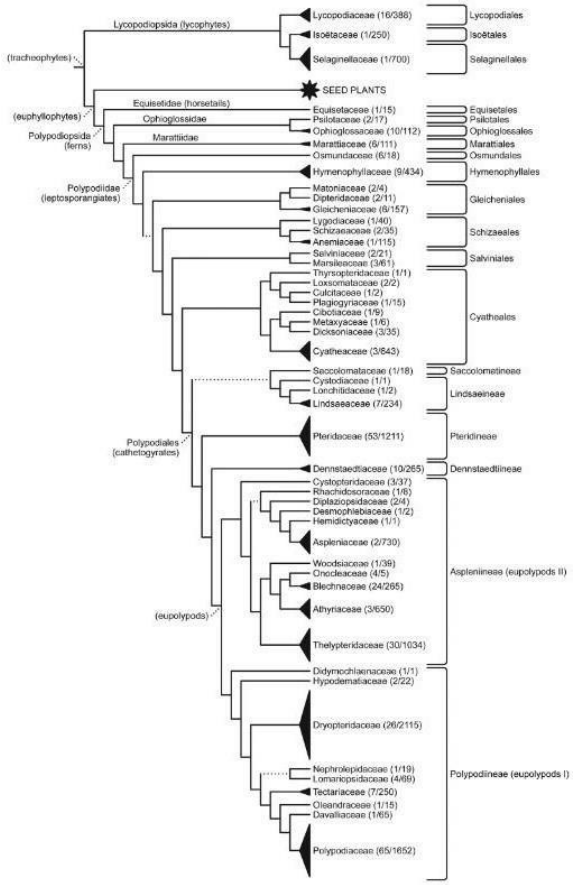
Taxonomía y clasificación de *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn.

El género *Pteridium* consiste en aproximadamente 100 especies de helechos, donde usualmente se suelen dar subespecies por cada especie y distintas variaciones, acomplejando bastante la taxonomía del género mediante técnicas clásicas. Por ello, desde 1999 se han utilizado técnicas genéticas dando identidad fingerprinting, y a partir de esto, distintas subespecies, ahora son especies; entre ellas, está *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn (Štefanić et al., 2022).

La especie *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn pertenece al orden Polypodiales, en la familia Dennstaedtiaceae. Linneo estableció a dicha especie como *Pteris aquilina* L. y se transfirió posteriormente al género *Pteridium* por Kuhn. La taxonomía del grupo es aún revisada mediante estudios moleculares y morfométricos; sin embargo, se han reconocido desde 2 hasta 17 taxa intraespecíficos (Schuettpelz et al., 2016).

Figura 2.

Filogenia resumida de las traqueófitas, que muestra las relaciones entre las familias de licófitas y helechos



Nota: Tomada de Schuettpelz et al., (2016).

A nivel ecológico e integral, han señalado que las delimitaciones taxonómicas que presenta *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn, se debe por las variaciones presentadas sobre la toxicología y perfil fitoquímico; dando distintos valores a nivel de concentración. Debido a esto, las variedades y subespecies no son extrapolables entre sí, incluso, difiriendo a nivel regional. Esto destaca la importancia de una correcta identificación botánica del material vegetal, previo a cualquier análisis posterior (Gil da Costa et al., 2024).

La nomenclatura binominal de *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn, en *sensu lato*, ha sido estandarizada y generalizada para entrar dentro de concordancia científica con otras ramas que analizan al helecho; como es la ciencia veterinaria y toxicológica. En Peñaherrera y mayormente en los andes ecuatorianos, la subvariedad predominante es *arachnoideum* (Peregrym et al., 2024).

Morfología y caracteres botánicos.

Pteridium aquilinum (L.) Kuhn es una planta vascular no semillada, por ello pertenece a la clase pteridofítica, cuyo cuerpo vegetativo se compone de un rizoma subterráneo y de frondes aéreas. La especie tiene una rizoma característica, debido a su nivel de adaptación; es un tallo modificado de crecimiento horizontal, profundo (hasta aprox. 1 m), ramificado dicotómicamente y cubierto por tricomas finos de coloración parda (Malík et al., 2024).

Se conoce que las frondes del helecho macho emergen de forma individual desde el rizoma, de tal modo que el pecíolo presenta gran robustez, erguido, de sección suborbicular y ligeramente aplanada en la cara abaxial. La longitud de este tallo varía entre 0.3 a 1.5 m. La lámina foliar de tamaño grande, triangular y con longitud de hasta 2 m; está dividida de forma bipinnadada o tripinnado-pinnatífida (Sokolova, 2023).

Figura 3.

Foto a detalle del envés de una fronda de Pteridium aquilinum (L.) Kuhn

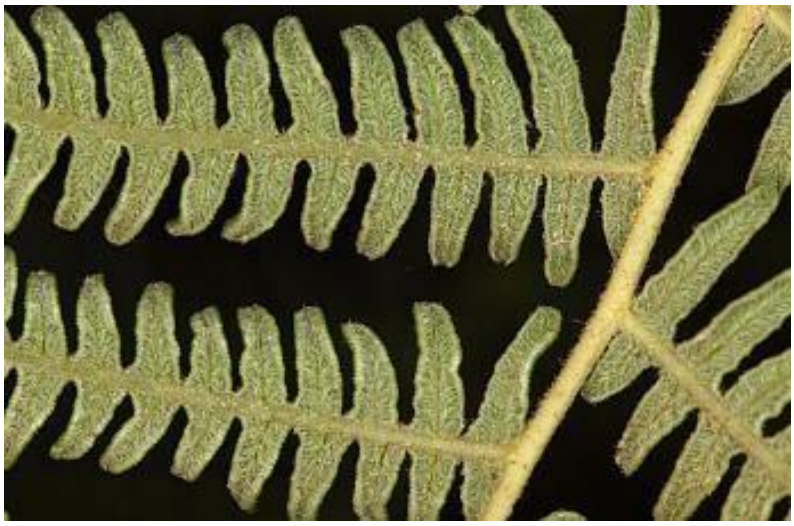


Nota: Tomada de Hoseito, (2026)

El color en los pecíolos de las hojas jóvenes es de un verde bastante intenso; mientras que, en la adultez o madurez, el color verdoso se va perdiendo hasta dar un tono marrón o negro, sobre todo en la base. Basado en esto, a nivel observacional, resulta bastante sencillo el separar un espécimen maduro de uno inmaduro. Respecto a los soros (esporas esféricas-tetraédricas), se encuentran distribuidos a lo largo del borde de la lámina foliar, generalmente cubriendo los bordes curvados de la fronda. A pesar de no desarrollarse anualmente y el número cromosómico de 2n = 104, la esporulación ocurre principalmente entre julio y septiembre (Sokolova, 2023).

Figura 4.

Soros a detalle de Pteridium aquilinum (L.) Kuhn.



Nota: Tomada de Hoseito, (2026)

Distribución geográfica y relación dentro de los ecosistemas.

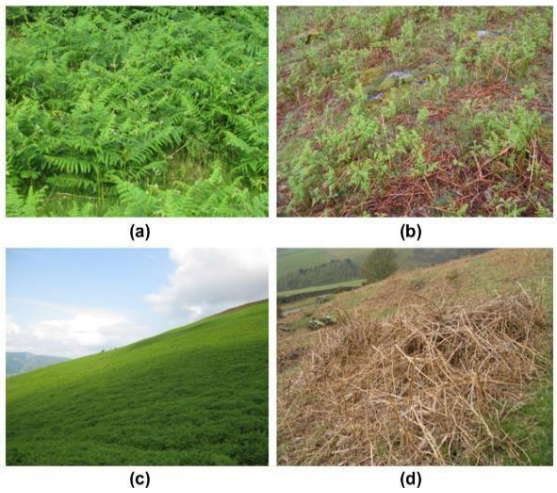
El helecho macho es cosmopolita y se encuentra distribuido de forma abundante en distintos continentes y altitudes (exceptuando la Antártida). Se ha observado que, a altitudes menores a 600 msnm, es mucho más abundante su presencia a diferencia de altitudes mayores a los 2500 msnm. En estudios recientes, se ha concluido que el patrón de colonización del helecho es agresiva y preferentemente en zonas de reforestación o sequía (Štefanić et al., 2022).

En las últimas décadas, ha sido de alta relevancia el problema de invasión por parte de *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn, debido al impacto que tiene en la parte ecológica de las zonas en las que crece. La interacción que tiene dentro de un ecosistema es difícilmente controlable, debido a que se expande de forma exponencial. Dando así, que las intervenciones agro-técnicas queden inutilizadas o bloqueadas (Schuettpelz et al., 2016).

Las condiciones climáticas afectan significativamente la densidad poblacional del helecho. Esto se ha evidenciado por un estudio reciente, en el cual se analizó una población en la parte sur de Bulgaria, donde crecía *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn, prácticamente sin restricción alguna. Lo que se encontró es que la dinámica poblacional del helecho se ve reducida en gran parte por la siega del césped (Sokolova, 2023).

Figura 5.

Cambios de distribución en Pteridium aquilinum (L.) Kuhn, según las épocas climáticas. (a) Helecho en pleno crecimiento. (b) Helecho en primavera. (c) Helecho en verano. (d) Helecho en invierno.



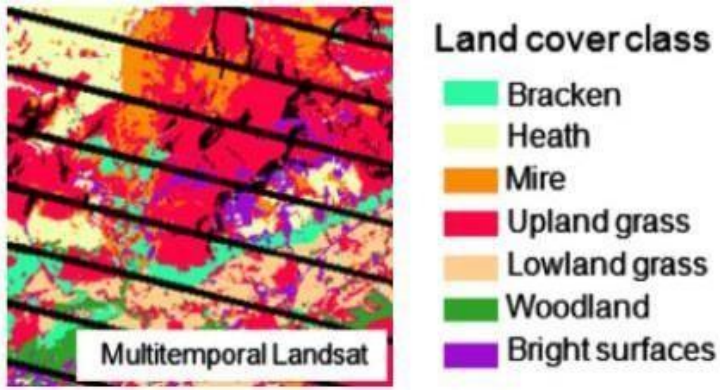
Nota: Tomado de Holland & Aplin, (2013)

La época de crecimiento del helecho macho se relaciona directamente con las condiciones climáticas y del hábitat. Se ha observado que crece de forma más eficiente en zonas abiertas y cálidas,

así como también en épocas primaverales (Ershova, 2012). *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn es exitoso en colonizar diversas regiones, debido a su facilidad de adaptación en suelos ácidos y pobres en nutrientes; esto lo realiza mediante el crecimiento horizontal de sus rizomas, obteniendo así una alta penetración y conquistando la mayor parte de la zona o hábitat en la que se desarrolle (Malík et al., 2024).

Figura 6.

Mapa de calor de distribución en una área específica en bosques de Europa.



Nota: Tomado de Holland & Aplin, (2013)

En el continente americano, *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn ocupa una franja altitudinal muy amplia, sobre todo en sistemas montañosos, como son los Andes de América del Sur (septentrionales y centrales), mismos que se encuentran dentro de Ecuador, entre los 1000 a los 3200 msnm; con cierta tendencia de invasión en zonas de deforestación reciente y potreros (Rincón et al., 2016).

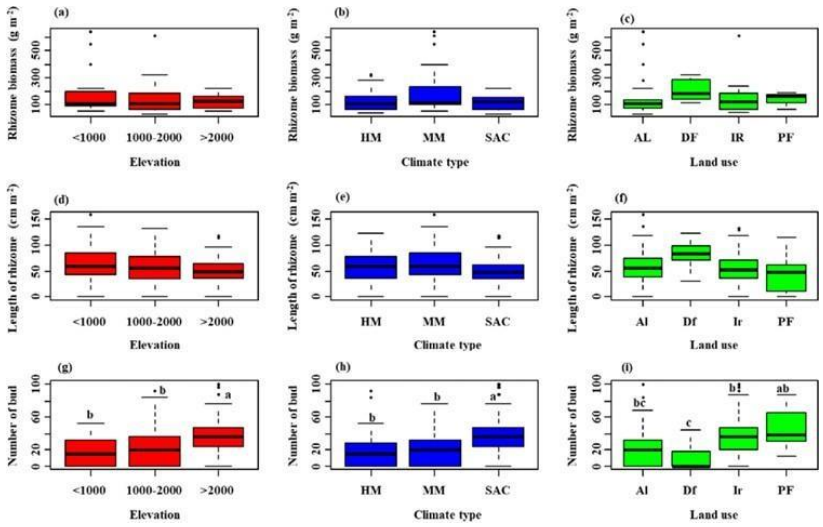
Ecología, fenología y plasticidad fenotípica.

La tasa reproductiva del helecho macho es notablemente alta, debido a la capacidad de rebrote y gran adaptabilidad en distintos entornos ecológicos. Por esta situación, en diversas zonas se lo ha considerado como una planta parásita o maleza, por la gran facilidad de invasión en campos y pastizales, que, en realidad, es gracias a su rizoma resistente (López et al., 2022).

Como se ha ido observando durante esta investigación, las relaciones ecológicas de *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn, están condicionadas en gran parte por su sistema de rizomas. La rizoma es en esencia un órgano de reserva para nutrientes, propagación y supervivencia. El mecanismo dado por este órgano es la producción alta de brotes para evitar la dependencia aérea frente a las condiciones climáticas (Marss & Watt, 2006).

Figura 7.

Respuesta general a nivel de rizoma a diferentes altitudes de Pteridium aquilinum (L.) Kuhn. (a), (b) y (c) biomasa de rizoma; (d), (e) y (f) longitud de rizoma; (g), (h) e (i) número de brotes.



Nota: Tomado de Amouzgar et al., (2023).

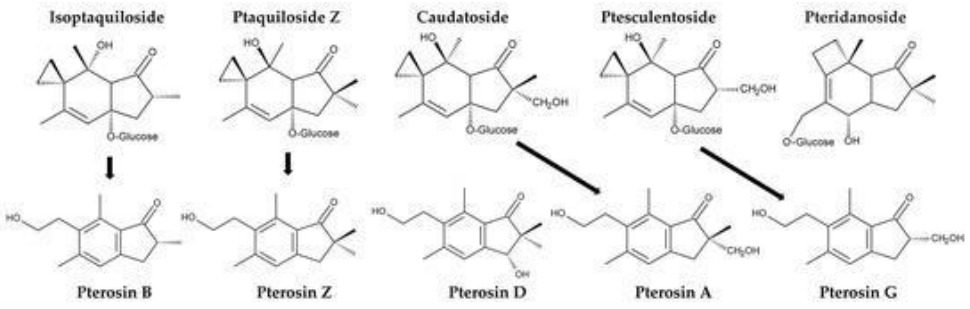
Perfil fitoquímico general.

Dentro de estudios fitoquímicos, se han identificado que las frondas jóvenes y los rizomas, son órganos que contienen una alta concentración de dichas toxinas. Varios autores, describen, particularmente, al ptaquilósido, como una de las toxinas más presentes, incluso en estados fenológicos distintos del helecho, siendo los maduros, los que pierden concentración de toxina (Zaccone et al., 2014).

Es interesante analizar que las concentraciones de toxinas varían según diversos factores, como son; factores fenológicos, ambientales y genéticos. De este modo, presenta heterogeneidad toxicológica observada entre poblaciones y regiones geográficas; dando de este modo, diferencias significativas incluso en zonas proporcionalmente similares (García-Jorgensen et al., 2021; Kisielius et al., 2020).

Figura 8.

Análogos de ptaquilósido y pterosinas identificados en Pteridium aquilinum (L.) Kuhn.



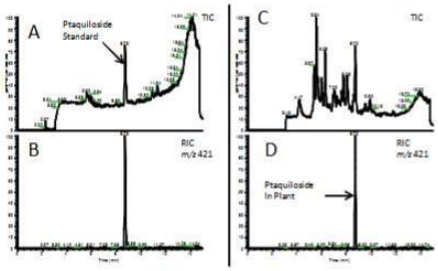
Nota: Tomado de Kato-Noguchi & Kato, (2026).

Como se ha mencionado, la concentración y presencia de toxinas en *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn, se ve fuertemente influenciada por el estado fenológico de la planta, altitud, tipo de suelo, humedad, entorno ecológico y genética (Zaccone et al., 2014). En diversos estudios, realizados en Latinoamérica, específicamente en Colombia y Costa Rica han demostrado que los brotes jóvenes presentan unos niveles sumamente altos de ptaquilósido, con valores encima de los 13 mg/g de peso seco; mientras que las maduras y rizomas, dichos niveles son bajos (Rodríguez-Salazar & Chacón-Villalobos, 2023).

Figura 9.

Análisis con HPLC-MS del material vegetal de Pteridium aquilinum (L.) Kuhn, donde se evidencia que la concentración es variable respecto a estado fenológico.

Sitio de recolección y estado fenológico del helecho	*Contenido de ptaquilósido (µg/g)*
Líbano I	41
Líbano II	1.194
Líbano III	961
Líbano IV	318
Murillo I	82
Murillo II	80
Murillo III	37
Murillo IV	23



Nota: Obtenido de: (Rincón et al., 2016).

Según Kato-Noguchi & Kato (2026), se han reportado distintos rangos de concentración de ptaquilósido en frondas jóvenes y maduras de *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn; el rango es entre 0.03 a 13.3 mg/g de tejido seco. Sin embargo, en rizomas y esporas, los valores de concentración se encuentran desde los 0.003 mg/g hasta los 0.657 mg/g. De este modo, y como se ha ido analizando, los factores externos afectan de forma indirecta en la producción de metabolitos secundarios (Ajah et al., 2026; Jannat et al., 2019)

Ptaquilósido, Caudatósido, tiaminasas y otras toxinas del helecho: Estructura y propiedades.

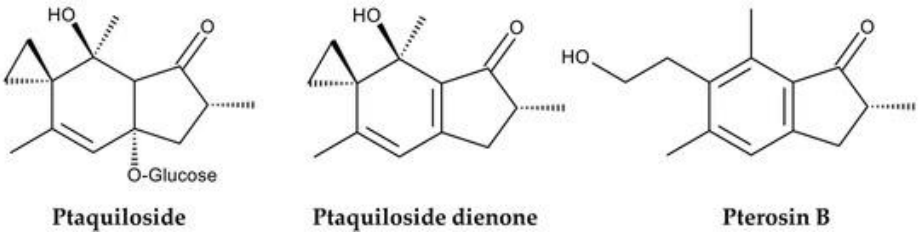
El ptaquilósido es la toxina estelar del helecho macho; y sin duda, una de las más estudiadas dentro del marco de *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn. Según la estructura, es clasificado como un glucósido norsesquiterpénicos de tipo ilúdano. Tiene dentro de su estructura, un anillo ciclo propilo

altamente reactivo, una unidad de glucosa y se conforma por 15 carbonos (Keskin et al., 2025; Vetter, 2022).

La configuración química del ptaquilósido hace que sea altamente inestable, especialmente en condiciones ácidas o alcalinas, de forma tal que se descompone en intermediarios reactivos como la Dienona y finalmente en Pterosina B. Generalmente, se ha observado que, a pesar de contener limitaciones estequiométricas, su alta reactividad permite que interactúe con distintos sistemas biológicos y entornos (Rincón et al., 2016).

Figura 10.

Intermediarios de degradación del Ptaquilósido.

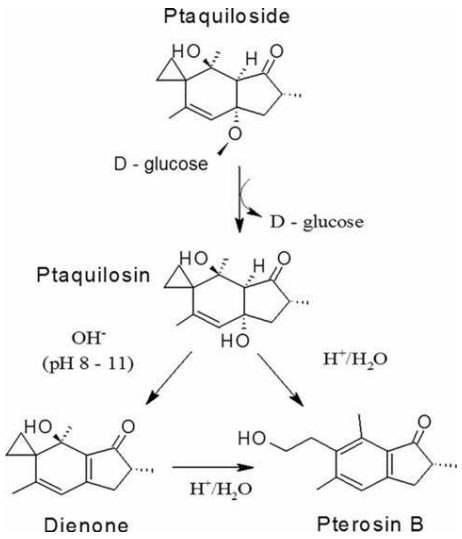


Nota: Tomado de Kato-Noguchi & Kato, (2026).

El ptaquilósido es degradado en condiciones alcalinas; de tal modo que es atacado por iones hidróxido y se descompone en ptaquilosina y glucosa. El intermediario Dienona (la ptaquilosina), es altamente inestable y, por ende, reactivo; de tal modo que, se una covalentemente a moléculas de ADN o en otro destino, se forma Pterosina B. Su vida media es de 170 minutos, en pH sumamente ácido, menor a 2 (Aranha et al., 2019).

Figura 11.

Hidrólisis ácida y básica de la molécula Ptaquilósido, descomposición y metabolismo



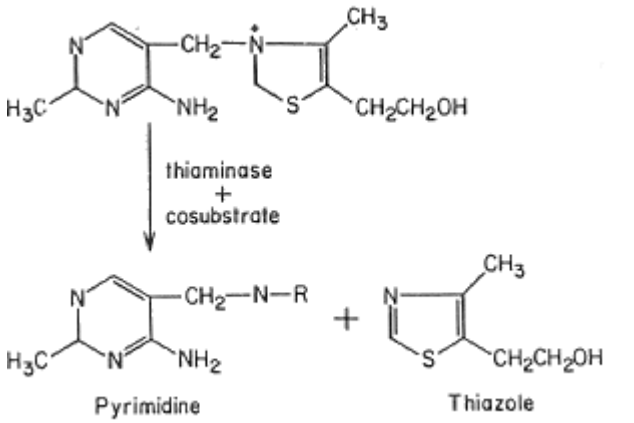
Nota: Tomado de Aranha et al., (2019).

Además del ptaquilósido, *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn contiene otros glucósidos iludianos como son el Caudatósido y ptesculentósido. Ambos comparten la estructura básica de un anillo ciclo propilo y una unidad de glucosa, sin embargo, el cambio se encuentra en los sustituyentes (Rodríguez-Salazar & Chacón-Villalobos, 2023).

Los compuestos en realidad presentan también alta actividad genotóxica y carcinogénica. A pesar de ser encontrados en menor cantidad y también con efectos menos potentes, son considerados importantes dentro del perfil del helecho macho. El Caudatósido se hidroliza en pH básico, dando como resultado o producto la Pterosina A (Kisielius et al., 2022).

Figura 12.

Mecanismo de reacción por parte de la tiaminasa I.



Nota: Tomado de Cornell University, (2018).

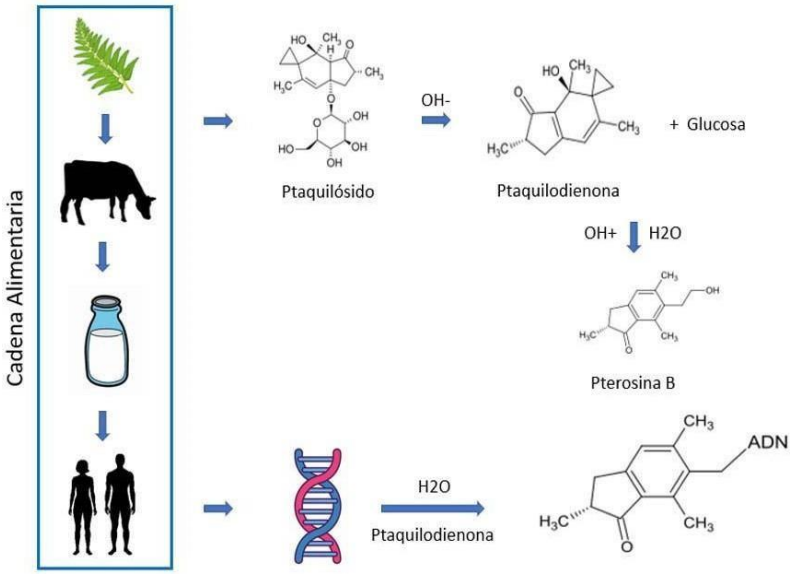
La prunasina es un glucósido cianogénico, identificado en el helecho macho. La hidrólisis enzimática de este compuesto, libera cianuro de hidrógeno, un inhibidor de la respiración celular; en este sentido, resulta altamente tóxico para el animal, provocando e induciendo incluso la muerte. La concentración de esta es sumamente menor, generalmente en trazas, pero, en realidad, incluso en dichas concentraciones tan bajas, resulta ser muy tóxica, gracias a su gran capacidad de diluirse en el agua (Kato-Noguchi & Kato, 2026).

Mecanismo de acción toxicológico.

Principalmente, la acción toxicológica se inicia con la hidrólisis de la toxina; se puede dar en el ambiente, tracto digestivo de los animales o en condiciones fisiológicas, lo que conduce a formación de Dienona conjugadas (que son altamente reactivas) (Kato-Noguchi & Kato, 2026). La Dienona contiene un anillo ciclo propilo, que actúa en esencia, como un potente electrófilo capaz de alquilar macromoléculas biológicas; dentro de las cuáles está, el ADN y proteínas.

Figura 13.

Aductos de ADN formados por la reacción de la Dienona de ptaquilósido, generando eventos de genotoxicidad.



Nota: Tomado de Rodríguez-Salazar & Chacón-Villalobos, 2023.

La Dienona que resurge derivada del ptaquilósido alquila principalmente el N3 de la adenina y el N7 de la guanina en el ADN, de este modo, se generan los aductos resistentes a mecanismos normales de reparación celular (Keskin et al., 2025). Cuando ocurre la alquilación, en realidad, se induce la depuración espontánea de las bases, reordenamientos cromosómicos y protooncogenes (razón causal de la generación cancerígena acentuada dentro de sintomatología).

Como es común, la mayoría de los metabolitos tóxicos pueden llegar a ejercer efectos inmunosupresores; de este modo, generalmente se reduce la funcionalidad de linfocitos CD8+ y células NK, incrementando así, las susceptibilidad a infecciones virales oncogénicas como VPH y *H. pylori* (Medeiros-Fonseca et al., 2021). Aquí, se produce un sinergismo, que, de hecho, está muy bien documentado en la patogénesis de HEB y asociación epidemiológica entre consumo de leche contaminada y el cáncer gástrico y esofágico en humanos (Gil da Costa et al., 2024).

Variación de toxinas según estado fenológico.

En este apartado, es conveniente comprender que el contenido principal de la toxina carcinogénica, en este sentido, el ptaquilósido, varía significativamente según el estado fenológico de la planta. En brotes jóvenes y frondas en desarrollo, la concentración aumenta significativamente, mientras que, en frondas maduras y rizomas, los niveles sí son bastante menores; en este sentido, según (Gil da Costa et al., 2024), la variabilidad es influenciada por factores ambientales, altitud, humedad, exposición solar, suelo, entre otros; pero, principalmente, es por estado fenológico.

En el estudio experimental, realizado por Rincón et al., (2016), analizaron 8 muestras de helecho macho en distintos estados fenológicos; en los que se encontró un rango de 23 a 1194 ug/g de fronda; en este aspecto, un promedio de 342 ug/g. Los datos más altos fueron obtenidos principalmente en estados fenológicos inmaduros, mientras que, en los maduros la reducción fue hasta del 10% respecto a la fronda joven.

Figura 14.

Contenido de ptaquilósido en distintos estados fenológicos del Pteridium aquilinum (L.) Kuhn. En los cuales II, III y IV, corresponden a estados fenológicos inmaduros y el resto maduros.

Sitio de recolección y estado fenológico del helecho	*Contenido de ptaquilósido (µg/g)*
Líbano I	41
Líbano II	1.194
Líbano III	961
Líbano IV	318
Murillo I	82
Murillo II	80
Murillo III	37
Murillo IV	23

Nota: Tomado de Rincón et al., (2016).

La variación estacional es relevante dentro de este marco; las zonas altas influyen negativamente en la concentración de ptaquilósido y Caudatósido; lo cual tiene sentido porque, las amenazas ambientales disminuyen significativamente respecto a la no necesidad de defensa activa (Rodríguez-Salazar & Chacón-Villalobos, 2023). Y así también, la estación climática; porque la dinámica de traslocación de nutrientes y compuestos tóxicos entre frondas y rizomas disminuye o aumenta según sea el caso (Roos et al., 2010; Rasmussen et al., 2004).

Definición y epidemiología de la HEB.

La Hematuria Enzoótica Bovina (HEB) es una enfermedad crónica y mortal del ganado bovino, que se caracteriza principalmente por la presencia intermitente de sangre en la orina y asociada por tumores malignos en la vejiga. Etiológicamente, se relaciona directamente con la ingestión de helechos del género *Pteridium*, especialmente el *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn y *Pteridium arachnoideum* (Rodríguez-Salazar & Chacón-Villalobos, 2023).

Parte del cuadro clínico, se incluye la anemia progresiva, pérdida de peso, disminución de producción láctea y muerte por neoplasia vesical; en este sentido, la hematuria compila en la causa principal de muerte para los bovinos, debido a su vulnerabilidad a la pérdida constante de sangre y deshidratación que conlleva la misma. Según Marrero Faz & Calderón Tobar, (2012), las lesiones vesicales combinada con la hematuria, promueven que se dé un escenario propicio para el cáncer.

La HEB se ha ido reportando en distintos países de América Latina, Europa y Asia, con especial incidencia, sobre todo, en las regiones montañosas y húmedas; esto debido a que son condiciones favorables para el crecimiento del helecho macho (Rai et al., 2017; Pererira, 2022). Actualmente, en Ecuador, los estudios mencionan una prevalencia de al menos el 36% mediante análisis microscópico del sedimento y del 5,3% mediante tiras reactivas urinarias, en el cantón Chilla, provincia de El Oro (Mejía Pacheco & Malo Cevallos, 2020).

Figura 15.

Distribución de casos de HEB por zona altitudinal en Ecuador.

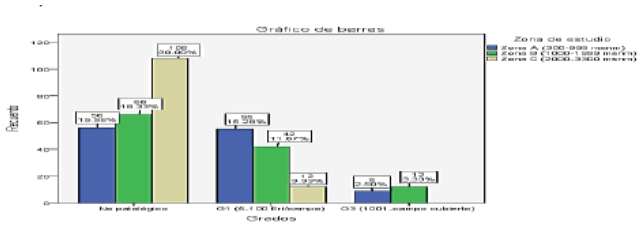


Figura 1. Figura de barras grados. Zona de estudio, método AMSU.

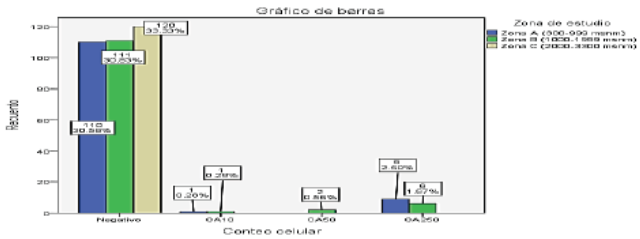
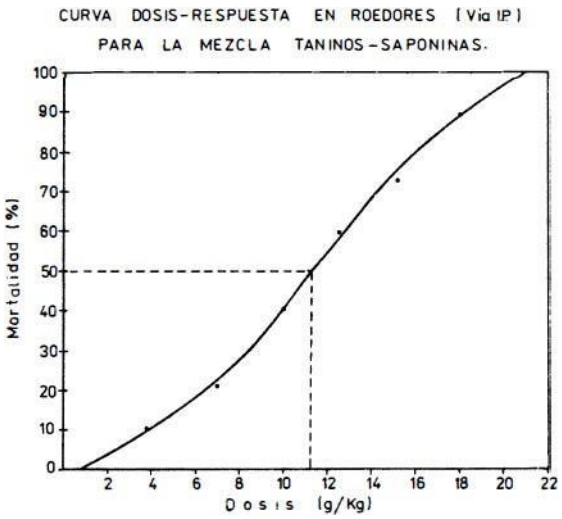


Figura 2. Figura de barras conteo celular - Zona de estudio, método TRU

Nota: Resultados tomados de Mejía Pacheco & Malo Cevallos, (2020).

Figura 16.

Respuesta clásica de sinergismo entre taninos y saponinas, así como presencia de toxinas dentro de Pteridium aquilinum (L.) Kuhn.



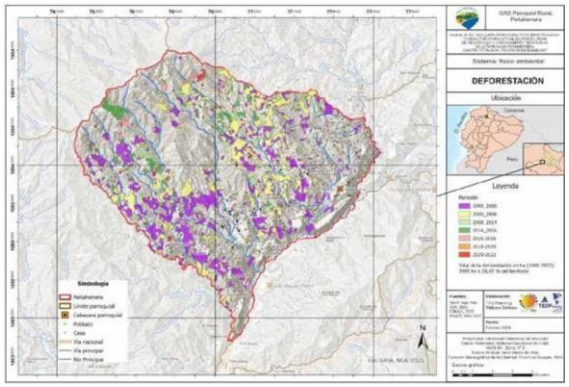
Nota: Tomado de Pinzón & Rubiano, (2006).

Agroecología de Peñaherrera e Imbabura y Ganadería bovina.

La parroquia Peñaherrera, en el cantón Cotacachi, provincia de Imbabura, se caracteriza por un paisaje altamente montañoso y sobre todo con clima variado, entre húmedo y caluroso; las altitudes se encuentran de entre 1200 y 3200 msnm, clima templado-frío y suelos de origen volcánico, ácidos y con una fertilidad bastante variable, dependiendo de la zona. El uso del suelo está dominado principalmente por la ganadería bovina extensiva; y en este sentido, la mayor parte de familias dependen de la agricultura y silvicultura. En este sentido, debido a gran mayoría de pastizales, muchos de estos se han visto invadidos por el helecho macho, sobre todo en áreas de sobrepastoreo y suelos erosionados (Magdalena et al., 2025).

Figura 17.

Zonas de deforestación en Peñaherrera (zonas moradas) y de pastizales (zonas amarillas). Las zonas deforestadas son fácilmente invadidas por Pteridium aquilinum (L.) Kuhn.



Nota: Tomado de Magdalena et al., (2025)

Figura 18.

Porcentaje del tipo de clima presente en Peñaherrera.



Nota: Tomado de Magdalena et al., (2025)

Principalmente, se ha observado una tendencia en la tenencia de bovinos para pastoreo libre en potreros o fincas de grandes extensiones; y debido a que, la mayoría de estos están en libre pastoreo, el control zonal del consumo de hierba o helecho prácticamente no existe ningún control en ello; dando como resultado, un problema epidemiológico de las enfermedades anteriormente mencionadas (Borena et al., 2025; Silva et al., 2023).

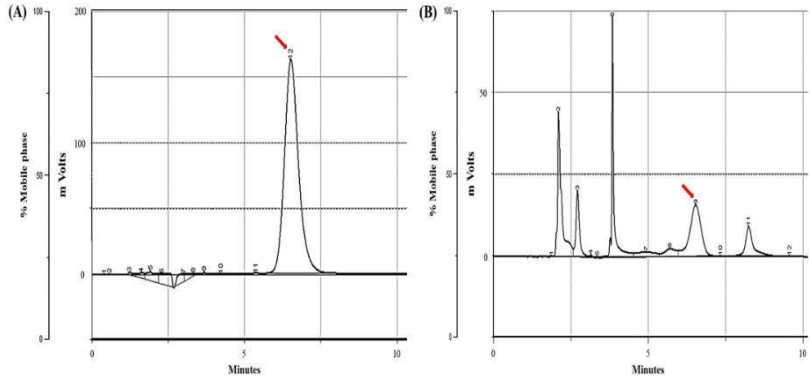
Métodos de detección o cuantificación de toxinas vegetales.

- **Cromatografía Líquida de Alta Resolución.**

La técnica denominada como HPLC, es ampliamente utilizada para lograr la separación y cuantificación de metabolitos secundarios, que, en su mayoría se encuentran en concentraciones ínfimas o de trazas dentro del material vegetal; principalmente, en *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn, la técnica resulta de gran ayuda para corroborar la presencia de picos característicos a toxinas como ptaquilósido o sus productos hidrolizados, las pterosinas (Malík et al., 2024; Alonso-Amelot & Avendaño, 2002).

Figura 19.

Cromatogramas obtenidos de HPLC-UV detector (a) estándar de ptaquilósido 200 ug/mL (b) a partir de muestras maceradas de Pteridium aquilinum (L.) Kuhn.



Nota: Tomado de Kim et al., (2023).

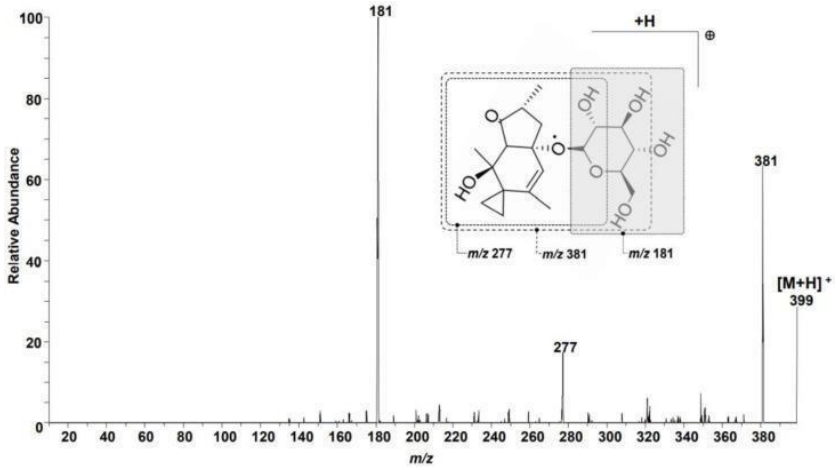
- **Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas (LC-MS/MS).**

Dentro de la estandarización para detección y cuantificación de toxinas vegetales, el Gold standard es din dudas, LC-MS/MS; porque en realidad, maneja una sensibilidad sumamente alta y así también, muy buena especificidad. Como su nombre menciona, es la combinación de separación cromatográfica con la identificación mediante masas en tándem, de tal modo que, las concentraciones

extremadamente bajas de la toxina son fácilmente detectadas gracias a la separación de PTA con pterosinas o productos degradados (Park et al., 2023; Kim et al., 2023).

Figura 20.

Espectro de masas de iones producto observado para el ptaquilósido (PTA) con ion precursor de m/z 399 en una disolución patrón. En este espectro de espectrometría de masas en tándem se observan tres iones producto.



Nota: Tomado de Park et al., (2023).

- **Cromatografía de capa fina (TLC).**

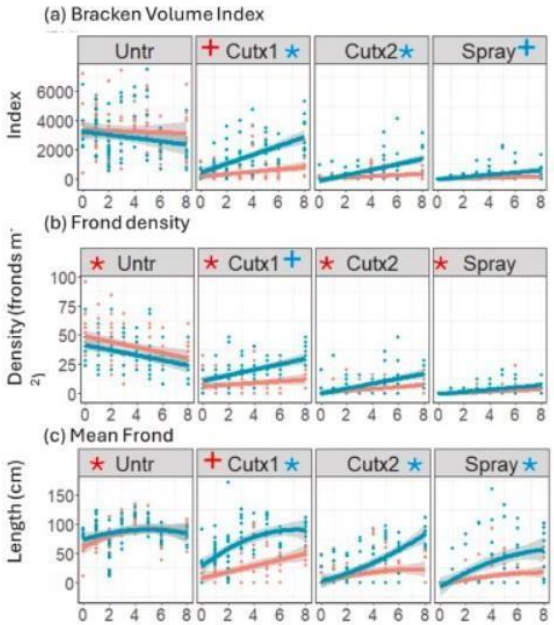
En términos teóricos, la cromatografía de capa fina se basa en la separación de compuestos mediante la migración sobre una placa de sílice gel, generalmente fase estacionaria. De este modo, la aplicación del extracto se suele dar en la base de esta, para que ésta tenga contacto directo con los solventes orgánicos usados como factores de separación (fase móvil). Debido a que es una técnica muy poco específica, suele estandarizarse el tema de la fase orgánica, para obtener una separación adecuada de la toxina vegetal deseada; con finalidad de resultado, se calcula el factor de retardo (of) y compara con bibliografía existente (Kowalska & Sajewicz, 2022; Alonso-Amelot & Avendaño, 2002).

Estrategias de control de *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn

Dentro de lo más común, principalmente se da un control mecánico del helecho macho; en este sentido, es el corte repetido de las frondes, solo de la parte aérea. Con el fin de agotar las reservas de carbohidratos en los rizomas y de este modo, reduciendo gradualmente la capacidad de rebrote. Aunque es un método menos costoso y también, el de más simpleza, estudios de largo plazo han demostrado que el corte no es suficiente para erradicar a *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn; esto porque los rizomas pueden permanecer viables durante años (Ghorbani et al., 2025).

Figura 23.

Resultados obtenidos de líneas de tendencia en poblaciones de Pteridium aquilinum (L.) Kuhn, sin tratamiento (Untr), control mecánico (Cutx) y control químico (aerosol).



Nota: Obtenido de: (Ghorbani et al., 2025).

Marco conceptual

Pteridium aquilinum (L.) Kuhn.

Es una especie de helecho perenne, considerado ampliamente en la literatura bibliográfica como “cosmopolita” y con una alta capacidad invasora. Es caracterizada por tener unas frondes de gran longitud y rizomas gruesos, generalmente subterráneos y extensos, con el fin de permitir una buena colonización en pastizales y áreas dañadas; es relevante su análisis fitoquímico debido a las toxinas que se producen dentro de sus metabolitos secundarios, como son el PTA, CAU, pterosinas y glucósidos cianogénicos (Malík et al., 2024).

Estado fenológico.

Definido como una fase dentro del desarrollo de la planta en un momento dado; se da, por ejemplo, la brotación en un momento específico o la floración en otro. Esto es constituido como una variable biológica clave para poder interpretarse la dinámica en la producción de metabolitos secundarias, palatabilidad y riesgo toxicológico, generalmente, asociado con el consumo de material vegetal (Rincón et al., 2016).

Metabolito secundario.

Es un compuesto orgánico, principalmente sintetizado por organismos de índole inferior o nivel trópico disminuido. Como tal, no se ven involucrados en procesos esenciales o primarios como lo son la fotosíntesis o respiración; sino, en roles ecológicos, como es la defensa frente a distintos factores abióticos o bióticos. La acumulación y concentración de estos compuestos son ligados a distintos factores genéticos y ambientales (Kato-Noguchi & Kato, 2026).

Glucósido ilúdano.

Clase estructural de glucósidos con esqueleto iludano; se caracterizan principalmente por un anillo sesquiterpénico modificado (generalmente con pérdidas de carbón) unido a una unidad de azúcar. Son responsables de alta reactividad química dentro de la matriz vegetal, así como también,

proporcionando efectos genotóxicos y tóxicos tras la hidrólisis de estos o su degradación. Por tanto, inicialmente, se requiere de su digestión para que puedan llegar a dar consecuencias (Hao et al., 2021; Keskin et al., 2025).

Ptaquilósido (PTA).

Glucósido norsesquiterpénico hidrosoluble, producido en la naturaleza, principalmente por el género *Pteridium*; específicamente, del *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn. Su estructura pertenece a un sistema lactónico reactivo. Es reconocido principalmente por la capacidad de formar intermediarios alquilantes y capaces de reaccionar con macromoléculas como ADN. Se lo asocia con cáncer en animales y humanos (Rodríguez-Salazar & Chacón-Villalobos, 2023).

Caudatósido (CTA).

Estructuralmente muy similar al ptaquilósido, e identificado en ciertas poblaciones del género *Pteridium*, principalmente las que contemplan una asociación en suelos acidificados. Contiene un esqueleto iludano y presente propiedades tóxicas similares al PTA; sin embargo, tiene una reactividad y potencia menor, así como su concentración y síntesis se ven disminuidas de forma acentuada depende el contexto ecológico (Kisielius et al., 2022).

Pterosina A.

Es un producto de degradación, a partir del Caudatósido. Así también, resultado de la hidrólisis y modificaciones del glucósido inicial. Es relevante porque proporciona una proporción toxicológica relativa frente a pterosinas distintas (como la B); como la resistencia de las condiciones ambientales, ligadas al perfil fitoquímico de *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn (Kim et al., 2023)

Genotoxicidad.

Es la capacidad de un agente químico o físico para llegar a dañar el material genético, también conocido como ADN, de una célula. El daño produce en muchos casos, mutaciones, roturas de cadena o alteraciones cromosómicas. Muchas veces, suelen ser problemas irreversibles, que conducen a

disfunción celular, muerte o procesos carcinogénicos. La genotoxicidad es evaluada mediante ensayos *in vivo* o *in vitro* estándar (Pinzón & Rubiano, 2006).

Hematuria Enzoótica Bovina (HEB).

Síndrome crónico observado principalmente en bovinos expuestos a cultivos de *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn. Su sintomatología engloba principalmente la excreción de sangre a través de la orina del animal, de tal modo que, produce anemia, pérdida de composición corporal, neoplasias vesicales. Etiológicamente hablando, se lo asocia principalmente con la ingestión de toxinas iludianas, como es el ptaquilósido (Alonso-Amelot & Avendaño, 2002).

Cromatografía de capa fina.

Técnica analítica de separación cualitativa, que se basa principalmente en la migración diferencial de compuestos, dentro de un extracto vegetal, sobre una placa con fase estacionaria (principalmente sílice gel de fase no reversa), mediante una fase móvil, compuesta de solventes orgánicos. Es una técnica de cribado rápido y comprobado para diversa cantidad de metabolitos secundarios, tales como las toxinas (Park et al, 2023).

Capítulo III

Metodología

Enfoque de investigación.

La presente investigación se desarrolló bajo un enfoque observacional y cualitativo, fundamentándose en la recolección y análisis de datos obtenidos mediante técnicas de colorimetría o detección de compuestos fitoquímicos relacionados a la toxicología del helecho *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn, así también como caracterización botánica e información epidemiológica proveniente de fincas lecheras de la parroquia de Peñaherrera, Cantón Cotacachi, Provincia de Imbabura.

Este enfoque permite transformar las observaciones realizadas en variables medibles y susceptibles a análisis estadístico; facilitando así, la obtención de patrones, tendencias y asociaciones entre el perfil fitoquímico del helecho y la incidencia de hematuria enzoótica bovina (HEB) reportada en las fincas lecheras de la parroquia de Peñaherrera.

En este sentido, la presente investigación estableció relaciones entre variables biológicas, químicas y epidemiológicas a partir de evidencia cuantificable, evitando interpretaciones subjetivas; favoreciendo la reproducibilidad y generalidad de los resultados, sentando así una línea base sólida con respaldo técnico, que permita continuar con el proceso de investigación científica y la posterior resolución a la problemática en la sanidad animal.

Tipo y diseño de investigación.

El tipo de investigación de este estudio es descriptiva y correlacional. Se contempla la caracterización botánica de la especie problema, para comprender los estados fenológicos y su relación con la concentración toxicológica. De este modo, las características epidemiológicas de las fincas evaluadas dentro de la zona de estudio tendrían relación directa con el problema principal de esta investigación.

Así también, el alcance correlacional se enfoca en analizar la asociación entre variables como el estado fenológico del helecho, la presencia de toxinas y la incidencia de HEB reportada en las unidades productivas (fincas) evaluadas. Las relaciones causales no se han considerado como absolutas, pero sí se contemplan como probables de ocurrir.

A nivel de diseño, la investigación es no experimental. Las variables objetadas dentro de este estudio no son manipuladas ni acondicionadas; debido a que solo se las observará dentro del contexto natural, los ejemplares de *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn, han sido recolectados tal cual se encuentran en campo y la información epidemiológica será obtenido a partir de fuentes primarias (realizadas a dueños de fincas con la problemática).

Población y muestra.

La población problema del estudio está conformada por individuos de *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn presentes en cada finca lechera analizada en la parroquia de Peñaherrera, que tenga el antecedente de animales con hematuria enzoótica bovina (HEB). El número de muestras obtenidas por cada zona fue determinado de forma representativa; esto debido a la gran cantidad de helecho macho distribuido casi de forma uniforme en la finca objetivo.

Con ello en cuenta, se seleccionaron tres fincas lecheras que cumplían con los siguientes criterios:

1- Presencia de poblaciones naturales de *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn.

2- Actividad ganadera dentro de una zona de pastoreo o potrero bien segmentado.

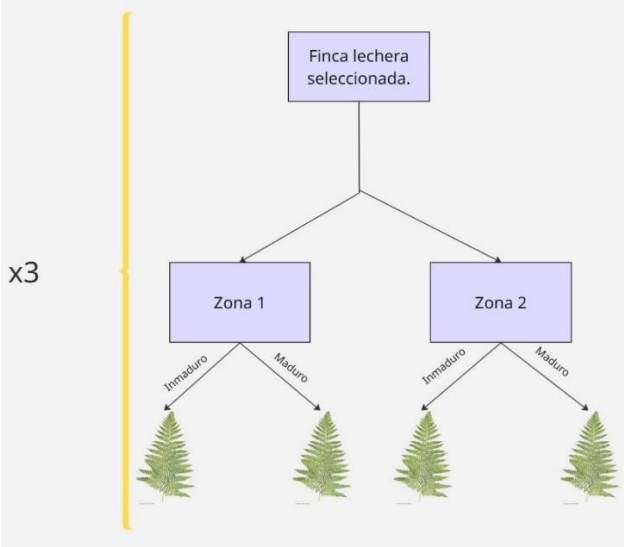
3- Antecedentes evidenciables y reportados de hematuria bovina enzoótica (HEB).

Dentro de las fincas, se seleccionaron aleatoriamente 2 zonas de recolección; por zona, se recolectaron 4 individuos o ejemplares del helecho macho, 2 de ellos en estado fenológico inmaduro y otros 2 en estado fenológico maduro. Las consideraciones de clasificación fenológica se realizaron

mediante la caracterización morfológica observable, como son, las frondas, estado de soros, expansión foliar y lignificación de tejidos.

Figura 22.

Distribución de las unidades muestrales de Pteridium aquilinum L. (Kuhn) recolectadas en fincas lecheras de la parroquia de Peñaherrera.



Nota: Autoría propia, con ayuda del programa BioRender.

Debido a que no se busca realizar un estudio poblacional de distribución, ni estimaciones de abundancia, la cantidad de muestras es adecuada para corroborar la hipótesis primaria de esta investigación; es decir, la detección de toxinas y comparación respecto a los estados fenológicos.

La parte epidemiológica, que comprende la información recolectada mediante encuestas realizadas de forma directa a la fuente primaria, es decir, a la población afectada por la problemática: Dueños de las fincas y aledaños o trabajadores de estas. Debido a la alta actividad ganadera bovina y la abundante presencia de *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn, se busca relacionar la aparición reciente de HEB y contemplar como causal el consumo del helecho macho.

La finalidad de esta muestra es la de recopilar información relacionada con antecedentes de HEB, características productivas del sistema ganadero, presencia y abundancia del helecho macho dentro de los potreros, gestión de pastoreo, entre otros. La herramienta de encuesta permitirá identificar factores de riesgo, caracterización productiva y análisis de enfermedades.

Técnica e instrumento.

1. Muestreo *in situ*.

En cada finca, se delimitaron dos zonas dentro del área, en estas áreas se muestrearon 4 helechos inmaduros y 4 helechos maduros, que colinden entre sí o estén próximos uno al otro. El método de recolección consideró el corte de las hojas del helecho macho; frondas en las cuales se identificaba morfológicamente la disposición de sus soros como indicador de la especie seleccionada. En el trabajo de campo, se contó con un profesional especialista botánico y un guía nativo.

Con objeto de cumplir la demanda de ejemplares inmaduros y maduros, se procedió a analizar los soros del helecho. Los soros representan, en principio, el estado fenológico de *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn. Con esto en cuenta, los helechos maduros presentan soros de un color negro pardo, casi a punto de realizar esporulación; mientras que, los inmaduros presentan soros de color blanquecino, amarillo o verde pálido.

Figura 23.

Observación de cercanía, mediante una lupa, para determinar el estado de los soros en Pteridium aquilinum (L.) Kuhn.



Nota: Fotografía de Autoría propia.

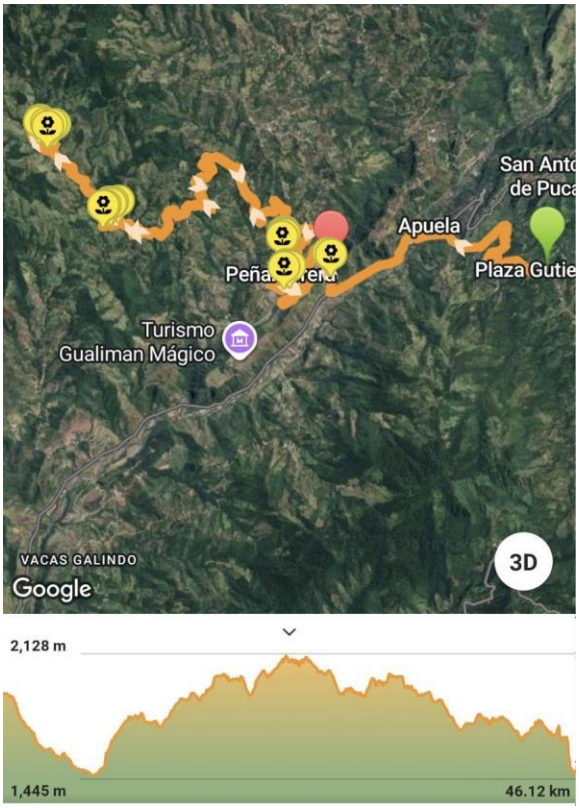
Figura 24.

Pteridium aquilinum (L.) Kuhn que presenta soros de color negro, acorde a un estado fenológico maduro.



Nota: Fotografía de Autoría propia.

Figura 25.
Ilustración geográfica obtenida de Wikiloc.



Nota: Base de datos Wikiloc.

La recolección y almacenamiento de las muestras se las hizo en empaques de papel aluminio; la cantidad de frondas obtenidas pueden variar según la calidad en la que se encuentra el helecho, de tal modo que, se obtenga una cantidad medianamente representativa. Pasado esto, son guardados en fundas herméticas y selladas para su posterior procesamiento en laboratorio.

Figura 26.

Almacenamiento de ejemplares de Pteridium aquilinum (L.) Kuhn, para disminuir problemas de oxidación.



Nota: Fotografía de Autoría propia.

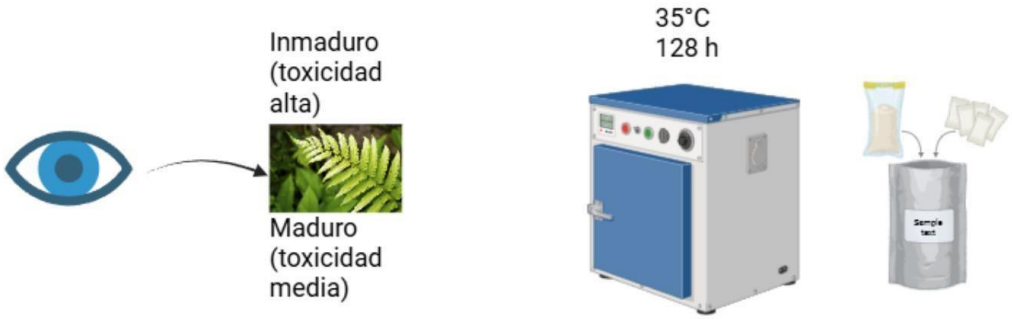
Una vez obtenidas las muestras, se separaron unos ejemplares para ser caracterizados morfológicamente; el resto de las muestras son llevadas a laboratorio de CENCINAT. Previo al secado, se llevaron al laboratorio de materiales avanzados en el CENCINAT – Universidad de las Fuerzas Armadas "ESPE", pasando cada una de las muestras a fundas de papel empaque, para facilitar su manejo y secar cada muestra en una estufa de la marca "ESCO". Las condiciones de secado fueron estandarizadas en 35°C durante 128 horas y flujo de viento para desecar.

El material vegetal cuando está totalmente seco se procede a triturar las hojas secas en un molino eléctrico de marca UMCO, con el fin de obtener un polvo fino del helecho y así obtener una mejor maceración en solventes orgánicos. Este polvo fino (de aprox. 0.22 um) es envasado en tubos

Falcón de 50 mL, debidamente rotulados según corresponda, y almacenados hasta continuar con la maceración.

Figura 27.

Proceso de secado y almacenamiento de muestras de Pteridium aquilinum (L.) Kuhn.



Nota: Autoría propia, con ayuda del programa BioRender.

2. Caracterización Botánica.

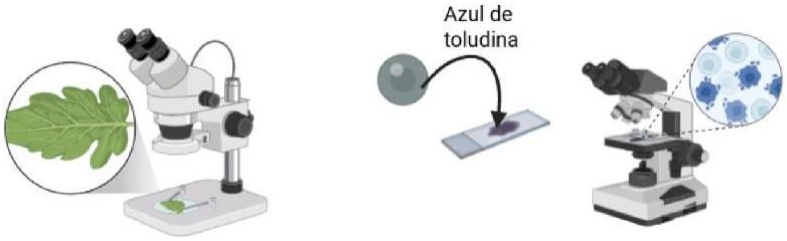
Las muestras de helecho macho seleccionadas fueron analizadas morfológica y anatómicamente en el estereoscopio con base de luz clara; enfocando distintos ángulos para determinar el tipo de nervaduras, las estructuras reproductivas denominadas soros, tricomas y frondas en general, por cada enfoque capturo imágenes fotográficas para su posterior análisis y determinación estructural y taxonómica.

La identificación de esporas de cada muestra de helecho macho maduro e inmaduro, se realizó por separado, mediante un raspado de los soros ubicados en la parte distal de la fronda, estas estructuras fueron teñidas con Azul de Toluidina, colocadas en placas portaobjetos y observadas en un microscopio óptico, con el lente 40X.

Cada muestra registra su observación con fotografías de alta resolución, con las cuales se pudo identificar los elementos estructurales propios de cada espora, y establecer las diferencias entre cada estado fenológico.

Figura 28.

Proceso de caracterización botánica para identificación de estructuras morfológicas en Pteridium aquilinum (L.) Kuhn.



Nota: Autoría propia, con ayuda del programa BioRender.

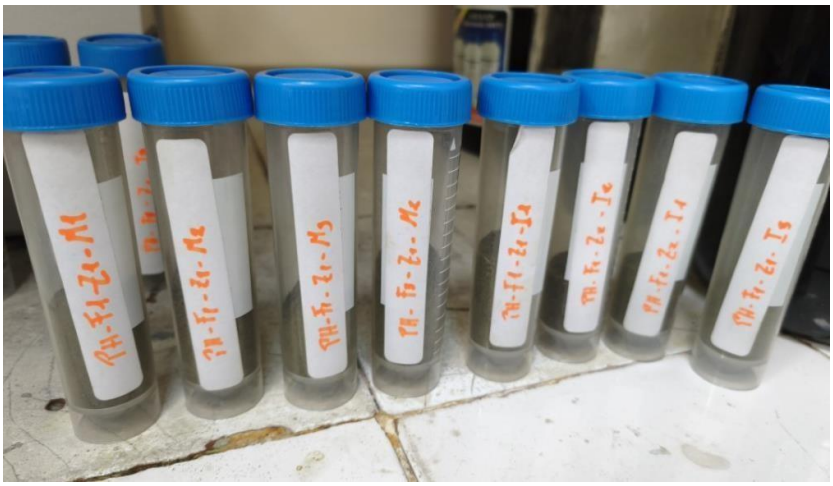
3. Maceración.

El proceso de maceración ha sido estandarizado, a partir del protocolo propuesto por (Ahmed et al., 2024), después de realizarse diversas pruebas. Debido a la naturaleza química de la molécula principal del helecho, los solventes orgánicos utilizados para la extracción son de naturaleza moderadamente polar. Y se segmentaron en 2 secciones de macerado.

Con las muestras trituradas previamente, se realizó un pesaje de 2 gramos para cada muestra; es decir, se utilizaron dicha cantidad representativa por muestra para el macerado. Primero, dentro de tubos falcón de 50 mL, se colocó dicha cantidad de muestra conjunto a 20 mL de etanol absoluto y durante 48 horas se dejaron macerando en oscuridad y en constante agitación (para esto, se utilizó un agitador orbital de 100 rpm). Pasado este tiempo, se ultrasonicaron las muestras durante 30 minutos (Ribeiro & Soto-Blanco, 2020; de Olivera et al., 2020).

Figura 29.

Muestras en tubos falcón, previamente rotuladas y pesadas para el macerado.



Nota: Fotografía de Autoría propia.

4. Extracción.

Después de la primera maceración, se recuperó el sobrenadante de dicho extracto etanólico en nuevos tubos Falcón; segundo, sobre la muestra que ya ha sido macerada al inicio, se añade 20 mL de etanol al 70% y durante 48 horas se dejaron macerando en oscuridad, pero esta vez sin agitación. Pasado este tiempo, se ultrasonicaron las muestras durante 30 minutos y luego se recuperó el sobrenadante de dicho extracto etanólico en el mismo tubo de la primera recuperación (Ribeiro et al., 2020).

Como penúltimo paso, se agarran 2 mL de cada extracto de cada muestra y ubican en tubos de ensayo con base plana de 15 mL de volumen. Obteniendo 24 tubos, respecto a 24 muestras. Con estos tubos, se procedieron a concentrar a 40°C (haciendo uso del concentrador Thermo Fisher) y con flujo de nitrógeno gaseoso constante, durante aproximadamente 90 minutos.

Figura 30.

Ubicación de los 2 mL representativos de los macerados para posterior concentración.

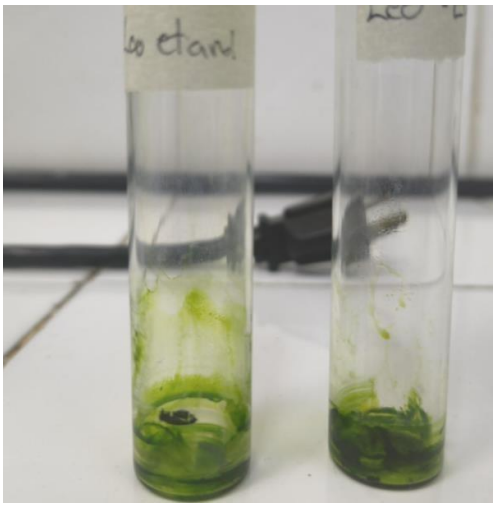


Nota: Fotografía de Autoría propia.

Con los macerados concentrados hasta sequedad, se resuspendieron en metanol acuoso (70:30), en relación 2.1 mL de metanol absoluto con 0.9 mL de agua ultrapura; se ultrasonicó durante un minuto para que se mezcle adecuadamente el concentrado con el solvente orgánico. Con esto, se almacenan adecuadamente hasta su uso posterior, en refrigeración a 4°C.

Figura 31.

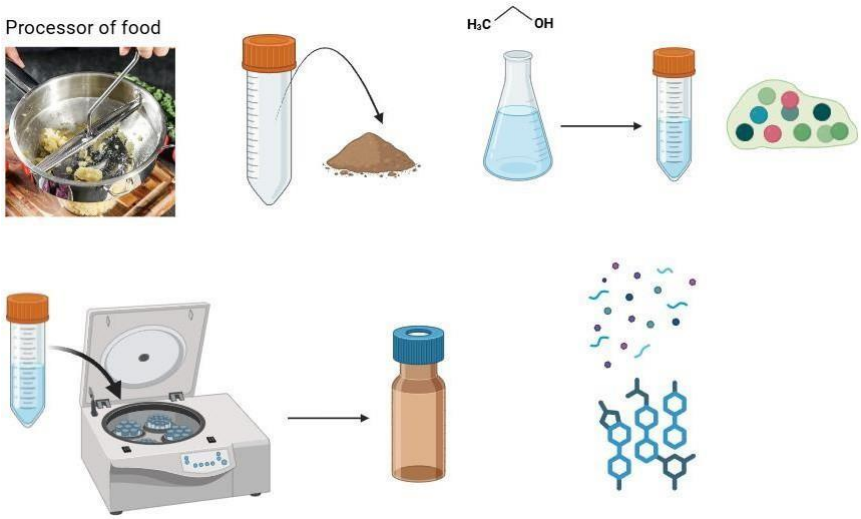
Concentrado hasta sequedad obtenido después de evaporar los solventes.



Nota: Fotografía de Autoría propia.

Figura 32.

Diagrama del proceso para maceración estandarizado para las toxinas de Pteridium aquilinum (L.) Khun.



Nota: Autoría propia, con ayuda del programa BioRender.

5. Análisis cromatográfico, mediante “Cromatografía de capa fina”.

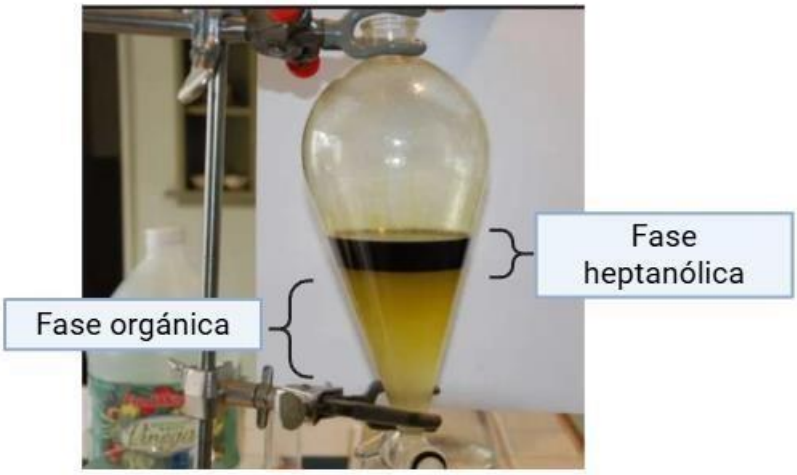
La cromatografía fue estandarizada para la molécula principal a determinar, que, en este sentido, es la Pterosina A. Por ello, la realización de ensayos prueba previos fue esencial para poder conseguir resultados favorables. En principio, la separación cromatográfica se dio utilizando una placa sin revelador UV de la marca Merck “TLC silica gel 60” y una fase móvil compuesta por Diclorometano: Metanol (9:1). La misma fue estandarizada según los métodos de (Otgonsugar et al., 2018).

Previo a utilizarse la muestra concentrada y resuspendida en metanol, se realiza una hidrólisis básica; primero, usando un pH-metro se mide el pH inicial de la muestra (generalmente se encuentra entre 5-6); segundo, se basifica el extracto concentrado, usando NaOH 1 M, mediante goteo o usando micropipeta (0.5 uL) hasta un pH en rango 10-11. Una vez alcanzada la alcalinidad, se lleva a baño maría a 40°C durante 1 hora. Por último, se neutraliza el extracto, usando HCl (1 M) por goteo. Todos estos pasos, son medidos mediante un pH-metro Metter-Toledo (Odriozola, 2012).

Con los hidrolizados, se procede a extraer clorofila; para ello, se ubica dentro de un embudo de decantación los 3 mL de metanol acuoso mezclado con el concentrado de muestra con 3 mL de N-Heptano, es decir, en proporción 1:1. Se extraen los gases generados al agitar de forma homogénea y se ubica el embudo en el soporte universal, acoplado a un agitador orbital (a 90 RPM) durante 3 minutos. Se obtuvieron dos fases, en la cual la fase heptanólica está arriba y la fase orgánica abajo, la que se recuperó en tubos de ensayo (Park et al., 2023; Kowalska et al., 2022).

Figura 33.

Muestra metanólica mezclada con N-Heptanol, en embudo de decantación.

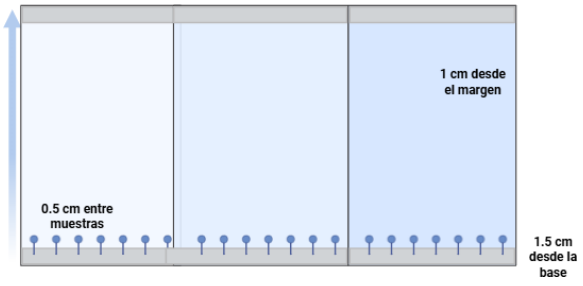


Nota: Fotografía de Autoría propia.

Con las muestras hidrolizadas y extraídas la clorofila, se procede a ubicarlas en la placa cromatográfica. La forma de colocación fue dada con los siguientes parámetros: La placa de 20x20 cm, fue subdividida desde la base 1.5 cm hacia arriba (para la colocación de puntos), entre cada punto existe una distancia de 0.5 cm, y para evitar efecto borde, se empieza la colocación a 1 cm del margen posterior y anterior.

Figura 34.

Esquema de la división de la placa cromatográfica de sílica gel.



Nota: Elaboración propia mediante BioRender.

Con la placa cargada, se procede a preparar la fase móvil escogida, misma que, se realizó en una probeta de 50 mL; debido a que se preparó un total de 30 mL. En este sentido, 27 mL de DCM y 3 mL de metanol; con esto, se ubicaron los solventes dentro de la cámara cromatográfica y agitaron para saturar la misma con los gases producidos por los solventes orgánicos. Por último, se colocó la placa TLC, corroborando que la base tenga contacto directo con la fase móvil y se dejó tapando la cámara durante aproximadamente 1 hora con 15 minutos (el punto final no debe sobrepasar 1 cm del borde superior).

La separación de los compuestos será poco visible a simple vista, por lo cual, se reveló la placa con anisaldehído sulfúrico; y después de ello, se observó en cámara UV a longitud de onda lejana. Se tomaron fotos de lo obtenido y reportó como resultado dentro de la investigación.

6. Correlación mediante encuestas.

La evaluación del componente epidemiológico se realizó a partir de información secundaria previamente recolectada mediante encuestas estructuradas aplicadas a dueños o encargados de las fincas escogidas. Dichas encuestas, aunque no fueron diseñadas a priori para este estudio, constituyeron una fuente válida de datos primarios relacionados con la presencia de hematuria enzoótica bovina (HEB), características del sistema de manejo ganadero, percepción de la abundancia de *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn y prácticas de pastoreo.

Toda la información fue tabulada de manera digital dentro de una base de datos; de tal modo que, fue procesada para depurar y filtrar los datos más relevantes para completar el tercer objetivo del presente estudio. Las categorizaciones de estos datos fueron dadas en frecuencia y ausencia o presencia de HEB en el ganado bovino.

Dado la naturaleza de datos, que en su mayoría son del tipo observacional, la correlación fue planteada bajo un enfoque no causal; de este modo, se buscó identificar patrones de coexistencia entre la presencia del helecho macho (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn) y la ocurrencia de HEB.

Estadística.

En la realización del análisis estadístico, todos los resultados fueron organizados en tablas de Excel e importadas con el lenguaje estadístico R en el entorno Rstudio. Las variables categóricas se expresaron mediante frecuencias absolutas y porcentajes (como son la presencia o ausencia de toxina, prevalencia de HEB y positividad), mientras que las variables cuantitativas derivadas del secado se resumieron en promedios.

Para evaluar el contenido de humedad denotado por el peso neto de las muestras biológicas, se realizó otro pesaje post-secado; de tal modo que, la fórmula de % de humedad se calculó con:

$$\%H = \frac{Peso\ Humedo - Peso\ Seco}{Peso\ humedo} \times 100$$

Así también, se calculó el porcentaje de materia seca, misma que se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\%MS = 100 - \%H$$

Esto con el fin de evaluar la eficiencia del método estandarizado para el secado y tratamiento de las frondas correspondientes al material biológico.

Para evaluar la asociación entre la presencia de toxina y la finca de procedencia, se aplicó la prueba exacta de Fisher, correspondiente para evaluar una tabla de contingencia de tres por dos categorías. Para analizar la asociación entre positividad y zona de muestreo, así como entre positividad y estado fenológico, se planteó la hipótesis nula como la ausencia de asociación entre las variables categóricas evaluadas.

La proporción de muestras toxicológicamente positivas se calculó dividiendo el número de helechos positivos entre el total de helechos examinados en cada categoría. Este procedimiento se realizó tanto para estado fenológico “inmaduro” y “maduro”. Debido a un número reducido de helechos y a datos de proporciones iguales a cero, se estimaron intervalos de confianza del 95% mediante el método de Wilson.

Para describir la HEB, se calcularon las prevalencias observadas por finca mediante el cociente entre vacas positivas a HEB y el total de vacas examinadas por finca, multiplicado por cien. Así también, se estimaron intervalos de confianza mediante el método Wilson. La prevalencia glocal se calculó por el total de animales positivos dividido para el total de animales examinados.

Por último, para analizar la correlación; se evaluó por separado para la positividad toxicológica de helechos inmaduros, la positividad de helechos maduros y positividad toxicológico total. Se calculó el coeficiente de Pearson como medida complementaria y descriptiva entre las variables. Sin embargo, para este fin, y debido a el tamaño muestral limitado, se evaluó el rango de Spearman.

El análisis principal es mediante Spearman, mismo que tiene carácter no paramétrico y permite evaluar relaciones monotónicas sin requerir distribución normal. En este sentido, la significancia es evaluada mediante una prueba exacta de permutación. Con esto, se comparó la correlación observada con las correlaciones obtenidas al reorganizar todas las posibles asignaciones de los valores de prevalencia entre las tres fincas.

$$3! = 6$$

Todas las pruebas estadísticas fueron bilaterales y se estableció un nivel de significancia del 0.05. Se consideró que la asociación es evidente o estadísticamente significativa cuando valor de p fue inferior a 0.05; mientras que los superiores o mayores, se interpretaron como ausencia y, por ende, rechazar la hipótesis nula.

Consideraciones éticas.

En cuanto al manejo de los ejemplares vegetativos, la recolección de *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn fue efectuada con el permiso de los dueños de cada finca; respetando las normativas de la localidad y criterios de sostenibilidad, de tal modo que, toda alteración significativa fue evadida. Debido a no encontrarse en el libro rojo de especies del Ecuador, y el helecho macho ser considerado un

arvense o maleza de los potreros o pastizales, no requirió de permisos especializados para su recolección y análisis.

El procesamiento de las muestras obtenidas fue dentro de un contexto cerrado y controlado en el laboratorio de materiales avanzados del CENCINAT, perteneciente a la Universidad de las Fuerzas Armadas “ESPE”. Siguiendo normativa interna y lineamientos establecidos, así como también, justificando el uso de todos los solventes químicos y garantizando una correcta gestión de sus residuos.

En relación con el componente epidemiológico, todo dato obtenido fue manejado con estricta confidencialidad; de este modo, se garantizaron los derechos de aquellos quiénes proporcionaron toda la información necesaria, tal como, anonimato de los informantes. Así también, cada encuesta cuenta con un consentimiento informado, mismo que fue firmado, entendido y explicado a los participantes encuestados.

Capítulo IV

Análisis y discusión de los resultados.

Análisis de resultados.

- Caracterización botánica de *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn presente en las zonas de Peñaherrera.

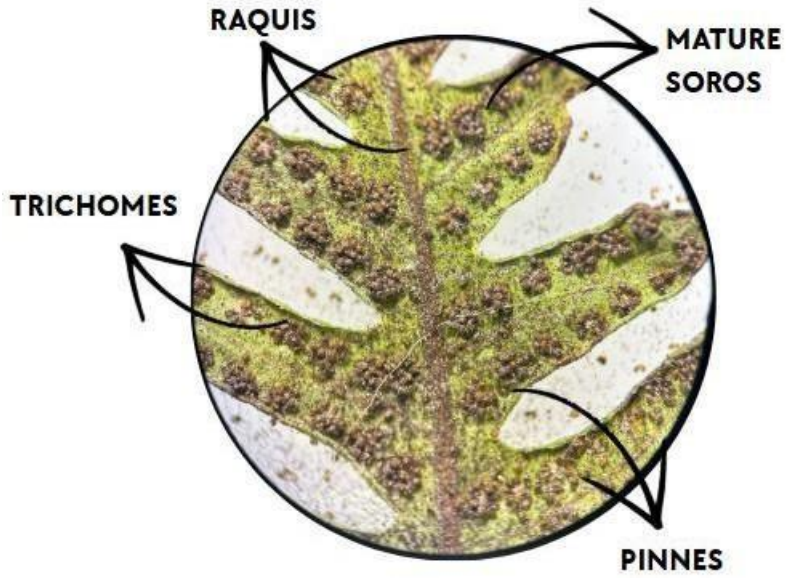
Las frondas observadas, en general, tienen la morfología típica de la especie; una raquis prominente, pinnas alternas y soros localizadas en cara abaxial de las pinnas. En este sentido, las diferencias son difíciles de observar entre estados fenológicos analizados (inmaduro y maduro); y debido a ello, se hace uso de las esporas del helecho, como marco referencia para compilar diferencias adecuadas.

Como primer resultado, como se observa en la Figura 37, tenemos una fronda madura de helecho macho, vista bajo estereoscopio. Se aprecia una raquis bien definida, pinnas desarrolladas y soros maduros visibles en cara abaxial, debido a las agrupaciones de tonos oscuros. Hay tricomas

visibles, sumamente dispersos. Así también, la disposición de soros y morfología, compilan como tal a un *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn en estadio reproductivo avanzado (Malík et al., 2024).

Figura 35.

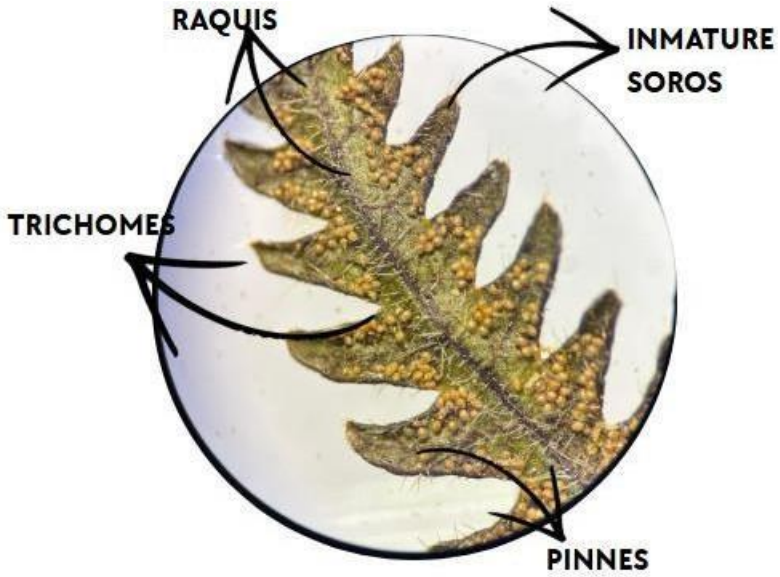
Parte posterior de una fronda madura de Pteridium aquilinum (L.) Kuhn, vista bajo macroscopio y con luz blanca.



Se observa en la Figura 38, pinnas con soros en estados iniciales, principalmente evaluados por el color amarillento intenso (Malík et al., 2024). Tanto la raquis como tricomas siguen estando de forma constante, así como el patrón respecto a la fronda madura. La menor definición de la superficie, indica un estado fenológico temprano o intermedio (Rincón et al., 2016).

Figura 38.

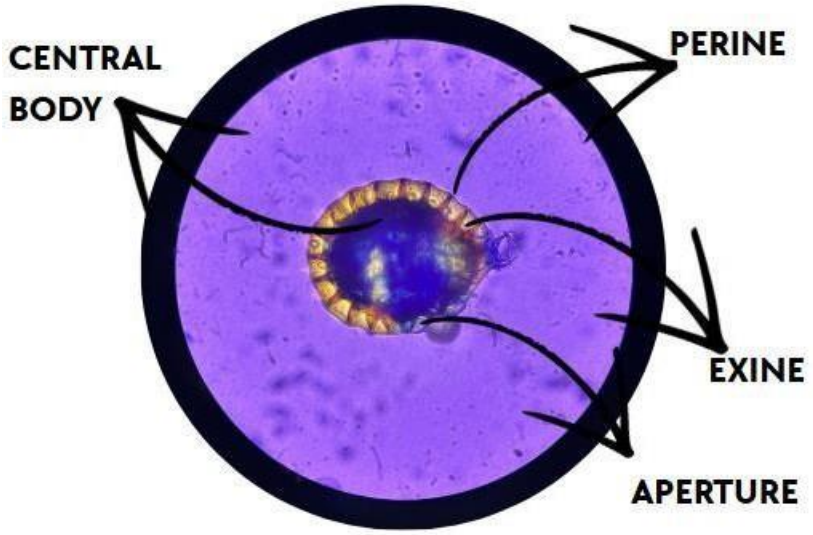
Parte posterior de una fronda inmadura de Pteridium aquilinum (L.) Kuhn, vista bajo macroscopio y con luz blanca.



En la Figura 39, se observa una fotografía obtenida a partir de un aumento 40x en microscopio óptico, de la espora correspondiente a una fronda madura. Se distingue claramente la exine, perine, el cuerpo central y apertura. La definición clara de aperturas y ornamentación, sugieren esporas maduras y definidas; generalmente, se indica que una espora madura, se encuentra a punto de reproducción (Štefanić et al., 2022).

Figura 39.

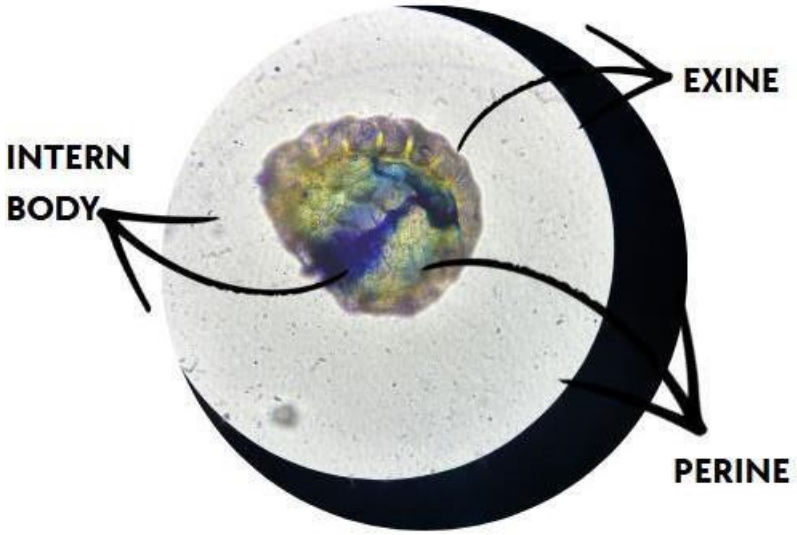
Visualización en microscopio óptico a 40x de esporas pertenecientes de una fronda madura de Pteridium aquilinum (L.) Kuhn, teñida con azul de toluidina.



Dentro de una espora inmadura, como se observa en la Figura 40, se observa una definición muy tenue tanto del cuerpo interno como de las paredes de exina y perina. A nivel de definición, la ornamentación y tinción son mucho menores, debido al estadio temprano de maduración, de tal modo que, los compuestos encargados de dar robustez y adecuada fijación están en concentraciones menores (Štefanić et al., 2022).

Figura 40.

Visualización en microscopio óptico a 40x de esporas pertenecientes de una fronda inmadura de Pteridium aquilinum (L.) Kuhn, teñida con azul de toluidina diluido.



- Evaluación de presencia de toxinas y compuestos relacionados al helecho macho (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn).

Previo al macerado, se realizó un secado a las muestras. El secado tiene una inferencia directa respecto a la cantidad de metabolitos secundarios extraídos. En este sentido, se calcularon los porcentajes de humedad, previo y post-secado; como se enlista en la siguiente tabla:

Tabla 4.

Porcentaje de humedad de las muestras biológicas de Pteridium aquilinum (L.) Kuhn después del proceso de desecado.

Muestra	Peso pre-secado	Peso post-secado	% de humedad post-secado ($\%H = \frac{PMH-PMD}{PMH}$)	% de material seco

				$(\%MS = 100 - \%H)$
F1-Z1-I1	32.83 g	11.23 g	65.8%	34.2%
F1-Z2-I2	38.39 g	12.69 g	66.9%	33.1%
F1-Z2-I1	35.01 g	11.88 g	66.1%	33.9%
F1-Z1-I3	31.15 g	11.02 g	64.6%	35.4%
F1-Z1-M3	33.51 g	13.16 g	60.7%	39.3%
F1-Z1-M1	40.78 g	15.29 g	62.5%	37.5%
F1-Z2-M2	33.98 g	13.39 g	60.6%	39.4%
F1-Z1-M2	34.06 g	13.27 g	61.0%	39.0%
F2-Z2-M1	32.42 g	12.88 g	60.3%	39.7%
F2-Z2-M3	36.90 g	12.17 g	67.0%	33.0%
F2-Z2-M2	59.66 g	18.57 g	68.9%	31.1%
F2-Z1-M1	26.08 g	12.17 g	53.3%	46.7%
F2-Z2-I3	43.13 g	14.24 g	67.0%	33.0%
F2-Z1-I2	19.29 g	9.22 g	52.2%	47.8%
F2-Z1-I3	28.40 g	11.22 g	60.5%	39.5%
F2-Z1-I1	41.55 g	12.04 g	71.0%	29.0%
F3-Z1-M1	46.65 g	18.23 g	60.9%	39.1%
F3-Z2-M2	67.32 g	23.15 g	65.6%	34.4%
F3-Z2-M1	50.84 g	19.12 g	62.4%	37.6%
F3-Z1-M2	68.48 g	19.06 g	72.2%	27.8%
F3-Z2-I1	45.08 g	14.63 g	67.6%	32.4%
F3-Z1-I2	36.51 g	15.11 g	58.6%	41.4%
F3-Z2-I2	34.65 g	12.84 g	62.9%	37.1%
F3-Z1-I3	49.58 g	14.87 g	70.0%	30.0%

Nota: Elaboración propia. F = Finca (1, 2 o 3), Z = Zona (1 o 2), I = Inmaduro, M = Maduro.

Tabla 5.

Porcentajes de humedad promedio y materia seca promedio, segmentado según las fincas de donde proviene la muestra biológica.

Finca	% de humedad promedio	%MS promedio
F1	63.5 %	36.5%
F2	62.5 %	37.5%
F3	65.0%	35.0%

Nota: Elaboración propia. F = Finca (1, 2 o 3), %MS = Porcentaje de masa seca.

Tabla 6.

Porcentajes promedio de humedad y materia seca para las 24 muestras recolectadas.

Parámetro	**Valor promedio porcentual**
Humedad (%)	63.7%
Materia seca (%)	36.3%

Nota: Elaboración propia.

En promedio, el global de las 24 muestras, se indica un 63.7% de humedad y un 36.6% de materia seca; confirmando así, que *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn tiene un muy alto contenido de agua en sus tejidos, permitiendo o dando paso a procesos de oxidación o pardeamiento químico. Por tanto, la conservación de las muestras resultó en un punto crítico.

Entre las fincas, las diferencias no son tan significativas dentro del rango promedio, tanto para humedad como para materia seca; esto coincide con una tendencia de patrón, en la cual, los tejidos en desarrollo suelen presentar mayor contenido de agua y menor densidad de compuestos estructurales.

Los valores oscilaron entre 52,2% y 72,2%, demostrando así un rango de heterogeneidad entre las muestras. Según se analiza, las frondes que obtuvieron un mayor secado corresponden a los estados fenológicos más avanzados de madurez, o condiciones ambientales más secas; mientras que las húmedas se relacionan con frondes jóvenes.

Con frondas secas, los macerados a realizarse fueron enlistados de tal forma que, se mantuvieron mismas condiciones para realizar una reproducibilidad entre las muestras biológicas. De este modo, los macerados obtenidos fueron procesados para la cromatografía de capa fina (TLC).

Figura 41.

Corrida del estándar de Pterosina A, bajo mismas condiciones de fase móvil y sílica.

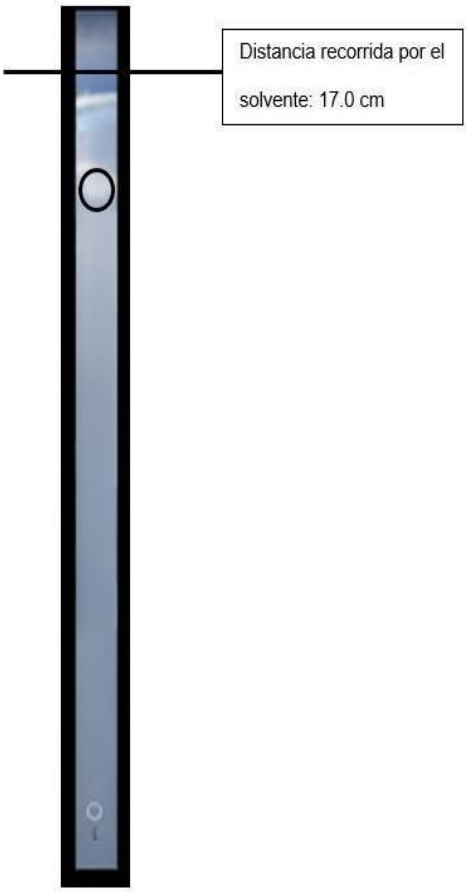


Figura 42.

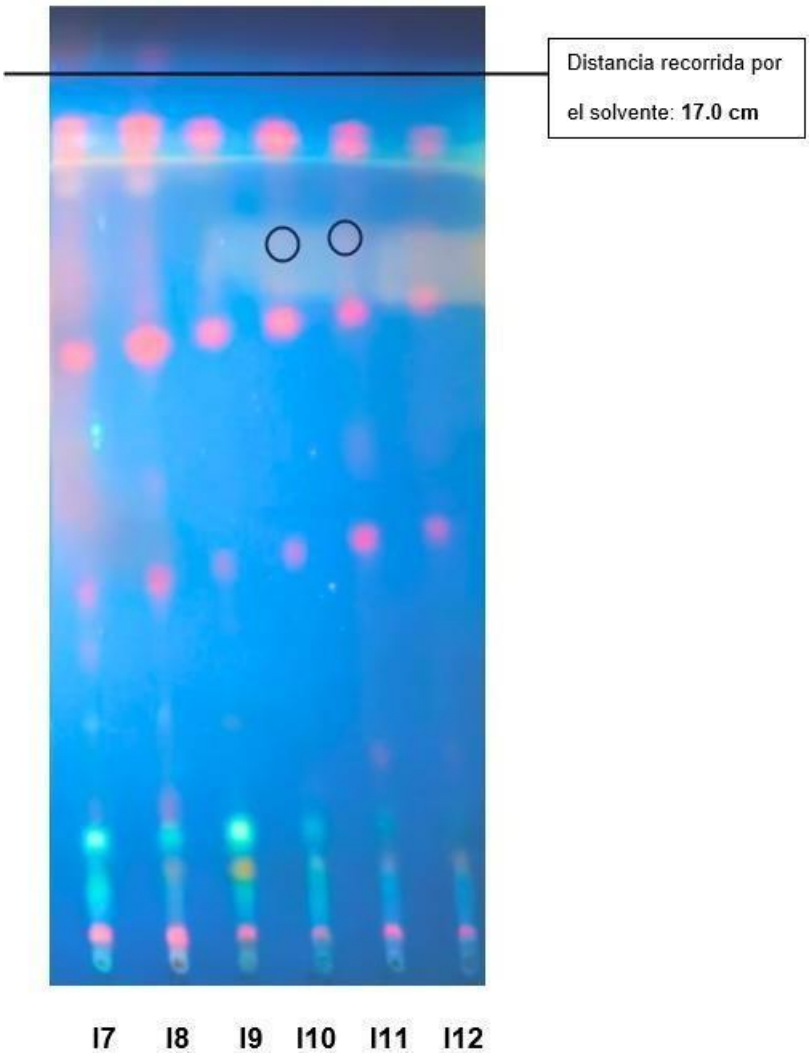
Resultado de primera placa cromatográfica TLC, vista bajo UV lejano. Corresponde a las muestras biológicas del estado fenológico "Inmaduro" de Pteridium aquilinum (L.) Kuhn.



Nota: Las muestras fueron cargadas en orden secuencial, desde la 1 hasta la 6. I = Inmaduro.

Figura 43.

Resultado de segunda placa cromatográfica TLC, vista bajo UV lejano. Corresponde a las muestras biológicas del estado fenológico "Inmaduro" de Pteridium aquilinum (L.) Kuhn.



Nota: Las muestras fueron cargadas en orden secuencial, desde la 7 hasta la 12. I = Inmaduro.

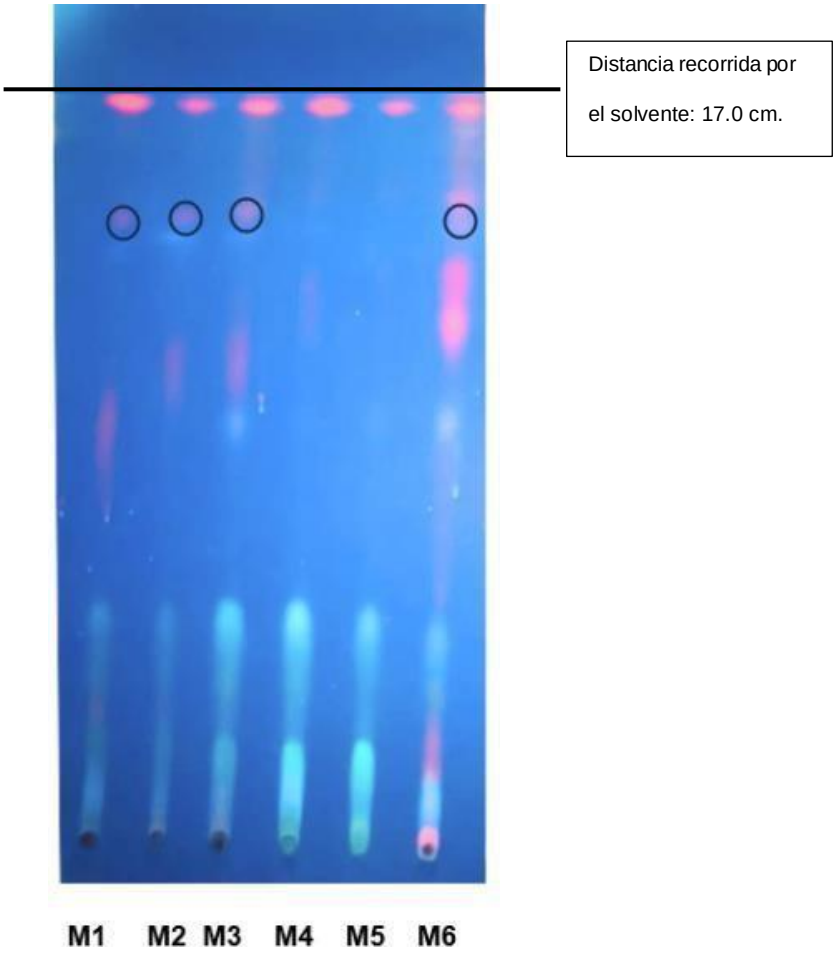
Tabla 7.

Resumen de Rfs obtenidos en la cromatografía de capa fina TLC, correspondiente a muestras biológicas de Pteridium aquilinum (L.) Kuhn inmaduras.

Nro. Muestra	Etiquetado	Estado fenológico	Color bajo UV	Rf	Compuesto tentativo
1	F1-Z1-I1	Inmaduro	-	-	N/A
2	F1-Z2-I2	Inmaduro	Rojo	0.823	Pterosina A
3	F1-Z2-I1	Inmaduro	-	-	N/a
4	F1-Z1-I3	Inmaduro	Rojo	0.824	Pterosina A
5	F2-Z2-I3	Inmaduro	-	-	N/A
6	F2-Z1-I2	Inmaduro	-	-	N/A
Estándar			Blanco	0.825	Pterosina A
7	F2-Z1-I3	Inmaduro	-	-	N/A
8	F2-Z1-I1	Inmaduro	-	-	N/A
9	F3-Z2-I1	Inmaduro	-	-	N/A
10	F3-Z1-I2	Inmaduro	Rojo	0.836	Pterosina A
11	F3-Z2-I2	Inmaduro	Rojo	0.841	Pterosina A
12	F3-Z1-I3	Inmaduro	-	-	N/A

Figura 44.

Resultado de primera placa cromatográfica TLC, vista bajo UV lejano. Corresponde a las muestras biológicas del estado fenológico "Maduro" de Pteridium aquilinum (L.) Kuhn.



Nota: Las muestras fueron cargadas en orden secuencial, desde la 1 hasta la 6. M = Maduro.

Figura 45.

Resultado de segunda placa cromatográfica TLC, vista bajo UV lejano. Corresponde a las muestras biológicas del estado fenológico "Maduro" de Pteridium aquilinum (L.) Kuhn



Nota: Las muestras fueron cargadas en orden secuencial, desde la 7 hasta la 12. M = Maduro.

Tabla 8.

Resumen de Rfs obtenidos en la cromatografía de capa fina TLC, correspondiente a muestras biológicas de Pteridium aquilinum (L.) Kuhn maduras.

Nro. Muestra	Etiquetado	Estado fenológico	Color bajo UV	Rf	Compuesto tentativo
1	F1-Z1-M3	Maduro	Rojo	0.801	Pterosina A
2	F1-Z1-M1	Maduro	Rojo	0.804	Pterosina A
3	F1-Z2-M2	Maduro	Rojo	0.805	Pterosina A
4	F1-Z1-M2	Maduro	-	-	N/A
5	F2-Z2-M1	Maduro	-	-	N/A

6	F2-Z2-M3	Maduro	Rojo	0.799	Pterosina A
Estándar			Blanco	0.825	Pterosina A
7	F2-Z2-M2	Maduro	Rojo	0.807	Pterosina A
8	F2-Z1-M1	Maduro	Rojo	0.802	Pterosina A
9	F3-Z1-M1	Maduro	Rojo	0.795	Pterosina A
10	F3-Z2-M2	Maduro	-	-	N/A
11	F3-Z2-M1	Maduro	-	-	N/A
12	F3-Z1-M2	Maduro	-	-	N/A

De este modo, la tabla general de resultados obtenidos en el marco de la cromatografía de capa fina (TLC), se evalúa de la siguiente forma:

Tabla 9.

Frecuencia general de presencia para Pterosina A.

Presencia	Número de muestras	Porcentaje (%)
Sí	11	45.83
No	13	54.17
Total	24	100

Del total de 24 muestras analizadas, se detectó la presencia de Pterosina A en 11 muestras (45,83 %), mientras que 13 muestras (54,17 %) no presentaron la toxina. Estos resultados indican que, en las muestras evaluadas, predominó la ausencia de Pterosina A.

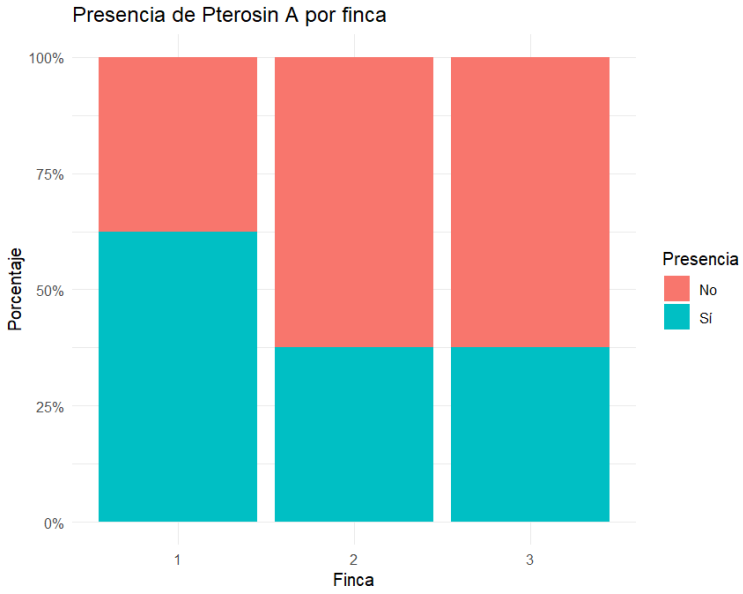
Tabla 10.

Porcentaje en cada finca, de presencia de Pterosina A.

Finca	Negativo (%)	Positivo (%)
1	37.50	62.50
2	62.50	37.50
3	62.50	37.50

Figura 46.

Presencia porcentual de Pterosina A, según la finca



Nota: Autoría propia, realizado con la ayuda del software Rstudio.

En este sentido, la asociación relacional entre la presencia de la toxina Pterosina A y la finca de la cual proviene la muestra del helecho macho, es o no significativa. Para esto, se realizó la prueba de Fisher. Dando el siguiente resultado:

Prueba de Fisher: $p = 0.6702$

Por lo cual, no existe una asociación estadísticamente significativa entre ambas variables. Aun cuando la finca número 1 presentó una mayor proporción de positivos respecto a las fincas 2 y 3, las diferencias no son significativas.

Tabla 12.

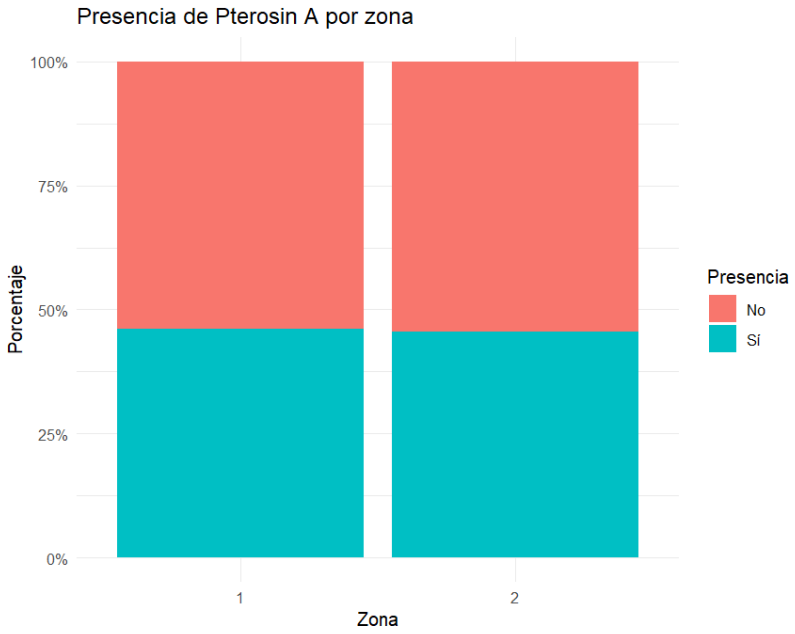
Frecuencia porcentual en la presencia de Pterosina A según la zona

Zona	Negativo (%)	Positivo (%)
1	53.85	46.15

2	54.55	45.45

Figura 47.

Presencia de Pterosina A según la zona



Nota: Autoría propia, realizado con la ayuda del software Rstudio.

En este sentido, la asociación relacional entre la presencia de la toxina Pterosina A y la zona dentro de la finca, de la cual proviene la muestra del helecho macho, es o no significativa. Para esto, se realizó la prueba de Fisher. Dando el siguiente resultado:

Prueba de Fisher: $p = 1.000$

Por lo cual, no existe una asociación estadísticamente significativa entre ambas variables. Esto se evalúa debido a la frecuencia muy similar entre las muestras positivas, tanto en las zonas 1 y 2.

Tabla 13.

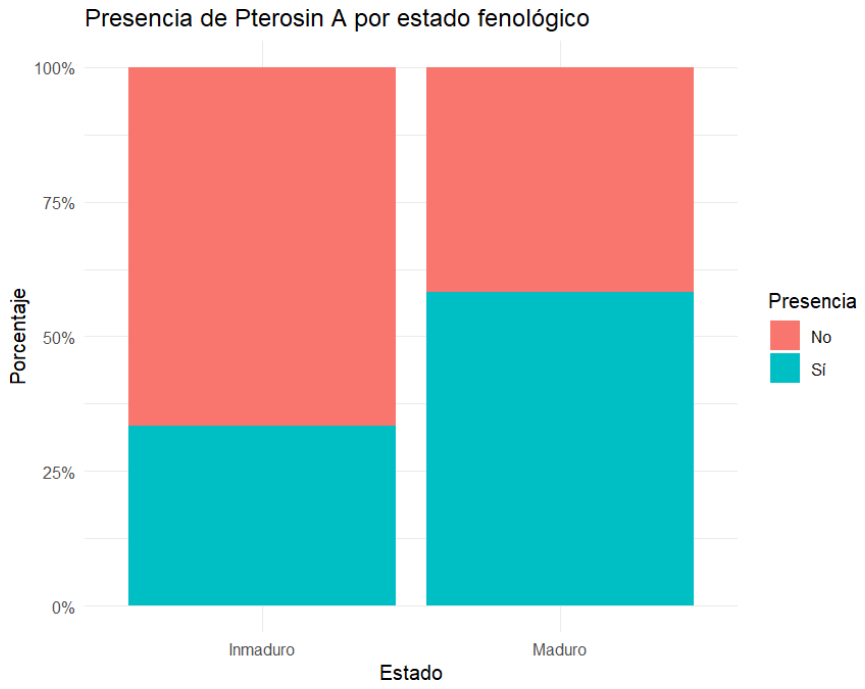
Porcentaje de presencia de Pterosina A basado en el estado fenológico.

Estado fenológico	Negativo (%)	Positivo (%)

Inmaduro	66.67	33.33
Maduro	41.67	58.33

Figura 48.

Presencia de Pterosina A según el estado fenológico



Nota: Autoría propia, realizado con la ayuda del software Rstudio.

En este sentido, la asociación relacional entre la presencia de la toxina Pterosina A y el estado fenológico de la muestra vegetal al momento de muestreo; es o no significativa. Para esto, se realizó la prueba de Fisher. Dando el siguiente resultado:

Prueba de Fisher: $p = 0.4136$

La prueba exacta de Fisher indicó que no existe una asociación estadísticamente significativa entre el estado fenológico y la presencia de Pterosina A. Aunque las plantas maduras presentaron una mayor proporción de muestras positivas (58,33 %) en comparación con las inmaduras (33,33 %), esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

- Correlación de presencia toxicológica en el helecho macho (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn) con la incidencia de hematuria enzoótica bovina (HEB) en la parroquia de Peñaherrera.

Las muestras biológicas se recopilaron y clasificaron según se enlista en la siguiente tabla. Así también, cada una de las mismas, tiene una zona y ubicación geográfica única, dada y recopilada mediante Wikiloc. De tal modo que, la evaluación de presencia o ausencia está basada también en el lugar de recolección. Con esto, los datos de correlación están basados en realidad en encuestas realizadas a las 3 fincas muestreadas, así como también, con los resultados obtenidos en el segundo objetivo.

Tabla 14.

Coordenadas de las muestras biológicas, recolectadas en la parroquia de Peñaherra, tanto en la finca 1, 2 y 3.

Etiqueta	Estado fenológico	Coordenadas
F1-Z1-I1	Inmaduro	0.370572, -78573775
F1-Z2-I2	Inmaduro	0.370178, -78.571818
F1-Z2-I1	Inmaduro	0.370786, -78.661566
F1-Z1-I3	Inmaduro	0.370308, -78.572685
F1-Z1-M3	Maduro	0.370308, -78.572685
F1-Z1-M1	Maduro	0.370572, -78573775
F1-Z2-M2	Maduro	0.370178, -78.571818
F1-Z1-M2	Maduro	0.370858, -78.573648
F2-Z2-M1	Maduro	0.352933, -78.534597
F2-Z2-M3	Maduro	0.353027, -78.534615
F2-Z2-M2	Maduro	0.352932, -78.534735
F2-Z1-M1	Maduro	0.352192, -78.53493
F2-Z2-I3	Inmaduro	0.353027, -78.534615
F2-Z1-I2	Inmaduro	0.352557, -78.534548
F2-Z1-I3	Inmaduro	0.352785, -78.53459
F2-Z1-I1	Inmaduro	0.352192, -78.53493

F3-Z1-M1	Maduro	0.347475, -78.533687
F3-Z2-M2	Maduro	0.34735, -78.534643
F3-Z2-M1	Maduro	0.34735, -78.532648
F3-Z1-M2	Maduro	0.347645, -78.533897
F3-Z2-I1	Inmaduro	0.34735, -78.534643
F3-Z1-I2	Inmaduro	0.347645, -78.533897
F3-Z2-I2	Inmaduro	0.34735, -78.534643
F3-Z1-I3	Inmaduro	0.347485, -78.533651

Nota: Elaboración propia. F = Finca (1, 2 o 3), Z = Zona (1 o 2), I = Inmaduro, M = Maduro.

Según los resultados obtenidos en el objetivo anterior, se realizó estadística de alto rigor científico para poder encontrar la correlación que se busca comprobar. Para esto, la base de datos principal fue obtenida mediante encuestas a los dueños o encargados de las fincas lecheras en Peñaherrera.

Para poder analizar la correlación, se realizaron las pruebas estadísticas para comprobar la prevalencia; tanto por finca y HEB, por helechos inmaduros positivos y helechos maduros positivos para la toxina. Obteniendo lo siguiente:

Tabla 15.

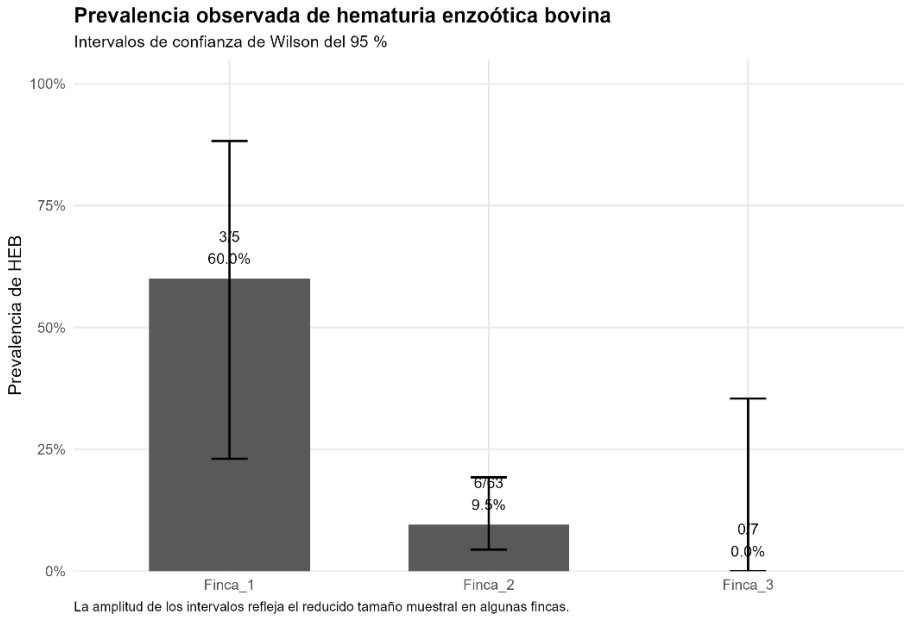
Prevalencia observada de HEB por finca.

Finca	Vacas examinadas	HEB positivas	Prevalencia observada (%)	IC de Wilson 95% (%)
Finca 1	5	3	60.00	23.07-88.24
Finca 2	63	6	9.52	4.44-19.26
Finca 3	7	0	0.00	0.00-35.43
Total	75	9	12.00	6.44-21.26

Nota: La prevalencia observada se calculó dividiendo el número de vacas positivas a hematuria enzoótica bovina entre el total de vacas examinadas en cada finca. Los intervalos de confianza del 95 % se estimaron mediante el método de Wilson.

Figura 49.

Prevalencia observada de hematuria enzoótica bovina por finca analizada



Nota: Autoría propia, realizado con la ayuda del software Rstudio.

Tabla 16.

Positividad toxicológica de helechos en estado fenológico inmaduro y maduro

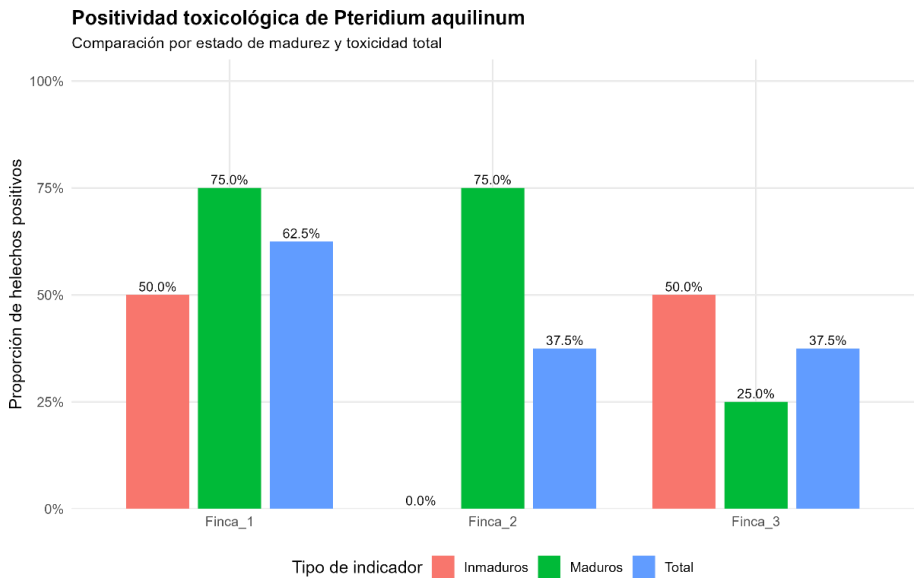
Finca	Estado fenológico	Helechos examinados	Positivos a toxina	Positividad (%)	IC de Wilson 95% (%)
Finca 1	Inmaduro	4	2	50.00	15.00-85.00
Finca 1	Maduro	4	3	75.00	30.06-95.44

Finca 2	Inmaduro	4	0	0.00	0.00-48.99
Finca 2	Maduro	4	3	75.00	30.06-95.44
Finca 3	Inmaduro	4	2	50.00	15.00-85.00
Finca 3	Maduro	4	1	25.00	4.56-69.94

Nota: Los amplios intervalos de confianza se relacionan con el reducido número de helechos analizados por finca.

Figura 50.

Positividad toxicológica de Pteridium aquilinum (L.) Kuhn. Comparación por estado de madurez y toxicidad total



Nota: Autoría propia, realizado con la ayuda del software Rstudio.

Con ello, se realizó una estimación agrupada. Para obtener resultados útiles para hallar las correlaciones se hizo uso de cuatro análisis estadísticos que contribuyan a la misma. Siendo estos: Pearson r y Spearman rho. Obteniendo lo siguiente:

Tabla 17.

Correlación entre toxicidad del helecho macho y prevalencia de HEB.

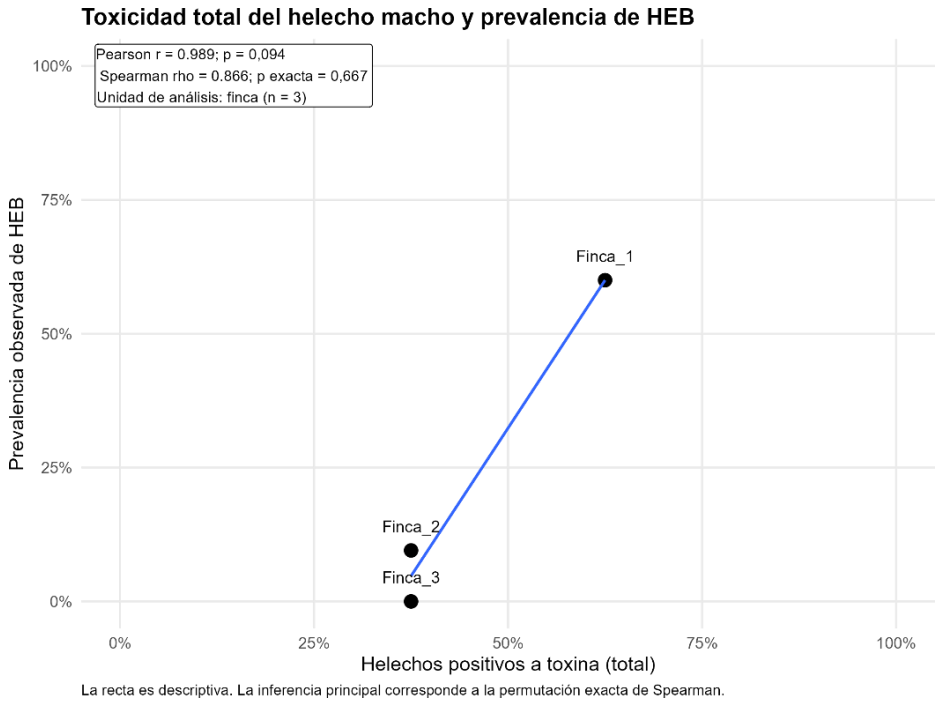
Variable	Pearson r	Valor p	Spearman rho	Valor p por permutación	Interpretación
Toxicidad en helechos inmaduros	0.367	0.761	0.000	1.000	No significativa
Toxicidad en helechos maduros	0.622	0.572	0.866	0.667	No significativa
Toxicidad total del helecho	0.989	0.094	0.866	0.667	No significativa

El análisis obtenido por el coeficiente de Pearson muestra una correlación lineal sumamente alta entre toxicidad total de helecho y prevalencia de HEB. Sin embargo, cuando se aplica el coeficiente de Spearman, considerado como método principal por el tamaño muestral tan reducido, se observa una correlación positiva alta, pero con una no significancia entre ambas variables. Por tanto, no hay evidencia estadística suficiente para confirmar una asociación.

Figura 51.

Relación entre la positividad toxicológica total del helecho macho (Pteridium aquilinum (L.) Kuhn) y la

prevalencia observada de hematuria enzoótica bovina en las fincas evaluadas de la parroquia de Peñaherrera.



Nota: Cada punto representa una finca. La línea azul corresponde a la tendencia lineal entre ambas variables. Se muestran los coeficientes de correlación de Pearson y Spearman únicamente como medidas descriptivas de la asociación observada. La inferencia estadística se basó en el coeficiente de Spearman y en la prueba exacta de permutación debido al reducido número de fincas evaluadas (n = 3). Autoría propia, realizado con la ayuda del software Rstudio.

Discusión de resultados.

- Caracterización botánica de *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn presente en las zonas de Peñaherrera.

La caracterización permitió reconocer frondas con raquis sumamente definida, pinnas desarrolladas, tricomas y soros dispuestos sobre la superficie abaxial, esto, en cualquiera de los dos estados fenológicos analizados, como son, inmaduro y maduro. En frondas maduras, un carácter muy notorio, fue la coloración de soros; siendo estos, con tonalidades oscuras, mientras que, en inmaduras,

la coloración fue predominante hacia el amarillo. El grado de diferenciación, principalmente fue la pigmentación (Calderón et al., 2013).

Un carácter relevante del género *Pteridium*, es la disposición marginal o submarginal de los soros, constituyendo un determinante hacia el mismo. Según Zenkteler et al., (2022) se ha demostrado que la morfología de los soros y de indusios, son un factor importante a nivel taxonómico dentro de *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn; por tanto, la división de frondas y distribución de soros observadas en este proyecto, fueron compatibles con el género *Pteridium*.

No obstante, la denominación específica, *Pteridium aquilinum* es un tema que compromete mucha mayor cantidad de estudios y robustez; en este sentido, muchas veces, se requieren de estudios a nivel genético para confirmarlo del todo. Según Wolf et al., (2019), los marcadores nucleares son capaces de demostrar que el género presenta una considerable complejidad genética y relaciones filogenéticas que no siempre coinciden con identificaciones basadas solamente en su morfología. Resulta muy pertinente en Sudamérica, donde se han descrito diferentes especies y linajes del género, pero siempre se han evaluado mediante marcadores genéticos.

Mediante la observación microscópica de esporas, permitió distinguir regiones específicas como la exina, perina, cuerpo interno y apertura. En las frondas maduras, se evidenció una estructura de apertura mucho más definida a contraste de las inmaduras. Ramírez-Trejo et al., 2013, utilizó microscopia para describir esporas y etapas iniciales del desarrollo de *Pteridium caudatum*; de este modo, se permitió señalar estructuras similares a las descritas anteriormente, como confirmación ultraestructural. De este modo, las características son compatibles al género *Pteridium*.

- **Evaluación de presencia de toxinas y compuestos relacionados al helecho macho (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn).**

El contenido de humedad es metodológicamente relevante correlacionado principalmente por las características morfológicas del helecho macho. Se evaluó la humedad promedio general de las

muestras biológicas, dejando en un 63,7% y un promedio de materia seca del 36,3%; evidenciando así que mayor parte del peso inicial está proporcionado por agua interna de la muestra. Sin embargo, cabe denotar que esto contribuye a la estabilidad de los glucósidos iludánicos.

Según Cácares-Peña et al., (2013), quienes evaluaron distintos pretratamientos en muestras de *Pteridium caudatum* y demostraron que dichos procedimientos influyen directamente en la recuperación de las toxinas como ptaquilósido, Caudatósido y pterosinas asociadas. En consecuencia, a lo mencionado, el factor resulta crítico al momento de observarse los resultados de identificación.

Por tanto, el proceso de secado es un claro ejemplo directo para la positividad hallada en la cromatografía de capa fina posterior. Una fronda que inicialmente contiene Caudatósido puede presentar una mayor señal de Pterosina A. El registro de humedad permitió estandarizar parcialmente el tratamiento de las muestras, como un método crítico a denotar.

Debido a que la Pterosina A pertenece al grupo de las pterosinas asociadas con el CAU, un glucósido iludánico presente en helechos, la cromatografía de capa fina fue realizada con el fin de contemplar la mejor afinidad para el mismo. De acuerdo con Kisielius et al., (2020), el Caudatósido tiene una reactividad bioquímica muy similar a la del ptaquilósido y se relacionan fuertemente en el producto de degradación (Pterosina A). Los autores demostraron que el CAU se encuentra en concentraciones importantes, con ello en cuenta, se tiene la diversidad química y toxicológica del género.

La fase móvil utilizada, constituida por DCM y metanol en una proporción 9:1, permitió obtener una migración adecuada tanto del estándar como de varios componentes o metabolitos secundarios de *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn. La selección de este sistema fue debido a los resultados reportados por Otgonsugar et al., (2018), quienes analizaron muestras de la misma especie utilizando dicha fase móvil y sílica gel F254 como fase estacionaria. Además, visualizaron placas a 365 nm y aplicaron revelador de anisaldehído sulfúrico al 5%. El estándar de Pterosina presentó un Rf de 0.84.

Las similitudes metodológicas son importantes debido a lo evidenciado por Otgonsugar et al., (2018); mismos que, corroboraron que DCM-MeOH tiene una alta capacidad para movilizar compuestos del grupo de las pterosinas. Debido a la inexactitud de la técnica cromatográfica, es relevante comprobarse que, los compuestos posiblemente vistos en la placa son tipificados como “posible toxina”, tal como los autores lo han realizado.

Lu et al., (2019) hicieron uso de columnas de sílica gel con gradientes de DCM-metanol y aplicaron la proporción específica 9:1 durante el fraccionamiento de extractos de *Pteris cretica*, una especie que contiene pterosinas en su perfil toxicológico. Las fracciones obtenidas fueron controladas mediante TLC y, posteriormente, los compuestos identificados por MS o espectrometría de masas en TANDEM; respaldando de este modo la polaridad del sistema escogido.

El estándar de Pterosina A presentó un Rf del 0.825, habiendo recorrido el solvente orgánico de la fase móvil, 17 cm. De tal modo que, las muestras clasificadas como positivas mostraron valores de Rf comprendidos entre el 0.795 y 0.841. La cercanía entre estos valores se debe a que las bandas migraron a una distancia similar, pero al ser una técnica inexacta, el promedio comprende un sesgo de error aceptable.

La amplitud del intervalo obliga a interpretar la identificación como presuntiva. Considerando que la matriz es biológica y contiene una mezcla de distintas pterosinas, pterosidos, compuestos fenólicos, entre otros; es necesario utilizar técnicas de mitigación robustas como UPLC-MS/MS. Guo et al., (2025), evidenció que muchas veces la elevada complejidad química de las pterosinas se ve comprometida por la cantidad de diversificación de estas.

Es importante observar que el estándar tuvo una tonalidad blanquecina, mientras que las bandas de las muestras mostraron una coloración roja bajo luz UV. La diferencia cromática se puede relacionar con la concentración del compuesto. Una banda, dentro del marco de TLC, puede contener varios compuestos, no necesariamente uno solo; de tal modo que, Lu et al., (2019) describieron

absorciones UV características de pterosinas alrededor de 215-228 nm, 258-270 y 303-310 nm, obteniendo imágenes con tonalidades rojas o amarillentas.

De las 24 muestras examinadas, 11 presentaron bandas compatibles con la Pterosina A, equivalentes al 45.83% del total. La positividad, evidenció una distribución heterogénea del marcador químico en los frondas analizadas. La ausencia de banda no es un determinante de negatividad; debido a que TLC es cualitativa depende de la capacidad de observar una señal en la placa y no permite ser precisa.

La Finca 1 presentó el porcentaje más alto de muestras positivas, con 62,50%; mientras que las fincas 2 y 3 presentaron un 37,50% cada una. No obstante, la prueba exacta (Fisher) produjo un valor del 0.6702; dando así una evidencia estadística no suficiente para asociar la detección de bandas compatibles con Pterosina A con la finca de la cual provenga.

Hay diferencias de índole descriptivo entre un 62,50 y 37,50%, dando una sensibilidad respecto al tamaño muestral, de modo tal que, visualmente no sea apreciable y, por ende, la significancia no es real.

De este modo, las frondas maduras presentaron con mayor frecuencia la positividad, con un 58,33% frente al 33,33% que se reportó en las inmaduras. Aun así, en la prueba estadística de Fisher, se dio un 0.4136, y, por tanto, no se evidenció alguna relación significativa entre el estado inmaduro o maduro, respecto a la presencia de bandas de Pterosina A.

En el estudio de Otgonsugar et al., (2018), también se hallaron diferencias entre tipos de muestra. Los autores detectaron PTA en muestras maceradas y liofilizadas, pero, con una concentración mínima de 0.41 ug/g de mínimo y un pico máximo de 49.68 ug/g en el material esporulado. De este modo, el bandeo observado fue más intenso en picos de alta concentración y mucho menos visible en menores concentraciones, dando así rigor al estudio.

- Correlación de presencia toxicológica en el helecho macho (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn) con la incidencia de hematuria enzoótica bovina (HEB) en la parroquia de Peñaherrera.

En la correlación se hallaron distintas situaciones. La finca 1 fue la que obtuvo mayor positividad toxicológica total, con 62,50% y la mayor prevalencia de este modo; con 60.00 %. Las fincas 2 y 3 presentaron la misma positividad, dando un 37.50%; sin embargo, las prevalencias de HEB fueron del 9.52% y 0%, respectivamente. Por tanto, se observa una tendencia positiva entre ambas variables.

En el de la toxicidad total fue muy elevado el coeficiente de Pearson, dando un valor casi cercano a 1; sin embargo, en Fisher, la significación estadística es de un 0.094, dando una incongruencia. En este sentido, los tres puntos, es decir fincas, se aproximaron a una relación lineal; dando un coeficiente muy sensible para la finca 1.

Mediante el análisis de rangos de Spearman, el principal resultado, obtuvo un valor de 0.866 con un valor exacto por permutación de 0.667. La ausencia de significación es debido al número tan reducido de vacas muestreadas y también de fincas; sin embargo, es importante mencionarse que, la exposición toxicológica se debe evaluar por unidad de vaca, más no por un grupo de estas; porque cada una es distinta y, por ende, la exposición es más o menos, dando prevalencias distintas.

Micheloud et al. (2017) documentó HEB en zonas con consumo prolongado de helechos tóxicos y confirmaron que las vacas tenían lesiones neoplásicas en la vejiga, produciendo una evidencia clínica a la exposición directa y prolongada al helecho. De este modo, recurrieron a la medición de toxicidad y lo relacionaron proporcionalmente directo con la aparición de HEB y cáncer a la vejiga.

Capítulo V

Conclusiones

La investigación permitió estudiar de manera conjunta una problemática que se encuentra presente en las fincas ganaderas de Peñaherrera: la abundancia del helecho macho en los potreros y la existencia de bovinos con antecedentes de hematuria enzoótica bovina. Para esto no se consideró únicamente la enfermedad observada en los animales, sino también las características de la planta, su estado de desarrollo, los compuestos presentes en sus frondas y las condiciones en las que el ganado puede estar expuesto. Aunque el estudio no demuestra que el helecho sea la única causa de los casos de HEB encontrados, sí confirma que ambos elementos están presentes dentro de los mismos sistemas productivos y que esta relación debe continuar investigándose con métodos más específicos.

A partir de la caracterización botánica se reconocieron en las muestras los principales rasgos asociados con el género *Pteridium*, como el raquis, las pinnas, las pínnulas, la disposición de los soros marginales, los esporangios y el indusio falso. También se observaron diferencias claras entre las frondas inmaduras y maduras, sobre todo en el desarrollo y la coloración de las estructuras reproductivas. En las frondas jóvenes los soros todavía se encontraban poco definidos y presentaban tonalidades verdes o amarillentas, mientras que en los ejemplares maduros eran más visibles y adquirían una coloración parda.

Estas características permitieron considerar que los ejemplares recolectados son compatibles con *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn. Sin embargo, la identificación de la subespecie no puede considerarse definitiva solamente a partir de la morfología, debido a la semejanza existente entre varias poblaciones sudamericanas del género. Para resolver esta limitación sería necesario realizar análisis moleculares o comparar el material con ejemplares botánicos certificados.

El procesamiento de las muestras fue uno de los componentes más exigentes del estudio. Las etapas de secado, molienda, maceración, concentración, desengrasado e hidrólisis tuvieron que

ajustarse de forma progresiva hasta obtener extractos que pudieran ser aplicados en las placas cromatográficas. Esta experiencia permitió establecer un procedimiento de trabajo útil para futuras investigaciones en la zona, especialmente porque existen pocos protocolos adaptados a la detección cualitativa de derivados del caudatósido y del ptaquilósido mediante cromatografía de capa fina. Aun así, sería incorrecto señalar que el método quedó completamente validado. Para ello todavía se deberían evaluar aspectos como la recuperación de los compuestos, la precisión, la repetibilidad, la selectividad y los límites de detección. También debe considerarse que la hidrólisis pudo no haber transformado completamente los glucósidos originales en sus respectivas pterosinas, lo que habría reducido la intensidad de algunas bandas.

La cromatografía de capa fina permitió separar varios componentes presentes en los extractos vegetales. El sistema formado por placas de sílice gel 60 F_{254} y una fase móvil de diclorometano y metanol en proporción 9:1 produjo una migración adecuada del estándar de pterosina A, cuyo factor de retención fue de aproximadamente 0,826. Este valor sirvió como referencia para comparar las bandas observadas en las muestras. Bajo estas condiciones se encontraron señales compatibles con pterosina A en 9 de las 12 muestras inmaduras y en 5 de las 12 muestras maduras. La mayor frecuencia registrada en las frondas jóvenes coincide con el comportamiento esperado de los glucósidos iludanos, ya que estos compuestos suelen encontrarse en concentraciones más altas durante las primeras etapas de desarrollo de la planta y disminuir a medida que la fronda madura.

Sin embargo, la coincidencia entre el factor de retención de una muestra y el del estándar no demuestra por sí sola que se trate exactamente del mismo compuesto. La TLC permitió obtener una identificación presuntiva, pero no una confirmación estructural. Por esta razón, las bandas encontradas deben describirse como compatibles con pterosina A y no como una detección definitiva de caudatósido o ptaquilósido. La pterosina A corresponde a un producto de degradación más estable del caudatósido, por lo que su presencia podría indicar que este glucósido estuvo originalmente en la muestra o se

transformó durante el procesamiento. Para confirmar esta interpretación sería necesario utilizar técnicas como HPLC-DAD, LC-MS o LC-MS/MS.

Las placas también mostraron algunas dificultades durante su desarrollo. En ciertos carriles se observó una migración desigual, especialmente en la zona central, lo que generó el denominado efecto sonrisa. Además, algunas bandas presentaron diferencias en color, fluorescencia e intensidad, mientras que el estándar de 3 ppm se visualizó débilmente en determinadas corridas. Estas variaciones pudieron estar relacionadas con la cantidad de extracto aplicada, la saturación de la cámara, la humedad, la complejidad de la matriz vegetal o la concentración reducida del estándar. Estas limitaciones no eliminan el valor de los resultados, pero sí obligan a interpretarlos con cuidado. En este trabajo, la TLC funcionó adecuadamente como una técnica de tamizaje y comparación entre muestras, aunque no tuvo la capacidad suficiente para diferenciar de manera concluyente entre varias pterosinas o metabolitos con desplazamientos semejantes.

Los análisis espectrofotométricos complementaron la evaluación de los extractos, pero tampoco permitieron confirmar una correspondencia exacta con el estándar. Los espectros UV-Visible de las muestras mostraron un comportamiento relativamente parecido entre sí, mientras que el perfil del estándar fue diferente. Algo similar ocurrió con la segunda derivada, donde los promedios de las frondas maduras e inmaduras presentaron mayor semejanza entre ellos que con la pterosina A de referencia. Este resultado indica que los extractos contenían mezclas complejas de sustancias y que la señal de los compuestos de interés pudo encontrarse parcialmente cubierta por otros metabolitos vegetales.

En el componente epidemiológico se comprobó la presencia de HEB en las unidades productivas estudiadas, aunque la proporción de animales afectados fue diferente entre fincas. Esta distribución desigual permite pensar que la enfermedad no depende de un solo factor. La cantidad de helecho presente en los potreros, el tiempo durante el cual los bovinos permanecen expuestos, la disponibilidad de alimento, el estado fenológico de las plantas, el manejo de los animales y la posible presencia de

papilomavirus bovino pueden intervenir de manera conjunta. Por ello, encontrar una finca con abundante helecho no significa necesariamente que todos los animales desarrollarán la enfermedad, así como una señal cromatográfica negativa en una muestra tampoco permite descartar completamente el riesgo de exposición.

La correlación de Spearman no mostró una asociación estadísticamente significativa entre la proporción de muestras con señales compatibles con pterosina A y la prevalencia de HEB. Este resultado no demuestra que la relación entre la toxina y la enfermedad sea inexistente. El análisis se realizó únicamente con tres fincas, por lo que el número de observaciones fue demasiado reducido para obtener una estimación estadística estable. Además, la presencia de valores iguales entre las unidades productivas disminuyó aún más la capacidad de la prueba para identificar una tendencia. En consecuencia, las correlaciones obtenidas deben entenderse solamente como resultados descriptivos y no como evidencia suficiente para aceptar o rechazar una relación biológica entre la exposición al helecho y la enfermedad.

En términos generales, el estudio permitió comprobar que las poblaciones de *Pteridium* forman parte del entorno habitual de las fincas evaluadas y que sus frondas contienen compuestos capaces de producir perfiles cromatográficos semejantes al de la pterosina A. La mayor frecuencia de estas señales en los ejemplares inmaduros demuestra la importancia de considerar el estado fenológico durante la recolección y el análisis de las muestras. Al mismo tiempo, los resultados muestran que la HEB es una enfermedad compleja, cuyo comportamiento no puede explicarse únicamente por la presencia o ausencia cualitativa de una banda en una placa cromatográfica.

El principal aporte de esta investigación fue generar información botánica, química y epidemiológica de una zona en la que existían pocos datos sobre la presencia de toxinas de *Pteridium* y su posible relación con la HEB. También permitió identificar las principales dificultades metodológicas que deberán corregirse en futuros estudios. Será necesario ampliar el número de fincas y animales,

realizar muestreos durante diferentes épocas del año, cuantificar los glucósidos iludanos mediante técnicas instrumentales más específicas, confirmar molecularmente la identidad del helecho y evaluar otros factores relacionados con el manejo del ganado y la presencia de agentes virales. De esta manera, será posible establecer con mayor precisión el nivel de exposición de los animales y comprender mejor la participación del helecho en la presentación de la enfermedad dentro de Peñaherrera.

Recomendaciones.

Fortalecer la identificación taxonómica del material vegetal, esto utilizando preparación adecuada para ejemplares de referencia, usualmente en herbarios. De tal modo que, se puedan emplear técnicas genéticas o moleculares para poder corroborar adecuadamente que la especie muestreada, corresponde definitivamente a *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn. Aun cuando la identificación se la realizó a nivel macroscópico y microscópico.

Se recomienda cambiar la técnica cromatográfica. Generalmente las toxinas son muy susceptibles a cambios ambientales y, por ende, su estabilidad se ve sumamente comprometida; adicionalmente, las concentraciones en términos generales son incluso, hasta en trazas, dicho esto, compromete a que, la investigación carezca de robustez y, por ende, los resultados no son concluyentes.

Es importante realizar un estudio muestral mucho más amplio, de tal modo que se obtengan datos generales, específicos y por caso. Debido a que la mayoría de las vacas se encuentran en libre pastoreo, la situación se ve comprometida al momento en que se generaliza y no se estratifica el estudio, por ende, los sesgos están altos.

Bibliografía

Ahmed, I., Jimoh, A. M., Ibrahim, H., & Khadijat, A. (2024). Phytochemical screening, GC-MS analysis of the methanolic extract of bracken fern (Pteridium aquilinum). *Bima Journal of Science and Technology*.

Ajah, O., Obike, C., Uhuo, E., Chukwu, C., Anyiam, P., Alaebo, P., . . . Okechukwu, J. (2026). Antihyperglycemic effect, antioxidant and dipeptidyl peptidase 4 inhibitory potential of Pteridium acquilinum flavonoids rich extract. *Discover Chemistry*.

Alonso-Amelot, M. E., & Avendaño, M. (2002). Human carcinogenesis and bracken fern: a review of the evidence. *Current medicinal chemistry*, 675-686.

Amouzgar, L., Ghorbani, J., Shokri, M., Marrs, R. H., & Alday, J. G. (2023). A regional assessment of the Pteridium aquilinum growth and phenology: a case study in Southwestern Asia. *Landscape and Ecological Engineering*, 137-150.

Aranha, P., Rasmussen, L., Wolf-Jäckel, G., Jnesen, H., Hansen, H., & Friss, C. (2019). Fate of ptaquiloside—A bracken fern toxin—In cattle. *PLoS ONE*, 14 (6).

Borena, B., Sarba, E., Eteya, W., Feyissa, N., Bayu, M., Kebede, B., & Tola , G. (2025). Assessment of the occurrence of bracken fern (Pteridium aquilinum) poisoning in cattle and management practices in Cheliya, Jibat, and Dire Inchini districts of West Shewa Zone, Oromia, Ethiopia. *Ethiopian Veterinary Journal*, 91-115.

Cácares-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*, 290-295.

Calderón Tobar, Á., Marrero Faz, E., Bulnes Goicochea, C., & Silva, J. (2015). Diagnóstico epidemiológico y clínico de la hematuria enzoótica bovina en la provincia Bolívar, Ecuador. *Revista de Investigación Talentos*, 1-15.

Calderón, Á., Mancebo, B., Sánchez, L., Chiriboga, X., Lucero, D., & Marrero, E. (2013). Niveles de ptaquilósido en muestras de leche bovina en granjas de San Miguel de Bolívar, provincia Bolívar, Ecuador. *Revista de Salud Animal*.

Carvalho, T., Carvalho, A., Zanuncio, J., de Oliveira, M., Machado, E., José, A., . . . Pereira, I. (2022). Does invasion by Pteridium aquilinum (Dennstaedtiaceae) affect the ecological succession in Atlantic Forest areas after a fire? *Environmental Science and Pollution Research*.

Chenard, M. G., Paes, J., Pereira, J., Ramos, L., Pérez, Y., Russano, K., . . . Helayel, M. (2025). Diagnosis of enzootic bovine hematuria: Comparative performance of endoscopy and ultrasound in naturally occurring cases. *The Veterinary Journal*.

Clauson-Kaas, F., Hansen, H., & Strobel, B. (2016). UPLC-MS/MS determination of ptaquiloside and pterosin B in preserved natural water. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 7981-7990.

de Oliveira, L., Boabaid, F., Kisielius, V., Rasmussen, L., Buroni, F., Lucas, M., . . . Riet-Correa, F. (2020). Hemorrhagic diathesis in cattle due to consumption of Adiantopsis chlorophylla (Swartz) Fée (Pteridaceae). *Toxicon*.

Ershova, E. (2012). Anthropogenic transformation in suburban communities with the participation of the bracken fern (Pteridium pinetorom) in the herbage. *Flora of Asian Russia 2 (10)*, 132-138.

Esclava-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.

Feito, I., Peña, E., Sierra, L., Alvarez, J., Rodríguez, M., Barredo, B., . . . Fernández, H. (2026). Environmental exposure to bracken-derived carcinogenic compounds: A multidisciplinary assessment in northern Spain. *Environmental Research*.

García-Jorgensen, D., Diamantopoulos, E., Kisielius, V., Rosenfjeld, M., Rasmussen, L., Strobel, B., & Hansen, H. (2021). Bracken growth, toxin production and transfer from plant to soil: A 2-year monitoring study. *Environmental Sciences Europe*.

Ghorbani, J., Cox, E. S., Alday, J. G., Santana, V. M., Lee, H., McAllister, H. A., . . . Marss, R. H. (2025). What happens when you turn weed management off? A long-term appraisal of the effectiveness of Pteridium aquilinum (L.) kuhn control treatments and the role of sheep grazing. *Journal of Environmental Management*.

Gil da Costa, R., Povey, A., Medeiros-Fonseca, B., Ramwell, C., O'Driscoll, C., Williams, D., . . . Mason, J. (2024). Sixty years of research on bracken fern (Pteridium spp.) toxins: Enviromental exposure, health risks and recommendations for bracken fern control. *Environmental Research*, 257-267.

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: an official journal of the Society of Toxicology*, 60-71.

Guo, J., Ma, Y., Huang, H., Liu, J., Peng, C., & Shu, J. (2025). stablishment and application of a rapid identification strategy for pterosins using UPLC-QTOF-MS/MS techniques. *Journal of Chromatography A*.

Hao, J., Liu, X., Chen, N., & Zhu, A. (2021). olid-phase extraction followed by direct TOF-MS-MS and HPLC analysis of ptaquiloside in Pteridium aquilinum from different places of China. *Journal of Food Composition and Analysis,*.

Holland, J., & Aplin, P. (2013). Super-resolution image analysis as a means of monitoring bracken (Pteridium aquilinum) distributions. *ISPRS Journal of Photoframmetry and Remote Sensing*, 48-63.

Hoseito. (9 de Junio de 2026). *Plantas Silvestres de España*. Obtenido de Hoseito.com: https://hoseito.com/producto/pteridium-aquilinum-subsp-aquilinum-l-kuhn-in-kerst/

Hughes, C., Lehner, F., Dirikolu, L., Harkins, D., Boyles, J., Mcdowell, K., . . . Baskin, S. I. (2003). A Simple and Highly Sensitive Spectrophotometric Method for the Determination of Cyanide in Equine Blood. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 129-138.

Jannat, S., Balupuri, A., Ali, M., Hong, S., Choi, C., Ku, J., . . . Park, G. (2019). Inhibition of β-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 and cholinesterases by pterosins via a specific structure–activity relationship with a strong BBB permeability. *Experimental & Molecular Medicine*.

Kato-Noguchi, H., & Kato, M. (2026). Pteridium aquilinum (L.) Kuhn—A Review of Its Toxicology, Pharmacology, and Phytochemistry. *Plants*, 469.

Keskin, F., Noone, H., Dickman, M., Allen, E., Mulcrone, W., Rasmussen, L., . . . Williams , D. (2025). The bracken fern carcinogen, ptaquiloside, forms a guanine O^6-adduct in DNA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1053-1061.

Kim, M. K., Kang, J. S., Kundu, A., Kim, H. S., & Lee, B. M. (2023). Risk Assessment and Risk Reduction of Ptaquiloside in Bracken Fern. *Toxics*, 115.

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*.

Kowalska, T., & Sajewicz, M. (2022). Thin-layer chromatography (TLC) in the screening of botanicals—Its versatile potential and selected applications. *Molecules*.

López, C. L., Mayta, C., Naoki, K., Quezada, J. A., Hensen, I., & Gallegos, S. (2022). Bracken fern does not diminish arbuscular mycorrhizal fungus inoculum potential in tropical deforested areas. *Mycorrhiza*, 123-131.

Loresco, M., Chapman, D., & Cousens , R. (2004). ranslocation of $^{14}CO_2$ and ^{14}C-deoxyglucose in bracken (Pteridium esculentum Forst. f. Cockayne): Implications for herbicide efficacy. *The Philippine Agricultural Scientist*, 417-426.

Lu, J., Peng, C., Cheng, S., Liu, J., Ma, Q., & Shu, J. (2019). Four new pterosins from Pteris cretica and their cytotoxic activities. *Molecules*.

Magdalena, M., Bolaños, P., Morales, A., Almeida, R., & Vaerla, J. (2025). *Plan de desarrollo y ordenamiento territorial GAD parroquial Peñaherrera.* Peñaherrera - Cotacachi: GAD parroquial Peñaherrera.

Malík, M., Mika, O., Navrátilová, Z., Killi, U., Tlustos, P., & Patocka, J. (2024). Health and Environmental Hazards of the Toxic Pteridium aquilinum (L.) Kuhn (Bracken Fern). *Plants MDPI (Vol. 13, Issue 1)*.

Marrero Faz, E., & Calderón Tobar, Á. (2012). Plantas tóxicas e inocuidad alimentaria: Hematuria enzoótica bovina por Pteridium spp. *Revista de Salud Animal*, 1-15.

Marss, R., & Watt, A. (2006). Biological flora of the Bristish Isles: Pteridium alquilinum (L.) Kuhn. . *Journal of Ecology (Vol.94, Issue 6)*, 1272-1321.

Medeiros-Fonseca, B., Abreu-Silva, A. L., Medeiros, R., Olivera, P. A., & Gil da Costa, R. M. (2021). Pteridium spp. and bovine papillomavirus: partners in cancer. *Frontiers in Veterinary Science*, 8.

Mejía Pacheco, L., & Malo Cevallos, I. (2020). Diagnóstico de la incidencia de Hematuria Enzoótica Bovina de bovinos en producción de tres zonas ganaderas. *Revista Metropolitana de Ciencias aplicadas (Vol 3)*, 76-86.

Micheloud, J., Colque-Caro, L., Martínez, O., Gimeno, E., da Silva Freitas, D., & Blanco, B. (2017). Bovine enzootic haematuria from consumption of Pteris deflexa and Pteris plumula in northwestern Argentina. *Toxicon*, 26-29.

Odriozola, E. (2012). Hematuria enzoótica bovina y helecho macho (Pteridium aquilinum). *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, 25-37.

Otgonsugar, P., Undrakhbayar, T., & Byambajav, T. (2018). Determination of ptaquiloside in Pteridium aquilinum (L.) Kuhn. *Mongolian Journal of Agricultural Sciences*, 37-42.

Park, H., Cho, Y., Lee, J., 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*.

Peregrym, M., Turisová, I., & Turis, P. (2024). A new insight on the genus Pteridium (Dennstaedtiaceae) in Europe based on a revision in the flora of Slovakia. *Botanical Studies 65(1)*.

Pereira, J., Chenard, M., Valle, M., Caldas, S., Carvalho, V., Aguiar Junior, M., . . . Helayel, M. (2022). Bovine enzootic hematuria in the state of Tocantins and use of ultrasonography as a diagnostic method. *Acta Veterinaria Brasilica*, 90-94.

Pinzón, R. S., & Rubiano, A. R. (2006). Estudio preliminar de Pteridium aquilinum: Constituyentes químicos y acción toxicológica. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 31-35.

Pitchakarn, P., Inthachat, W., Karinchai, J., & Temviriyanukul, P. (2021). Human hazard assessment using Drosophila wing spot test as an alternative in vivo model for genotoxicity testing—A review. *International Journal of Molecular Sciences*.

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*, 31-36.

Ramírez-Trejo, M., Pérez-García, B., Mendoza-Ruiz, A., Valdez-Ávila, R., & Espinosa-Matias, S. (2013). Observations of the spore, gametophyte and young sporophyte of Pteridium caudatum (L.) Maxon using scanning electron microscopy. *Micron*, 37-44.

Ribero, D., & Soto-Blanco, B. (2020). Intoxicação por plantas do gênero Pteridium (Dennstaedtiaceae) em animais de produção. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*, 90-107.

Rincón, D., Díaz, G., & Gardner, D. (2016). Detection of Ptaquilosides in different phenologic stages of Bracken fern (Pteridium aquilinum) and analysis of mik samples in farms with hematuria in Tolima, Colombia. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 11.

Rodríguez-Salazar, M., & Chacón-Villalobos, A. (2023). Ptaquiloside biotoxin in ferns of the genus Pteridium. *Agronomia Mesoamericana (Vol. 34)*.

Roos, K., Rollenceck, R., Peters, T., Bendix, J., & Beck, E. (2010). Growth of tropical bracken (Pteridium arachnoideum): Response to weather variations and burning. *Invasive Plant Science and Management*, 402-411.

Schlegel, J., & Riesen, M. (2021). Bracken fern (Pteridium aquilinum (L.) Kuhn) overgrowth on dry Alpine grassland impedes Red List Orthoptera but supports local orthopteran beta diversity. *Journal of Insect Conservation*, 657-669.

Schuettpelz, E., Schneider, H., Smith, A., Hovenkamp, P., Prado, J., Rouhan, G., . . . Zhou, X. (2016). A community-derived classification for extant lycophytes and ferns. . *Journal of Systematics and Evolution 54 (6)*, 563-603.

Sheidai, M., Alaeifar, M., & Koohdar, F. (2026). Computational analysis and modeling of climate impact on Pteridium aquilinum (L.) populations. *Scientific Reports*.

Sierra, L. M., Feito, I., Rodríguez, M. L., Velásquez, A., Cué, A., San-Juan-Guardado, J., . . . Majada, J. (2025). Toxic Threats from the Fern Pteridium aquilinum: A Multidisciplinary Case Study in Northern Spain. *International jorunal of molecular sciences*.

Sokolova, G. G. (2023). Biological reserves of bracken fern (Pteridium Aquilinum (L.) Kuhn.) in the coniferous forests of Altai Territory. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 1229.

Štefanić, E., Japundžić-Palenkić, B., Antunović, S., Gantner, V., & Zima, D. (2022). Botanical characteristics, toxicity and control of bracken fern (Pteridium aquilinum (L.) Kuhn). *Veleuc. Rij (Vol. 10)*, 467-478.

University of Oxford. (8 de Junio de 2026). *The Brahms Project*. Obtenido de Herbaria plants : https://herbaria.plants.ox.ac.uk/bol/plants400/Profiles/OP/Pteridium

Velazco, S., Brandt, J., Zaiats, A., Requena-Mullor, J., Pillaca, K., Choza, B., & Caughlin, T. (2024). Hotter, drier climate influences tropical tree cover loss and promotes bracken fern dominance within arrested successional patches in Andean cloud forests. *Biological Conservation*.

Verde, G., García, M., Chavera, A., Gonzáles, C., & Falcón, N. (2017). Diagnóstico clínico de la hematuria vesical enzoótica bovina por urianálisis de la provincia de Oxapampa, Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 522-529.

Vetter, J. (2022). The norsesquiterpene glycoside ptaquiloside as a poisonous, carcinogenic component of certain ferns. *Molecules*.

Wolf, P., Rowe, C., Kinosian, S., Der, J., Lochkart, P., Shepherd, L., . . . Thomson, J. (2019). Worldwide relationships in the fern genus Pteridium (bracken) based on nuclear genome markers. *American Journal of Botany*.

Zaccone, C., Cavoski, I., Costi, R., Sarais, G., Caboni, P., Traversa, A., & Miano, T. M. (2014). Ptaquiloside in Pteridium aquilinum subsp. aquilinum and corresponding soils from the South of Italy: Influence of physical and chemical features of soils on its occurrence. *Science of the Total Environment*, 365-372.

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*, 1-8.