

ARTÍCULO ORIGINAL

Residualidad del ptaquilósido en la leche procedente de granjas bovinas en tres cantones de la provincia Bolívar, Ecuador

Ángela Calderón Tobar^I, Luz María Sánchez^{II}, Betty Mancebo^{II}, Evangelina Marrero^{II},
Ximena Chiriboga^{III}, José Silva^{IV}

^IUniversidad Estatal de Bolívar, Avenida Che Guevara s-n y Gabriel Secaira Guaranda-Ecuador.

Correo electrónico: www.ueb.edu.ec, acalderon@ueb.edu.ec. ^{II}Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. ^{III}Universidad Central del Ecuador, Ciudadela Universitaria, Av. América, Quito, Ecuador. ^{IV}Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca- Guaranda (MAGAP-G).

RESUMEN: En diferentes regiones ganaderas del mundo y en particular de América Latina, se ha reportado la invasión de helechos tóxicos correspondientes al Género *Pteridium*, contenido del norsesquiterpeno ptaquilósido, que afectan negativamente la crianza animal vacuna y que supone un riesgo potencial para el humano por los residuos de este componente tóxico de la planta, en la carne y la leche. El objetivo del presente trabajo consistió en determinar la residualidad del tóxico ptaquilósido en la leche de bovinos, procedentes de tres cantones de la provincia Bolívar, Ecuador, mediante cromatografía líquida de alta resolución. Las muestras de leche fueron colectadas de granjas invadidas por helechos *Pteridium arachnoideum* (Kaulf.) Maxon localizadas a diferentes altitudes. Los resultados obtenidos mostraron la presencia de niveles residuales del ptaquilósido en el 89,29% de las muestras analizadas, con concentraciones máximas obtenidas en Chimbo de 2641,13 µg/ml, en San Miguel de Bolívar de 2219,67 µg/ml y en Echeandía de 2130,12 µg/ml. Considerándose que este tóxico es causante de producir cáncer gástrico en los humanos, se estimó que los consumidores de leche fresca en el cantón Chimbo estarían ingiriendo una concentración promedio de ptaquilósido de 894,13 mg/0,5 l/día de leche fresca. De los resultados puede inferirse el alto riesgo que representa para la salud humana, contraer cáncer gástrico, por el consumo reiterado de leche con residuos tóxicos (ptaquilósido), con énfasis en los sectores rurales expuestos.

Palabras clave: *Pteridium arachnoideum*, ptaquilósido, residualidad en leche bovina, CLAR.

Ptaquiloside residual level in milk from bovine farms in three cantons of the of Bolívar Province, Ecuador

ABSTRACT: In different agricultural regions of the world, particularly in Latin America, a toxic fern invasion of the gender *Pteridium*, referring to the norsesquiterpeno ptaquiloside, has been reported. They adversely affect animal husbandry, presenting a potential risk to humans due to the residuals of this toxic component in the plant, in meat and milk. The aim of this study was to determine the ptaquiloside toxic residuality in bovine milk from three cantons of the Bolivar province, Ecuador, by high resolution liquid chromatography. Milk samples were collected from farms invaded by the ferns *Pteridium arachnoideum* (Kaulf.) Maxon located at different altitudes. The results showed the presence of ptaquiloside residual levels in the 89.29% of the samples analyzed, with maximum concentrations obtained in Chimbo (2641.13 µg/ml), in San Miguel de Bolívar (2219.67 µg/ml) and in Echeandía (2130.12 µg/mL). Considering that this is the cause of producing toxic gastric cancer in humans, it was estimated that the consumers of fresh milk in the canton Chimbo could be consuming a ptaquiloside mean concentration of 894.13 mg/0.5 l/day of fresh milk. From these results, the high risk to humans health of having gastric cancer can be inferred, due to the repeated consumption of milk with toxic residuals (ptaquiloside), emphasizing the rural sectors exposed.

Key words: *Pteridium arachnoideum*, ptaquiloside, residual level in bovine milk, HPLC.

INTRODUCCIÓN

La necesidad de alimentos de origen animal para satisfacer los requerimientos nutricionales del hombre, no solamente demanda del incremento en cantidad y calidad nutritiva de estos a partir de una explotación comercial correcta de las especies animales involucradas, si no también que se tenga presente en estas crianzas la ingestión de alimentos seguros, desprovistos de sustancias nocivas para los propios animales y consecuentemente para la Salud Humana (1). El interés creciente por el conocimiento de los tóxicos naturales, ha cobrado fuerza en la actualidad y constituye, hoy en día, uno de los aspectos más relevantes de la toxicología veterinaria moderna que ocupa la atención de numerosos productores, científicos, docentes, personal de la Salud Humana y directivos de las instituciones regulatorias (2,3,4). Existen plantas que al ser ingeridas de manera directa por los animales y el hombre pueden comprometer seriamente la salud de estos, causando cuadros clínicos de intoxicaciones que no siempre se manifiestan de manera repentina (tóxicosis aguda); o de forma solapada, produciendo daños a más largo plazo, con cuadros clínicos de tóxicosis crónicas (2,3,4,5).

Pteridium aquilinum, bracken fern o helecho macho, se considera la quinta planta más abundante del planeta presente en todos los continentes, excepto, en la Antártica (6), que en presencia de adecuada humedad coloniza de forma agresiva áreas abiertas progresando hasta establecerse como planta predominante (7,8).

Después de la deforestación y la quema de bosques en el noroeste de Norte América, *Pteridium aquilinum* var. *latifolia* cubrió menos del 1% del área quemada, mientras que en la región tropical del Ecuador el helecho identificado como *Pteridium arachnoideum* (Kaulf.) Maxon cubrió más del 25% de las áreas quemadas (9,10). Estudios botánicos confirman que *Pteridium arachnoideum* (Kaulf.) Maxon es la única especie del género *Pteridium* en Ecuador (11). En los Andes, al Sur del Ecuador, vastas áreas de bosques primarios han sido desbastados mediante quema o tala de maderables para la producción de pastos a utilizar la ganadería. En los primeros años los pastos tuvieron un desarrollo favorable, pero gradualmente los helechos representados por *Pteridium arachnoideum* (Kaulf.) Maxon ocuparon las zonas de pastos, obligando a los campesinos a utilizar el fuego que dañaba mucho menos a los helechos que a los pastos, dejando abandonadas estas áreas, repitiéndose el ciclo nuevamente en otras zonas. En este estudio se evidenció que en la región del sur de los Andes

ecuatorianos, alrededor del 40% de los bosques fueron talados, de ahí el gran dominio de los helechos en estos sitios (12,13,14). Así mismo, en la región central del Ecuador, provincia Bolívar se evidenció el predominio de esta especie en las zonas ganaderas subtropicales, afectando la salud de los bovinos con toxicosis crónica conocida como Hematuria Enzoótica Bovina (HEB) (15), la cual se debe al consumo reiterado de helechos *Pteridium arachnoideum* (Kaulf.) Maxon (anteriormente *P. aquilinum*) contentivo del compuesto carcinogénico ptaquilósido, que causa cáncer a los rebaños vacunos expuestos al pasto contaminado con dicha planta (16).

La concentración del norsesquiterpeno ptaquilósido (Pt) en la planta resulta elevada, según reportan otros autores (17,18). En el organismo, el ptaquilósido (Pt) bajo condiciones de alcalinidad la pérdida de la glucosa da lugar a la formación de una dienona intermedia, la cual posee un anillo ciclopropilo altamente reactivo capaz de reaccionar con macromoléculas celulares (19). Este compuesto carcinogénico se excreta por la leche según se ha reportado, por lo que su ingestión constituye un riesgo a la salud humana (20,21). Una asociación entre el consumo de helechos y el cáncer en los humanos ha sido previamente demostrada (22). Las principales vías de exposición incluyen la ingestión como alimento de los helechos frescos (retoños); beber leche o agua contaminada con ptaquilósido y la inhalación de aire que contienen las esporas de los helechos. Estas exposiciones pueden llevar a un aumento de la incidencia de cáncer gástrico y de esófago en los humanos (23,24). Además, el ptaquilósido se transfiere de la vegetación de helechos al suelo adyacente y a las aguas subterráneas; para así contaminar el agua potable (25,26). Los residuos de ptaquilósido en la leche pueden ser una ruta importante para la exposición humana en las poblaciones rurales que consumen leche directamente de vacas intoxicadas con los helechos (17), por lo que es de gran interés realizar investigaciones que permitan evaluar el riesgo potencial que supone para la salud humana el consumo de leche procedente de animales con HEB o expuestos al consumo de la planta (15,27,28). El presente trabajo tiene como objetivo determinar la residualidad del tóxico ptaquilósido en leche de bovinos procedentes de tres cantones de la provincia Bolívar, Ecuador.

MATERIALES Y MÉTODOS

Zonas de estudio: La investigación se desarrolló en fincas ganaderas de pequeños productores ubicadas en los cantones de Chimbo, San Miguel y Echeandía de la provincia Bolívar, Ecuador.

Se estudiaron 18 granjas de producción bovina, durante el período de junio a julio de 2011. Los animales eran mestizos, doble propósito, con sistema de producción extensivo, a base de pastos naturales donde existía la presencia (60 a 100%) de helechos *Pteridium arachnoideum* (Kaulf.) Maxon en las zonas de pastoreo.

La Provincia Bolívar está situada en el Centro-Oeste del Ecuador. La provincia cuenta con siete cantones: Caluma, Chillanes, Chimbo, Echeandía, Guaranda, Las Naves y San Miguel. Posee la variedad de pisos climáticos existentes en la región interandina; es decir, comenzando por el tropical monzón, pasando por el mesotérmico húmedo y semihúmedo, hasta el páramo de las altas mesetas andinas, comparten zonas con temperaturas frías a subtropicales que oscilan entre los 8°C a 25°C; altitud general desde 300 m.s.n.m hasta los 2668 m.s.n.m. La producción agropecuaria es la base económica de estos cantones, la ganadería tiene un menor volumen de producción y está orientada a la producción de ganado de carne y leche (29).

Muestras de leche: Para colectar las muestras de leche (100 ml) se seleccionaron granjas ganaderas que presentaron invasión de *P. arachnoideum*, con y sin la presencia de signos clínicos evidentes de HEB, considerando las normas establecidas por la Universidad Central del Ecuador. Se muestreó el 15% del total de bovinos por cada granja (n=84). Se realizó la recolección de las muestras de forma individual, en frascos de vidrio color ámbar debidamente identificados, a través del ordeño manual en las primeras horas de la mañana. Estas muestras fueron conservadas en condiciones refrigeradas (sin pasteurizar) para posteriormente ser procesadas en el laboratorio. Las granjas muestreadas estaban ubicadas a una altitud de 2210 a 778 m.s.n.m.

Obtención de la sustancia de referencia: La sustancia de referencia (**Pterosina B**) se obtiene a partir de muestras de helechos *Pteridium arachnoideum* (Kaulf.) Maxon colectadas en la provincia Bolívar y llevadas al laboratorio de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Estatal de Bolívar en Guaranda y al laboratorio de Fitoquímica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador en Quito, mediante la extracción y purificación de la pterosina B, con un 90% de pureza comparado con un estándar de referencia.

Desarrollo del método por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) para determinar los niveles de residualidad de ptaquilósido en muestras de leche: Se desarrolló un método analítico por CLAR siguiendo la metodología de Alonso-

Amelot *et al.* (30) con algunas modificaciones. Una alícuota de 25 ml de cada muestra de leche fresca, fue tratada con 40 ml de metanol con calentamiento a temperatura de 37°C y agitación durante 30 min., lo que posibilita la precipitación de las proteínas. A continuación la suspensión se filtró y se centrifugó a 3000 rpm durante 15 min. Consecutivamente, el sobrenadante se trató con 25 ml de acetonitrilo para lograr la precipitación de lípidos, se centrifugó desechando el precipitado (lípidos y proteínas) y ulteriormente al sobrenadante se le añadió 1 g de cloruro de sodio. Se procedió a la extracción con diclorometano para eliminar las grasas. La fase acuosa fue tratada con hidróxido de sodio (0.003 N) hasta pH básico D11, logrando la conversión a pterosina B. Se agitó a 36°C durante 2 horas. Se realizó una segunda extracción con diclorometano (3 veces x 15 ml), procediendo al secado del extracto orgánico a presión reducida a 40°C. Posteriormente se redisolvió en 1 ml de metanol y se colocó en viales muestreadores para su análisis por cromatografía líquida de alta resolución.

Se utilizó un cromatógrafo líquido de alta resolución, ULTIMATE 3000 (DIONEX), Columna Dionex RP 18, 12.5 x 0.4 cm d.i., 40 µ, Temperatura ambiente; modo isocrático con Metanol: Agua (65:35 v/v) como sistema de corrida, inyector de 20 µl; Velocidad de flujo= 1 ml/min, DETECCIÓN Ultravioleta variable a λ=260 nm, con un software CROMELEON. Todos los reactivos utilizados tenían calidad requerida.

Se procesaron dos curvas patrón de pterosina B; la primera osciló en un rango de valores de 1-0.1 µg/ml y la segunda entre 0.1-0.01 µg/ml, para determinar la pendiente, el intercepto y el coeficiente de correlación entre el área y la concentración del analito, además de calcular la desviación estándar del blanco según Quatrocchi *et al.* (31).

Determinación del recobrado, límite de detección y cuantificación: Se procesó una muestra de leche control negativo para ver la especificidad/selectividad del método a la que se le añadió una cantidad conocida de pterosina B (2 mg). Se analizaron tres réplicas por cada muestra de leche. Se siguió el proceso de extracción y cuantificación de manera similar y se determinó el porcentaje de recuperación de este parámetro según la fórmula:

$$\text{Conc. esperada} = \frac{\text{Cant. muestra} + \text{Cant. añadida}}{\text{Vol. muestra} + \text{Vol. añadido}}$$

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{Conc. observada}}{\text{Conc. esperada}} \times 100$$

Sensibilidad (Límite de detección (LD) y de cuantificación (LQ)): Se realizó una curva de calibración para el patrón de pterosina B en el rango en que se encuentra normalmente en las muestras (1- 0,1 mg/ml). Se determinó la pendiente (m) de esta curva de calibración (Concentración vs A o tr) en este rango. Se realizó otra curva de calibración para concentraciones bajas del analito, inyectando cada punto de concentración por triplicado, determinando la ecuación de esta nueva recta ($A = mx \text{ Conc.} + b$) y se extrapoló la respuesta a concentración igual a cero (el área es igual al intercepto b), obteniéndose un estimado de la respuesta del blanco Y_{bl} . Se estableció la desviación estándar (S) para cada punto de la curva, se calculó la recta correspondiente a Concentración (A) vs S, es decir, la ecuación $S = m(A) + b$, y se extrapoló la S a concentración igual a cero, obteniéndose el estimado S_{bl} correspondiente a la desviación estándar del blanco.

Se calculó el LD y el LQ para n' medidas individuales según:

$$LD = \frac{Y_{bl} + 3S_{bl}}{m} \cdot 1/\sqrt{n'}$$

$$LQ = \frac{Y_{bl} + 10S_{bl}}{m} \cdot 1/\sqrt{n'}$$

Procesamiento estadístico de los resultados:

Los resultados obtenidos se analizaron por comparación de medias usando el *Test de Student* con valor de $p < 0,05$ utilizando el programa estadístico EPIDAT 3.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El compuesto tóxico ptaquilósido, obtenido en su forma estable de pterosina B a partir de muestras de helechos *Pteridium arachnoideum* en la Provincia Bolívar, por el método de extracción y purificación llevado a cabo, alcanzó un grado de pureza del 90 % (Figura 1A) lo que se estimó por Cromatografía de Capa Delgada y por CLAR.

El método de CLAR propuesto presentó un límite de detección de 1.95 $\mu\text{g/ml}$ y un límite de cuantificación de 2.47 $\mu\text{g/ml}$, lo que demuestra su sensibilidad en la determinación del ptaquilósido (Pt) de *Pteridium arachnoideum* (Kaulf.) Maxon en las muestras de leche analizadas (Figura 1 B). El recobrado del método tuvo un valor de 89 %. El coeficiente de correlación resultante fue de 0,99. El valor de concentración del ptaquilósido en la muestra fue corregido dividiendo por el factor de recobrado.

La Figura 1 representa los cromatogramas de la sustancia patrón (pterosina B) y de una muestra de leche, donde se aprecia la presencia del ptaquilósido en una elevada concentración y la especificidad del método con la presencia de un pico mayoritario correspondiente al compuesto analizado.

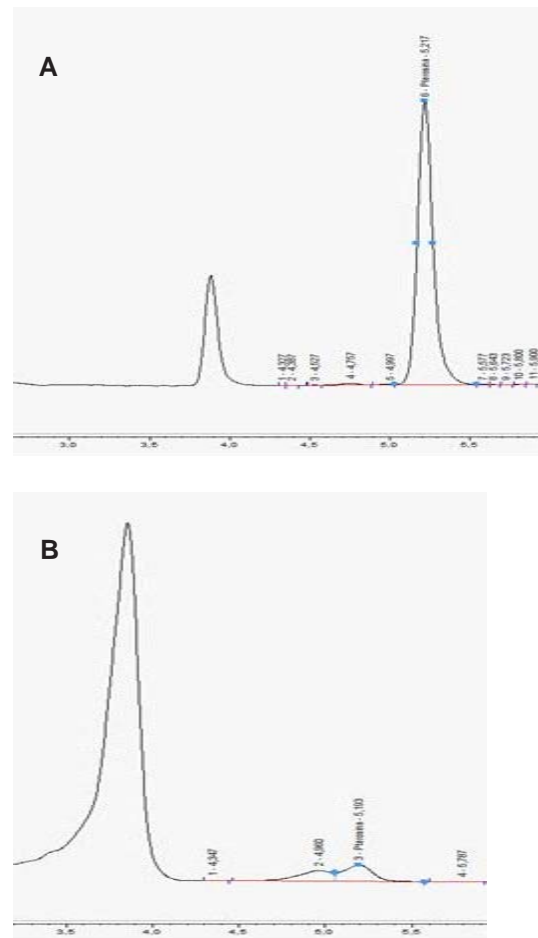


FIGURA 1. Perfil cromatográfico de la sustancia de referencia pterosina B (A) y de una muestra de leche (B) por CLAR./ *Chromatographic profile of pterosine B reference substance (A) and a milk sample (B) by HPLC.*

Estos resultados confirman los reportados por otros autores quienes obtuvieron rangos de pureza semejantes, utilizando métodos de extracción y purificación mediante procesamiento cromatográfico similares al empleado en este trabajo (32,33). La determinación de Pt mediante el metabolito estable pterosina B se establece por el carácter estequiométrico de la conversión, lo que posibilita que la determinación indirecta sea cuantitativa a través de este elemento, además de que

dicha conversión a pterosina B resulta aproximadamente el doble de la respuesta UV, por lo que el límite de detección es menor, venciendo así problemas asociados a la manipulación del Pt (34).

Los niveles de residualidad de ptaquilósido ($\mu\text{g/ml}$) en leche fresca halladas por CLAR reflejan niveles altos en los tres cantones en estudio, observándose diferencias ($p=0.001$) en el Cantón Chimbo con una concentración máxima de Pt de 2641,13 $\mu\text{g/ml}$, en los Cantones de Echeandía y San Miguel con concentraciones de 2130,12 $\mu\text{g/ml}$ y 2219,67 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente, detectándose la residualidad del tóxico en la leche en el 89,29 % del total de las muestras analizadas. Los niveles promedios estuvieron entre 797,73 $\mu\text{g/ml}$ y 1788,26 $\mu\text{g/ml}$. Es importante destacar que la residualidad del tóxico en la leche de bovinos con y sin signos aparentes de HEB, se encontró en todas las fincas analizadas de los tres cantones y a diferentes altitudes (Tabla).

La metodología empleada mostró un adecuado porcentaje de recobrado, que coincide con los reportes de Alonso-Amelot *et al.* (30), lo que incluye un protocolo de purificación de la leche sobre la base de precipitaciones metanol-acetonitrilo, extracciones en hexano y diclorometano, tratamiento alcalino, re-extracción seguido por determinación por CLAR. A pesar que el método resultó idóneo para determinar los elevados niveles de residualidad del elemento tóxico, en la actualidad se ha descrito un novedoso método de determinación de ptaquilósido por CG/Masas con el empleo de bromo-pterocina B como estándar externo, lo que posibilita que aumente la sensibilidad del método para detectar niveles de ptaquilósido en el orden de ppb (parte por billón, pg/g), en muestras de leche de

vaca y de otros animales como ovinos, caprinos y equinos (21,35).

La leche de bovinos que pastan en potreros invadidos por *Pteridium aquilinum* debe considerarse como un posible factor etiológico del cáncer gástrico en los humanos (30). Por otra parte, muchos compuestos químicos que se encuentran presentes en las plantas dañinas pueden afectar la salud humana, no solo por el consumo directo del vegetal, sino a través de la cadena alimentaria al consumir leche y otros productos procedentes de animales intoxicados (32,36). Un aspecto de extrema importancia a tener en cuenta es el asociado a la eliminación del ptaquilósido presente en la leche de las vacas intoxicadas (37), sobre todo en la forma subclínica, donde no se aprecian aún signos clínicos, poniendo en riesgo a los consumidores de contraer cáncer gástrico (24,38,39,40). Los productores ganaderos de estos cantones en estudio al observar sus animales con hematuria (sangre en la orina), algunos los mantienen en sus fincas por mucho tiempo, aplicándoles diferentes tratamientos por el desconocimiento de la HEB, llegando al desmedro del animal y es cuando deciden enviarlos al matadero; pero otros inmediatamente que observan esta sintomatología en sus animales, los venden o envían al matadero para no ser perjudicados económicamente (15).

Para valorar el potencial riesgo a la salud humana que implica el consumo de leche con residualidad del tóxico Pt en los cantones estudiados, en la Figura 2, se refleja que este producto de primera necesidad no es inocuo para los consumidores, ya que al consumir 0,5 l/día de leche fresca, estarían ingiriendo el compuesto tóxico ptaquilósido como promedio de 894,13 mg/0,5 l/día de leche fresca en el Cantón Chimbo. Con-

TABLA. Niveles de residualidad de ptaquilósido ($\mu\text{g/ml}$) en muestra de leche fresca de los Cantones de Chimbo, San Miguel y Echeandía de la Provincia Bolívar, Ecuador. $p=0.001$ ($X \pm DE$). / *Ptaquiloside concentration levels ($\mu\text{g/ml}$) of fresh milk samples from the Cantons Chimbo, San Miguel and Echeandía in Bolívar province, Ecuador. $p=0.001$ ($X \pm DE$).*

Cantones	Muestras de leche fresca	Contenido. Ptaquilósido corregido con factor de recobrado 0,89 ($\mu\text{g/ml}$) en leche fresca. Niveles máximos	Valor promedio de Ptaquilósido ($\mu\text{g/ml}$) en leche fresca.	Desviación Estándar.	Muestras de leche no detectadas		Muestras de leche con residualidad del tóxico
					n	%	%
Chimbo	25	2641,13	1788,26 ^a	882,60	1	4	96
Echeandía	30	2130,12	797,73 ^b	671,01	3	10	90
San Miguel	29	2219,67	805,42 ^b	640,34	5	17,24	82,76
General	84	2641,13	1130,47	852,58	9	10,71	89,29

(a, b) Valores promedios con letras no comunes en el superíndice de la misma columna indican diferencias estadísticas. $p < 0,05$.

siderándose al Pt como el causante de tumores en los animales de granja y también en los humanos (7,8,41,42).

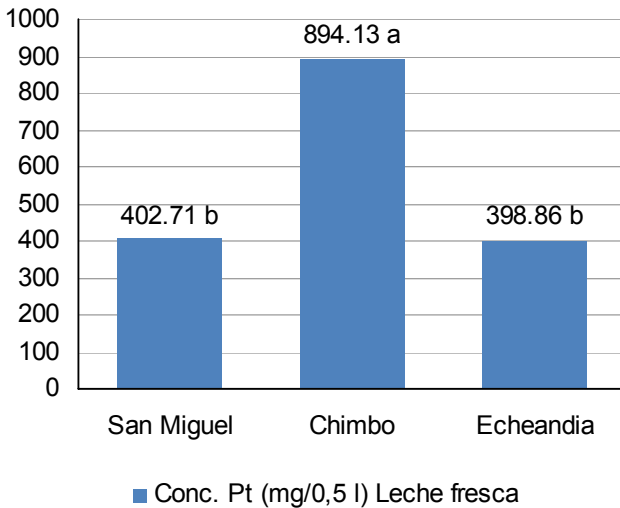


FIGURA 2. Concentración promedio de ptaquilósido (mg/0,5 l de leche fresca). Potencial riesgo a la Salud Humana en los Cantones de San Miguel, Chimbo y Echeandía de la provincia Bolívar- Ecuador. $p = 0.001$. ($X \pm DE$). T Student./ *Ptaquiloside mean concentration (mg/0,5 l of fresh milk). Potential risk to human health in the Cantons San Miguel, Chimbo and Echeandía in Bolívar province, Ecuador. $p = 0.001$. ($X \pm DE$). T Student.*

El compuesto Pt fue descubierto por primera vez en la leche de una vaca alimentada con frondes de helecho fresco (6kg/día), equivalente a 216 mg/día de Pt puro y hallando una cantidad de 0.11 mg/l en la leche fresca (30). Así mismo en otro estudio encontraron en la leche entre 2 y 10 mg/l de este potente carcinógeno (43). Nuestros resultados demuestran que en los tres cantones en estudio los niveles de residualidad de ptaquilósido son muy elevados, en solo 0,5 l de leche fresca.

El Comité Británico de Toxicidad de Químicos en Alimentos, Productos de Consumo y el Ambiente (COT), ha declarado al ptaquilósido como un agente carcinógeno potencial para los humanos a todos los niveles de ingestión (44). Varios estudios han documentado sus efectos genotóxicos como mutagénico y clastogénico que actúa como agente alquilante de la molécula de ADN (6,45,46,47,48,49). Otros autores han evidenciado los efectos citogenéticos como resultado de la inducción de aberraciones cromosómicas en animales afectados, luego del consumo reiterado de esta planta (19,50,51). También estudios recientes descri-

ben el efecto clastogénico, aneugénico e inductor de intercambio de cromátidas hermanas en linfocitos humanos a dosis de Pt de 5, 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$ (52).

CONCLUSIONES

De los resultados puede inferirse el alto riesgo que representa para la salud humana, contraer cáncer gástrico, por el consumo reiterado de leche con residuos tóxicos (ptaquilósido), con énfasis en los sectores rurales expuestos en la provincia Bolívar.

REFERENCIAS

1. Marrero FE, Calderón TA. Plantas tóxicas e inocuidad alimentaria: Hematuria Enzoótica Bovina por *Pteridium* ssp. un problema relevante de salud. *Rev Salud Anim.* 2012;34(3):137-143.
2. Aparicio JM. Intoxicación por *Ageratum houstonianum* Mill. (Celestina azul) en rumiantes. Tesis en opción al grado de Dr. en Ciencias Veterinarias, Universidad Agraria de la Habana, Cuba. 2000.
3. Figueredo MA, Sanchez LM, et al. Residualidad de monocrotalina en músculo de ternero tratado con dosis única de *Crotalaria retusa* (L.) desecada. *Rev Salud Anim.* 2001;23(1):23-26.
4. Marrero Faz E. Plantas Tropicales Medicinales y Tóxicas: Efectos Farmacológicos Experimentales y Toxicosis en Animales. Tesis en Opción al Título de Doctor en Ciencias, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, Universidad Agraria de la Habana, Ministerio de Educación Superior, Cuba. 2008.
5. Marrero FE, Alfonso HA, Fuentes FV, Tablada PR, Sánchez LM, et al. Plantas Tóxicas del Trópico. 3ra Edición, (ed). San Luis, Cuba. 2010; pp 1-438.
6. Gil da Costa RM, Bastos MMSM, Oliveira PA, Lopes C. Bracken-associated human and animal health hazards: Chemical, biological and pathological evidence. *J Hazard Mater.* 2012;203- 204:1-12.
7. Rasmussen LH, Schmidt B, Sheffield E. Ptaquiloside in bracken spores from Britain. *Chemosphere.* DOI. 10.1016/j.chemosphere. 2012;10(092):1879-1298.
8. Rasmussen LH, Schmidt B, Sheffield E. Ptaquiloside in bracken spores from Britain. *Chemosphere.* 2013;90(10):2539-2541.

9. Gliessman SR. The establishment of bracken following fire in tropical habitats. *Am Fem J.* 1978;68:41-44.
10. Roos KR, Peters RT, Bendix J, Beck E. Growth of Tropical Bracken (*Pteridium arachnoideum*): Response to Weather Variations and Burning. *Invasive Plant Science and Management.* 2010;3:402-211.
11. Navarrete H, León B, Gonzales J, Aviles DC, Salazar J, Mellado F, et al. Helechos. *Botánica Económica de los Andes Centrales.* Universidad Mayor de San Andrés, La Paz. 2006. p 385-411.
12. Hartig K, Beck E. The Bracken fern (*Pteridium arachnoideum* (Kaulf.) Maxon) dilemma in the Andes of Southern Ecuador. *Ecotropica.* 2003;9:3-13.
13. Stewart G, Cox E, Le Duc M, Pakeman R, Pullin A, Marrs R. Control of *Pteridium aquilinum*: meta-analysis of a multi-site study in the UK. *Ann Bot.* 2008;101(7):957-970.
14. Göttlicher D, Obregon A, Homeier J, Rollenbeck R, Nauss T, Bendix J. Land-cover classification in the Andes of tropical Ecuador using Landsat ETM+ data as a basis for STAV modeling. *Int. J Remote Sens.* 2009;30:1867-1886.
15. Calderón A, Marrero E, Murillo V, Vega V. Reporte de casos de Hematuria Enzoótica Bovina por ingestión de *Pteridium arachnoideum* en la región ganadera de San Miguel de Bolívar, Ecuador. *Rev Salud Anim.* 2011;33(3):197-202.
16. Smith BL, Seawright AA. Bracken fern (*Pteridium* spp.) carcinogenicity and human health-a brief review. *Nat Toxins.* 1995;3(1):1-5.
17. Vetter J. A biological hazard of our age: bracken fern [*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn]-a review. *Acta Vet Hung.* 2009;57(1):183-196.
18. Fletcher WT, Brock IJ, Reichmann KG, McKenzie RA, Blaney BJ. Norsesquiterpene glycosides in bracken ferns (*Pteridium esculentum* and *Pteridium aquilinum* subsp. *wightianum*) from eastern Australia: Reassessed poisoning risk to animals. *J Agric Food Chem.* 2011;59(9):5133-5138.
19. Roperto S, Borzacchiello G, Brun R, Leonardi L, Maiolino P, Martano M. A review of bovine urothelial tumours and tumour-like lesions of the urinary bladder. *J Comp Pathol.* 2010;142:95-108.
20. Villalobos-Salazar J. Carcinogenicity of *Pteridium aquilinum* and high incidence of gastric cancer in Costa Rica. *Rev Costarric Cienc Med.* 1985;6:131-139.
21. Bonadies FG, Berardi R, Nicoletti R, Saverio RF, Francesco DG, Romano M, et al. A new very sensitive method of assessment of ptaquiloside, the major bracken carcinogen, in the milk of farm animals. *Food Chem.* 2011;124(2):660-665.
22. Alonso-Amelot ME, Castillo U, Smith BL, Lauren DR. Excretion through milk, of ptaquiloside in bracken-fed cows. A quantitative assessment. *Lait.* 1998;78:413-423.
23. Marliere CA, Wathern P, Freitas SN, Castro MCFM, Galvao MAM. Bracken fern (*Pteridium aquilinum*) consumption and oesophageal and stomach cancer in the Ouro Preto region, Minas Gerais, Brazil. In: Taylor JA, Smith RT (Eds) Bracken fern, toxicity, biology and control. International Bracken Group Special Publication No 4, Manchester, UK. 2000. pp 144.
24. Alonso-Amelot ME, Avendaño M. Human carcinogenesis and bracken fern: a review of the evidence. *Curr Med Chem.* 2002;9(6):675-686.
25. Rasmussen LH, Kroghsbo S, Frisvad JC. Occurrence of the carcinogen bracken constituent ptaquiloside in fronds, topsoils and organic soil layers in Denmark. *Chemosphere.* 2003;51:117-127.
26. Rasmussen LH, Jensen LS, Hansen HCB. Distribution of the carcinogenic terpene ptaquilósido in bracken fronds, rhizomes (*Pteridium aquilinum*), and litter in Denmark. *J Chem Ecol.* 2003;29:771-778.
27. Hartig K, Beck E. The bracken fern (*Pteridium arachnoideum* (Kaulf.) Maxon). Dilemma in the Andes of southern Ecuador. *Ecotropica.* 2003;9:3-13.
28. Sharma R, Bhat TK, Sharma OP. The environmental and human effects of ptaquiloside-induced enzootic bovine hematuria: a tumorous disease of cattle. *Rev Environ Contam Toxicol.* 2013;224:53-95.

29. Gobierno Provincial de Bolívar: Situación Geográfica. [en línea] <http://www.gobiernodebolivar.gob.ec/> 2013. [Consultado: 03/20/2013].
30. Alonso-Amelot ME, Castillo U, Jongh FD. Passage of the bracken fern carcinogen ptaquiloside into bovine milk. *Lait*. 1993;73:323-32.
31. Quattrocchi OA, Abelaira S, Laba RF. Introducción al HPLC Aplicación y Práctica Buenos Aires: Artes Gráficas. 1992; pp 302-28.
32. Rasmussen LH. Ptaquiloside- an environmental Hazard?. Ocurrance and fate of a bracken (*Pteridium* sp) toxin in terrestrial environments. Tesis conducud under the Ph.D. Programme for Natural Sciences at the Royal Veterinary and Agricultural University. 2003.
33. Rasmussen LH, Lauren D, Smith B, Hansen HCB. Variation in ptaquiloside content In bracken (*Pteridium esculentum* (Forst. f) Cockayne) in New Zealand. *N Z Vet J*. 2008;56(6):304-309.
34. Attya M, Nardi M, Tagarelli A, Sindona G. A new facile synthesis of d(4)-pterosin B and d(4)-bromopterosin, deuterated analogues of ptaquiloside. *Molecules*. 2012;17(5):5795-5802.
35. John Wiley & Sons, Ltd (Ed). Mass spectrometric analysis of ptaquiloside, the toxic sesquiterpene from bracken fern. *Rapid communications in mass spectrometry*. 2004;18:825-828. [Published online] in Wiley Inter Science. <http://www.interscience.wiley.com>. DOI: 10.1002/rcm.1410.
36. De Luca TH, Zewdie SA, Zackrisson O, Healey JR, Jones DL. Bracken fern (*Pteridium aquilinum* L. kuhn) promotes an open nitrogen cycle in heathland soils. *Plant and Soil*. 2012. [en línea]. <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-012-1484-0>.
37. Alonso-Amelot ME. The link between Bracken fern and stomach cancer: milk. *Nutrition*. 1997;13:694-696.
38. Alonso-Amelot ME, Castillo UF, Avendaño M, Smith BL, Lauren DR. Milk as a vehicle for the transfer of ptaquiloside: a Bracken carcinogen. In: Taylor JA and Smith RT. (Eds.) *Bracken Fern: Toxicity, Biology and Control*. 2000. pp. 86-90.
39. Alonso-Amelot ME, Avendaño M. Possible association between gastric cancer and bracken fern in Venezuela: an epidemiologic study. *Int J Cancer*. 2001;91:252-259.
40. Alvarado DM. Evolución de algunos aspectos epidemiológicos y ecológicos del cáncer gástrico en Costa Rica. *Rev Costa Rica. Salud Pública*. 2003;12:21.
41. Campos-da-Paz M, Pereira L, Bicalho L, Dórea J, Poças-Fonseca M, Santos M. Interaction of bracken-fern extract with vitamin C in human submandibular gland and oral epithelium cell lines. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2008;652(2):158-163.
42. Tendrafilova A, Peev L, Antonova D, Tashev A, Todorov T, Dilov P. Determination of ptaquiloside in *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn from central rhodopes (Bulgaria). *Rev Comptes Rendus de l'Academie Bulgare des Sciences*. 2012;65(9):1193-1198.
43. Alonso-Amelot ME. Bracken fern, animal and human health. *Rev Fac Agron*. 1999;16:528-541.
44. COT - Committee on the Toxicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment, COT Statement on the Risk to Consumers of Eating Foods Derived from Animals that Have Eaten Bracken, Food Standards Agency, London, 2008. pp. 20-21.
45. Mori H, Sugie S, Hirono I, Yamada K, Niwa H, Ojika M, et al. Genotoxicity of ptaquiloside a bracken carcinogen, in the hepatocyte primary culture/DNA-repair test. *Mutat Res*. 1985;143:75-78.
46. Recouso RC, Stocco SRC, Freitas R, Santos RC, de Freitas AC, Brunner O, et al. Clastogenic effect of bracken fern (*Pteridium aquilinum* v. *arachnoideum*) diet in peripheral lymphocytes of human consumers: preliminary data. *Rev Vet Comp Oncol*. 2003;1(1):22-29.
47. Almeida Santos MF, Dorea JG, Luna H. Bracken-fern extracts can be clastogenic or aneugenig depending on the tissus cell assay. *Food Chem Toxicol*. 2006;44(11):1845-1848.

48. Ferguson LR, Philpott M. Nutrition and mutagenesis. *Rev Annu Rev Nutr.* 2008;28:313-329.
49. Pereira LO, Bicalho-Campos PLM, de Sousa TM, Bao SN, de Fatima Menezes ASM, Fonseca MJ. DNA damage and apoptosis induced by *Pteridium aquilinum* aqueous extract in the oral cell lines HSG and OSCC-3. *J Oral Pathol Med.* 2009;38(5):441-447.
50. Lioi MB, Barbieri R, Borzacchiello G, Dezzi S, Roperto S, Santoro A. Chromosome aberrations in cattle with chronic enzootic haematuria. *J Comp Pathol.* 2004;6:131:233.
51. Peretti V, Ciotola F, Albarella S, Russo V, Meo GPD, Iannuzzi L. Chromosome fragility in cattle with chronic enzootic haematuria. *Mutagenesis.* 2007;22:317-20.
52. Gil da Costa RM, Coelho P, Sousa R, Bastos MM, Porto B, Teixeira JP, et al. Multiple genotoxic activities of ptaquiloside in human lymphocytes: aneuploidy, clastogenesis and induction of sister chromatid exchange. *Mutat Res.* 2012;747(1):77-81.

Recibido: 27-5-2013.

Aceptado: 4-7-2013.