



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

Facultad de Ciencias de la Vida

Ingeniería en Biotecnología

**Identificación de Ptaquilósido y Pterosina A en el helecho
Hypolepis parallelogramma (Kuntze) C. Presl, una especie
consumida en Napo, Ecuador**

Tatiana Alejandra Guaraca Medina

26 de junio de 2020, Tena, Napo, Ecuador.

Declaración de derecho de autor, autenticidad y responsabilidad

Tena, 27 de junio de 2020

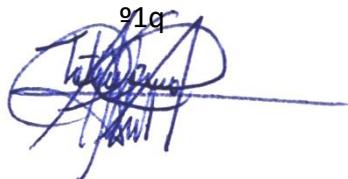
Yo, Tatiana Alejandra Guaraca Medina con documento de identidad N° 0105565568, declaro que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título de Ingeniería en Biotecnología son absolutamente inéditos, originales, auténticos y personales.

En virtud de lo cual, el contenido, criterios, opiniones, resultados, análisis, interpretaciones, conclusiones, recomendaciones y todos los demás aspectos vertidos en la presente investigación son de mi autoría y de mi absoluta responsabilidad.

Por la favorable atención a la presente, suscribo de usted,

Atentamente,

Firma:

910


Tatiana Alejandra Guaraca Medina

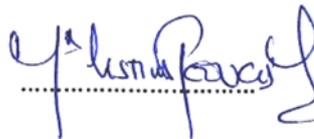
Certificado de dirección de trabajo de integración curricular

Certifico que el trabajo de integración curricular titulado: Identificación de Ptaquilósido y Pterosina A en el helecho *Hypolepis parallelogramma* (Kuntze) C. Presl, una especie consumida en Napo, Ecuador”, en la modalidad de: proyecto de investigación en formato tesis, fue realizado por: Tatiana Alejandra Guaraca Medina, bajo mi dirección.

El mismo ha sido revisado en su totalidad y analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad Regional Amazónica Ikiam, para su entrega y defensa.

Tena, 27 de junio de 2020

Firma:



María Cristina Peñuela Mora

C.I: 1756861496

Firma:



José Rafael De Almeida

C.I: 1757448954

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

AGRADECIMIENTOS

La vida permite cruzar fronteras, saltar muros, tropezar y volver a levantarse sabiendo que pronto alcanzaremos buen puerto. En ese caminar, los temores, el desaliento y las dudas pasan inadvertidas cuando existen seres humanos maravillosos que extienden su mano sin condición. La sublime acción de aquellos y aquellas que aliviaron mi carga perdurará por siempre en mi corazón. Gratitud inmensa para mis docentes, amigos y amigas, quienes me regalaron con generosidad un pedacito de su vida. A Joel Medina, por su paciencia, su tolerancia y el consejo oportuno, un baluarte indiscutible que hace posible el alcance de los sueños. A María Cristina Peñuela por la exigencia que significa excelencia, su tiempo invertido en la consecución de los objetivos reafirma mi elección en esta carrera. A Rafael Almeida, amigo oportuno en los momentos difíciles, su labor docente se apuntala en la bondad y la comprensión, compartiendo su conocimiento sin límite, animado únicamente el formar investigadoras e investigadores para el servicio a la sociedad.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres, Favio Guaraca y Beatriz Medina, quienes me han inspirado a través de su ejemplo. A mi madre por ser un pilar fundamental en mi vida, por su amor y palabras de aliento que me ayudan a seguir adelante en busca de mis sueños. A mi padre, por explicarme que la humildad y el servicio es lo más importante en un ser humano, y que mi condición de mujer no me limita.

A mi hermano, Patricio Guaraca, mi ejemplo a seguir desde pequeña y por quien siento mucho orgullo. Con su esfuerzo y dedicación, me enseñó a buscar soluciones a los problemas y a no decaer en los momentos difíciles.

A Sor Elsy Yáñez por estar siempre en los momentos exactos y transmitirme la paz que sólo ella puede brindar. Gracias a ella comprendí que toda labor se hace con entrega, corazón y alegría.

También, dedico esta tesis a toda mi familia por su apoyo constante y calidez humana. A mis abuelos, Manuel Guaraca y Olga Maldonado que desde el primer día de Universidad creyeron en mí. Su constancia y sacrificio me demostraron que por más dificultades que se presenten en el camino, si nos proponemos podemos llegar a la meta.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|--|-----------|
| RESUMEN | XI |
| ABSTRACT | XII |
| CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN | 1 |
| Antecedentes..... | 1 |
| <i>Helechos: características generales</i> | <i>1</i> |
| <i>H. parallelogramma: aspectos generales.....</i> | <i>5</i> |
| <i>Toxicidad en helechos alimenticios</i> | <i>7</i> |
| Detección de PTA y compuestos relacionados..... | 12 |
| Enfermedades asociadas al PTA y compuestos relacionados | 14 |
| <i>Cáncer gástrico y hematuria enzoótica bovina</i> | <i>14</i> |
| Planteamiento del Problema | 15 |
| Justificación de la Investigación..... | 16 |
| Objetivos de la Investigación | 17 |
| General..... | 17 |
| Específico | 17 |
| CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO | 18 |
| Campo..... | 18 |
| Laboratorio | 21 |
| <i>Curva de calibración para PTA</i> | <i>22</i> |
| <i>Validación del método de extracción</i> | <i>23</i> |
| <i>Límite de detección y cuantificación de PTA</i> | <i>23</i> |
| Análisis estadístico | 24 |
| CAPÍTULO III: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS | 25 |
| Curva de calibración para PTA | 25 |
| Validación del método para LC-MS | 28 |
| <i>Límite de detección y cuantificación de PTA</i> | <i>28</i> |
| Validación del método de extracción | 28 |
| Identificación de PTA en las muestras..... | 37 |
| Identificación de compuestos relacionados a PTA | 41 |
| CAPITULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN..... | 49 |
| CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES..... | 52 |
| Conclusiones | 52 |

| | |
|------------------------------|----|
| Recomendaciones | 52 |
| REFERENCIAS | 54 |
| ANEXOS | 66 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Especies del género <i>Hypolepis</i> presentes en Ecuador. | 5 |
| Tabla 2. Propiedades y características físico-químicas del PTA y sus compuestos relacionados. | 10 |
| Tabla 3. Metodologías para detección de PTA. | 12 |
| Tabla 4. Gradiente empleado para las fases móviles. | 21 |
| Tabla 5. Condiciones para la corrida cromatográfica. | 22 |
| Tabla 6. Datos de área, concentración y tiempo de retención del estándar de PTA para su curva de calibración. | 25 |
| Tabla 7. Intensidad de los picos con m/z 249 [M+H]⁺ para pterosina A en las muestras de <i>H. parallelogramma</i> según el tratamiento y lugar. | 47 |
| Tabla 8. Diferencias en la intensidad del pico m/z de 249 [M+Na]⁺ en los brotes de <i>H. parallelogramma</i> provenientes de Lucían. | 48 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Estructura general de los helechos. | 2 |
| Figura 2. Fotografías de los brotes de <i>H. parallelogramma</i> | 4 |
| Figura 3. Fotografías de <i>H. parallelogramma</i> en campo..... | 7 |
| Figura 4. Estructura química general del PTA y compuestos relacionados. | 8 |
| Figura 5. Reacciones del PTA en condiciones ácidas y básicas. | 9 |
| Figura 6. Compuestos relacionados a PTA. | 11 |
| Figura 7. Visita a los lugares de procedencia de los brotes de <i>H. parallelogramma</i> | 18 |
| Figura 8. Descripción resumida de la metodología empleada para detección de PTA y compuestos relacionados..... | 20 |
| Figura 9. Curva de calibración para el estándar de PTA. | 26 |
| Figura 10. Perfil cromatográfico de los estándares de PTA para el pico de 399.163. | 27 |
| Figura 11. Perfil cromatográfico para el blanco de diclorometano (fase orgánica) con estándar de 500 ppb de PTA..... | 30 |
| Figura 12. Perfil cromatográfico para muestra cruda de <i>H. parallelogramma</i> en diclorometano (alícuota de la muestra presente en la fase orgánica) con estándar de 500 ppb de PTA. | 32 |
| Figura 13. Perfil cromatográfico para el blanco de agua (fase acuosa) con estándar de 500 ppb de PTA. | 34 |
| Figura 14. Perfil cromatográfico para muestra cruda de <i>H. parallelogramma</i> en agua (alícuota obtenida de la fase acuosa) con estándar de 500 ppb de PTA. | 36 |
| Figura 15. Perfil cromatográfico para el blanco de diclorometano, sin presencia del pico de 399 m/z para PTA..... | 38 |
| Figura 16. Perfil cromatográfico para la muestra de <i>H. parallelogramma</i> de Alto Pano con presencia del pico para PTA..... | 40 |
| Figura 17. Perfil cromatográfico para el blanco de diclorometano sin presencia de un pico de m/z de 249..... | 43 |
| Figura 18. Perfil cromatográfico de una muestra de <i>H. parallelogramma</i> con la fracción correspondiente a pterosina A..... | 45 |
| Figura 19. Perfiles cromatográficos que señalan el pico con m/z de 249 [M+H] ⁺ sugerida como Pterosina A en muestras con diferentes tratamientos. | 46 |
| Figura 20. Diferencias en la intensidad del pico con m/z 249 [M+Na] ⁺ para pterosina A en muestras de <i>H. parallelogramma</i> | 48 |
| Figura 21. Perfiles cromatográficos completos para las muestras de El Calvario..... | 69 |
| Figura 22. Perfiles cromatográficos completos para las muestras de Alto Pano. | 73 |
| Figura 23. Perfiles cromatográficos completos para las muestras de Pumayacu..... | 77 |
| Figura 24. Perfiles cromatográficos completos para las muestras de Lucién..... | 82 |
| Figura 25. RMN de ¹³ C del estándar de ptaquilósido. | 83 |

RESUMEN

Los helechos tienen una amplia distribución y gran valor alimenticio por sus nutrientes esenciales. En Ecuador, se consumen más de 10 especies y en Napo, las comunidades Kichwa consumen y comercializan los brotes tiernos de la especie *Hypolepis parallelogramma*, de la familia Dennstaedtiaceae, conocida como garabato-yuyo. En especies relacionadas, se ha comprobado la presencia de distintos metabolitos especializados tóxicos como los glucósidos de iludano. El objetivo de este trabajo fue detectar la presencia de ptaquilósido y compuestos relacionados en los brotes jóvenes de *H. parallelogramma*. Se colectaron muestras de cuatro localidades: Lucián, Alto Pano, El Calvario y Pumayacu, que fueron sometidas a diferentes formas de procesamiento: secas, crudas, cocidas y asadas en hoja. Posteriormente, se procedió a la extracción y detección de los compuestos mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas. No se detectó ptaquilósido en las muestras, pero el análisis de los espectros obtenidos reveló la presencia de pterosina A. Esta molécula es producto de la degradación de caudatósido, una molécula tóxica con reactividad química similar al ptaquilósido, que puede causar carcinogenicidad en humanos y envenenamiento en animales. Las muestras obtenidas de Lucián presentaron mayor intensidad de la molécula. Este es el primer estudio en helechos comestibles en el Ecuador y señala la importancia de estudiar en detalle ésta y otras especies comestibles con el fin de sugerir recomendaciones de manejo y consumo de estas especies.

Palabras clave: helecho comestible, garabato-yuyo, pterosinas, dieta Kichwa

ABSTRACT

Ferns are widely distributed and have great nutritional value because of their essential nutrients. In Ecuador, more than 10 species are consumed and in Napo, the Kichwa communities consume and commercialize the tender shoots of the species *Hypolepis parallelogramma*, of the Dennstaedtiaceae family, known as garabato-yuyo. In related species, the presence of different specialized toxic metabolites such as illudane-type glycosides have been proven. The aim of this work was to detect the presence of ptaquiloside and related compounds in young shoots of *H. parallelogramma*. Samples were collected from four localities: Lucian, Alto Pano, El Calvario and Pumayacu, which were subjected to different forms of processing: dry, raw, cooked and roasted in leaves. Later, the compounds were extracted and detected by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. Ptaquiloside was not detected in the samples but the analysis of the spectra obtained revealed the presence of pterosin A. This molecule is a product of the degradation of caudatoside, a toxic molecule with chemical reactivity similar to ptaquiloside, which can cause carcinogenicity in humans and poisoning in animals. The samples obtained from Lucian showed greater intensity of the molecule. This is the first study in edible ferns in Ecuador, and it indicates the importance of studying this and other edible species in detail, in order to suggest recommendations for the management and consumption of these species.

Keywords: Edible fern, garabatoyuyo, pterosins, Kichwa-diet

Abreviaciones

| | |
|--------|--|
| PTA | Ptaquilósido |
| PTB | Pterosina B |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| HPLC | Cromatografía líquida de alta eficacia |
| LC-MS | Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas |
| HEB | Hematuria enzoótica bovina |
| INABIO | Instituto Nacional de Biodiversidad |
| LOD | Límite de detección |
| LOQ | Límite de cuantificación |
| Std | Estándar |
| ppb | Partes por billón |
| m/z | Cociente masa/carga |
| ng/L | Nanogramo/litro |
| µg/g | Microgramo/gramo |

CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Antecedentes

Helechos: características generales

Los helechos forman parte de un amplio grupo de plantas vasculares conocidas como pteridofitas, que no producen flores ni semillas [1]. Morfológicamente están conformados por: raíz, rizoma, frondas y soros (Figura 1A). La raíz se caracteriza por ser fibrosa y por desarrollar pelos absorbentes en su superficie. El rizoma de un helecho es el órgano del cual se originan las frondas y raíces. Estos pueden llegar a formar troncos, suelen estar cubiertos de pelos, o más comúnmente por escamas. Las hojas o también llamadas frondas, en su madurez tienen formas y tamaños diferentes para cada especie. Pueden estar divididas en hojas simples o enteras. Finalmente, los soros corresponden a una agrupación de esporangios, cápsulas que contienen esporas con capacidad reproductiva [2].

En los helechos se reconocen cuatro estados fenológicos (Figura 1B), I: brotes del suelo, II: brotes laterales, III: juveniles y IV: adultos [3,4].

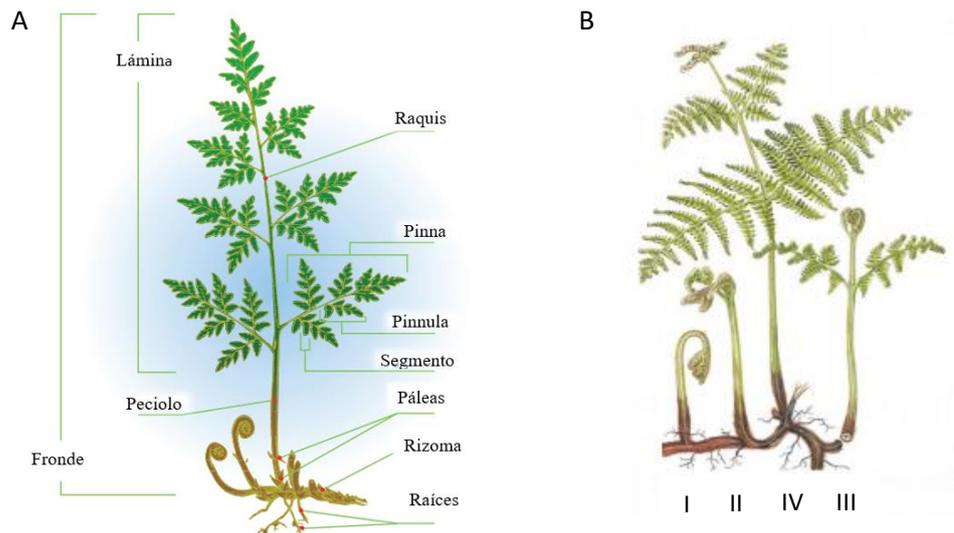


Figura 1. Estructura general de los helechos.

A: Representación morfológica que incluye rizomas, frondas y raíz. B: Estados fenológicos de los helechos en números romanos I: brotes del suelo, II: brotes laterales, III: juveniles y IV: adultos (Figura A modificada de [1]; Figura B modificada de [4]).

En el mundo existen aproximadamente 12 000 especies de helechos [5]. En Ecuador, se han encontrado alrededor de 1 300 especies que se concentran mayoritariamente en bosques nublados entre 1 500 y 3 000 m de altitud. Aunque, también existe una alta diversidad de helechos en bosques de bajura (entre 150 a 400 m de altitud) por las condiciones ambientales de alta humedad y temperaturas medias entre 24 y 27°C [2].

Esta amplia distribución les ha otorgado una gran importancia dentro de la sociedad que los utiliza como plantas ornamentales, medicinales y alimenticias [6]. De manera general, presentan alto contenido en proteínas, vitamina C y minerales como el magnesio, hierro y zinc [7]. En alimentación, se usan bien sea los tallos, rizomas, frondas, brotes jóvenes y algunas veces las plantas enteras [5]. En algunas especies, los rizomas funcionan como reservas de carbohidratos y aminoácidos (*Polypodium auritum* (Hook.) E.J.Lowe.) al igual que el ápice de las frondas (*Diplazium esculentum* (Retz.) Sw.); en otros casos se los considera una fuente importante de vitaminas A y C (*Diplazium lonchophyllum* Kunze y

Diplazium expansum Willd.) [5,6]. Las especies como *Serpocaulon loriceum* (L.) A.R. Sm. y *Serpocaulon triseriale* (L.) A.R. Sm. se utilizan como edulcorantes al estar constituidos por compuestos como el olsadin, polímero perteneciente a las proantocianidinas [6].

En América del Norte, se consumen los brotes jóvenes y tiernos de *Matteuccia struthiopteris* (L.) Tod., *Athyrium filix-femina* (L.) Roth y *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn, que son recolectados a principios del verano [8]. En Argentina, se consumen las hojas de *Pecluma pectinatiformis* (Lindm.) M.G. Price, que por su sabor dulce son masticadas por niños guaraníes [9].

En México, el consumo de estas plantas no es común, sin embargo, las hojas jóvenes llegan a ser parte de platos típicos chinos y cantoneses que se venden en algunos restaurantes [5]. En ciertas zonas de Oaxaca, las bases de las hojas de *Marattia weinmanniifolia* Liebm. son recolectadas y luego molidas para la producción de harina con la que se preparan tortillas [5].

En Ecuador, los usos de los helechos, relacionados a la alimentación son variados. Al sur del Ecuador, *Pteridium arachnoideum* (Kaulf.) Maxon sirve como especia para la preparación del cerdo a la brasa. Grandes cantidades de las hojas silvestres tanto frescas como secas se colocan delante del fuego para tostar al cerdo [10]. Al noreste de la Amazonía ecuatoriana, en Sucumbíos, los Secoya usan los brotes de *Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm. para eliminar el apetito [11]. Otras comunidades utilizan los brotes como alimento en diversas formas: verduras crudas o cocidas, bebidas y condimentos [10]: *Alsophila cuspidata* (Kunze) D.S. Conant, *Hypolepis repens* (L.) C. Presl y *Diplazium moccennianum* (Sadiro) C. Chr., se incluyen en la dieta de los indígenas Chachi (presentes en Esmeraldas), en forma de verduras crudas; las comunidades Awá y Tsáchila, de la zona noroccidental de los Andes,

preparan los brotes de *Polybotrya lechleriana* Mett., *Tectaria incisa* Cav., *A. cuspidata* y *D. moccennianum* como verduras cocidas; brotes de *Polypodium* sp., en la provincia de Cañar y *Elaphoglossum* sp. en la provincia de Carchi se preparan como bebidas [10].

En Napo, en las estribaciones de los Andes orientales, varias comunidades Kichwas consumen los brotes tiernos de *H. parallelogramma* conocida como garabatoyuyo (garabato= gancho, yuyo= brote). Los brotes (Figura 2 A y B), también son comercializados por mujeres indígenas en mercados temporales o junto a platos tradicionales como la tortilla o el maito de tilapia o tilapia frita (Figura 2 C y D). En Sardinas de Ilayaku, por ejemplo, una comunidad ubicada en Puerto Misahuallí, al sureste de la provincia de Napo, se vende al año alrededor de 480 unidades de producto (paquetes con aproximadamente 40 brotes cada uno) con una ganancia de \$1 680 para la comunidad [12].

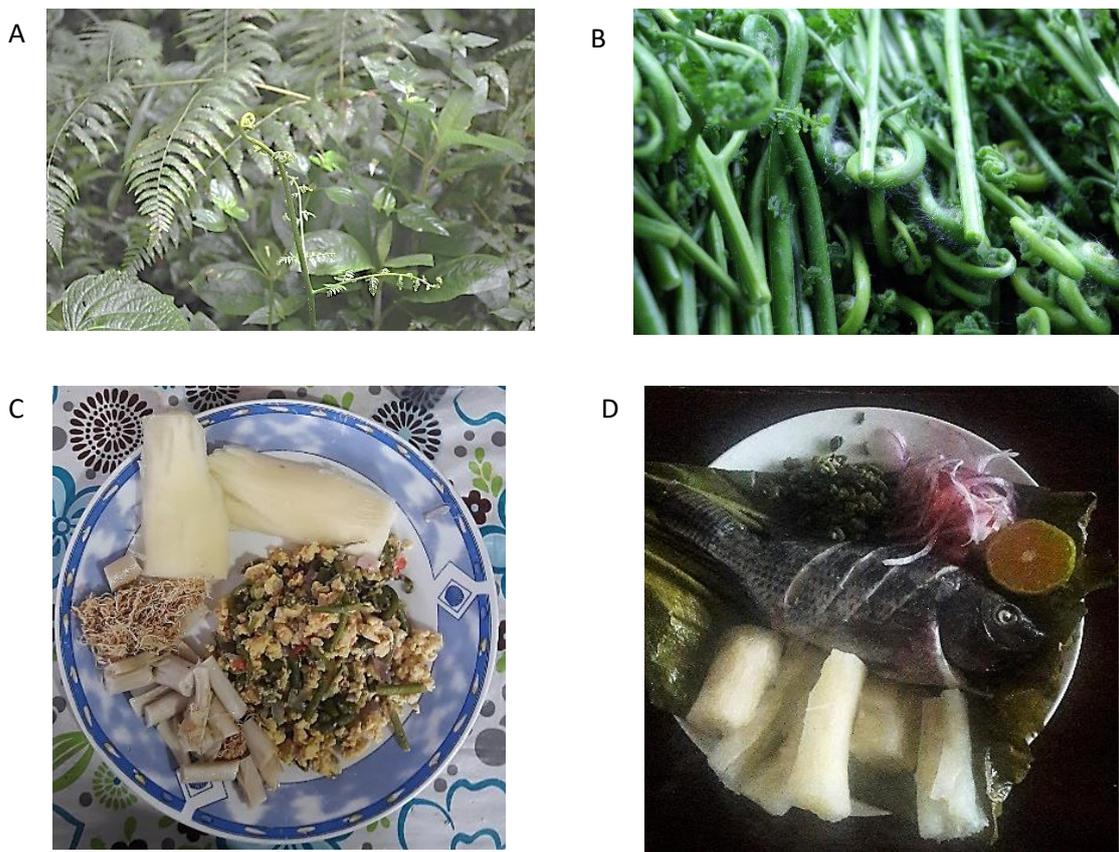


Figura 2. Fotografías de los brotes de *H. parallelogramma*.

A. Brotes laterales de *H. parallelogramma*. B. Atado de brotes crudos. C. Tortilla de garabatoyuyo. D. Maito de tilapia con ensalada de garabatoyuyo. Fotografías: M.C.Peñuela.

H. parallelogramma: aspectos generales

El género *Hypolepis*, es de distribución subcosmopolita [13]. Se encuentra en regiones templadas, tropicales y ecuatoriales del sur del continente. Está ausente en Europa y en zonas semidesérticas o desérticas. Pertenece a la familia Dennstaedtiaceae, incluye alrededor de 80-90 taxones de los cuales entre el 40-45% se presenta en América. Los taxones han sido poco estudiados (incluidos híbridos, variedades, subespecies y especies). Dentro de la familia, se encuentran otros géneros relacionados por su morfología general y hábito como *Paesia* y *Pteridium* [14]. *Hypolepis* y *Pteridium* son filogenéticamente cercanos [15].

Las especies del género *Hypolepis* se caracterizan por tener tallos largos y rastreros, frondas de tamaño mediano a grande (hasta 10 m de largo) y esporas que miden entre 27-52 μm de forma elipsoidal [14,16]. En Ecuador hay 10 especies (Tabla 1), de las cuales dos son endémicas [16].

Tabla 1. Especies del género *Hypolepis* presentes en Ecuador.

Especies pertenecientes al género *Hypolepis* que se distribuyen en Ecuador, en su mayoría están presentes en la región andino amazónica. Dos son endémicas (en negrita) y tres especies son conocidas como alimenticias (Obtenido de [13,16]).

| Especie | Distribución en Ecuador | Usos |
|-------------------------|--|---|
| <i>H. crassa</i> | Endémica de los Andes de Ecuador, presente en los páramos desde los 3 800 a 3 850 metros. | Sin usos conocidos |
| <i>H. flexuosa</i> | En las pendientes occidentales del volcán el Corazón (2 800–3 000 m), al sudeste de Quito. | Sin usos conocidos |
| <i>H. hostilis</i> | Común en los bosques tropicales húmedos de baja montaña de Ecuador. | Alimenticio (brotes como verduras cocinadas empleados por los Chachi de Esmeraldas) |

| | | |
|---------------------------|--|--|
| <i>H. obtusata</i> | En los Andes de Ecuador, en los páramos desde 3 800 a 4600 metros. | Sin usos conocidos |
| <i>H. parallelogramma</i> | En la región andino amazónica de Ecuador desde los 550 a 2 700 m s.n.m. | Alimenticio (brotes como verduras cocinadas por los Kichwas de Napo) |
| <i>H. pteroides</i> | En los Andes de Ecuador desde 3 400 a 4 200 metros. | Sin usos conocidos |
| <i>H. repens</i> | Ampliamente distribuida en Ecuador, desde los 50 a 1 800 m s.n.m. | Alimenticio (brotes como verduras crudas por los indígenas Chachi) |
| <i>H. rigescens</i> | Ampliamente distribuida en Ecuador, desde los 400 a 2 950 m s.n.m. | Sin usos conocidos |
| <i>H. stuebelii</i> | En las provincias de Esmeraldas, Pichincha, Manabí y Chimborazo desde los 1 000 a 2 500 m s.n.m. | Sin usos conocidos |
| <i>H. galapagensis</i> | Endémica de las Islas Galápagos (Pinta, San Salvador y Santa Cruz) de 250 a 750 m s.n.m. | Sin usos conocidos |

H. parallelogramma (Figura 3) se distribuye ampliamente en las regiones andino amazónicas de Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia en altitudes que van desde los 550m a los 2 700m [13]. Se caracteriza por presentar rizomas de 3-6 mm de diámetro con pelos absorbentes aciculares (en forma de aguja) y dispersos en la parte inferior. Frondas que miden entre 3 y 8 metros de longitud, de forma oblonga y tripinnadas. Raquis y pecíolos de color marrón, estos últimos armados con espinas de 0,6 milímetros. Los soros están en el borde de la hoja y son de color pajizo [13].

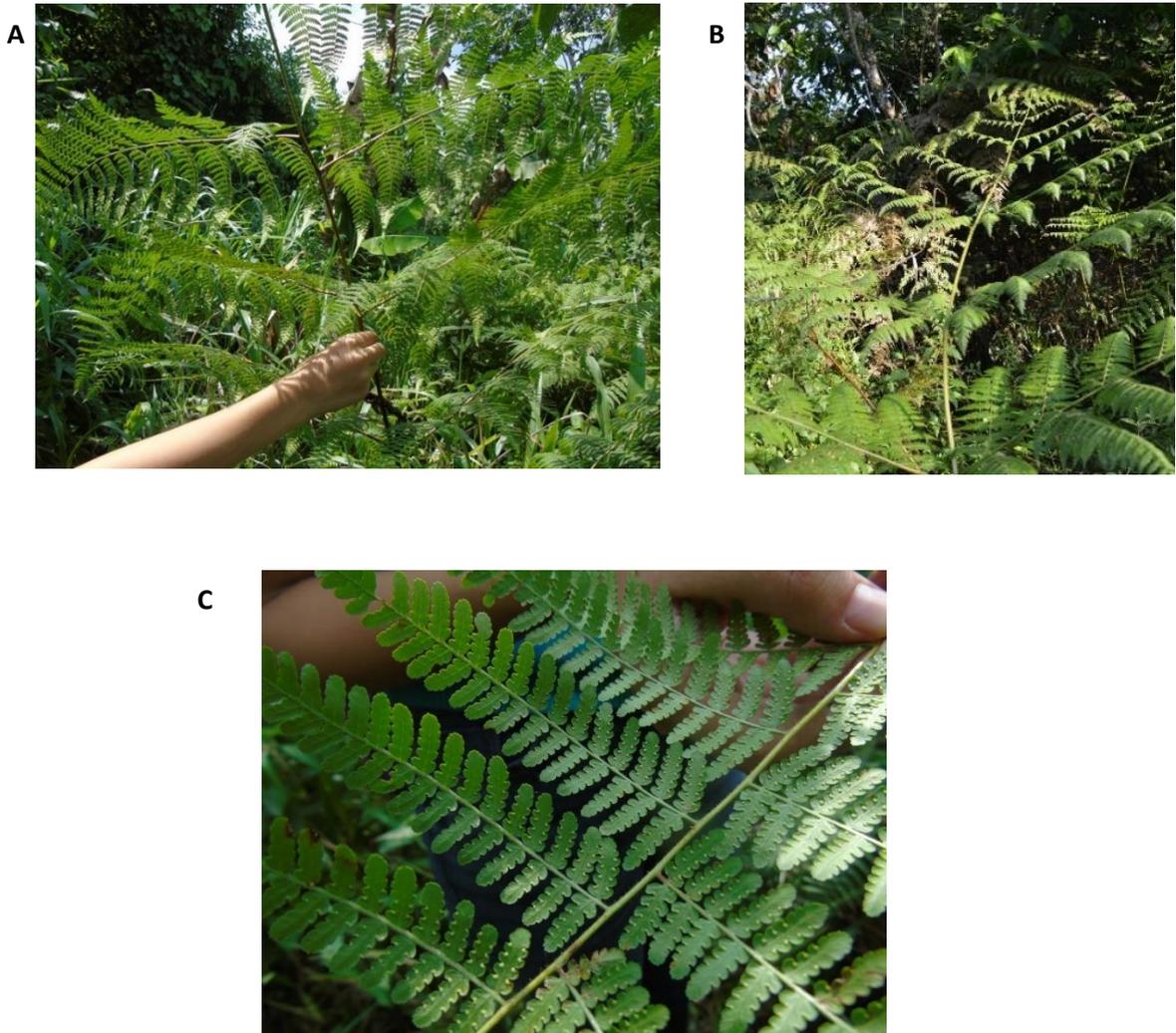


Figura 3. Fotografías de *H. parallelogramma* en campo.

A y B: Vista general de la planta con su tallo, frondas y su hábito. C: Envés de la hoja con soros sin madurar de color amarillo en sus laterales.

Toxicidad en helechos alimenticios

A pesar del gran valor nutricional de los helechos, se ha comprobado que varias especies contienen compuestos tóxicos [17]. Entre los compuestos más estudiados se encuentra el denominado ptaquilósido (en adelante PTA). El PTA (Figura 4), es un glucósido inestable de norsesquiterpeno del tipo iludano (debido a su aglicona) [18,19]. Ha sido estudiado en géneros como: *Pteridium*, *Cheilanthes*, *Histiopteris* y *Pteris* [17,20,21]. Causa más del 50% de la actividad cancerígena de los helechos [17]. En altas concentraciones el PTA causa

apoptosis a través de la escisión del ADN (alquilado) y en bajas, produce fallas y detención del ciclo celular [22–26]. Adicionalmente, el PTA y compuestos relacionados como el caudatósido son clastogénicos (causan daños estructurales a los cromosomas), mutagénicos (causa mutaciones genéticas) y teratogénicos (conduce a modificaciones en la estructura embrionaria) [18].

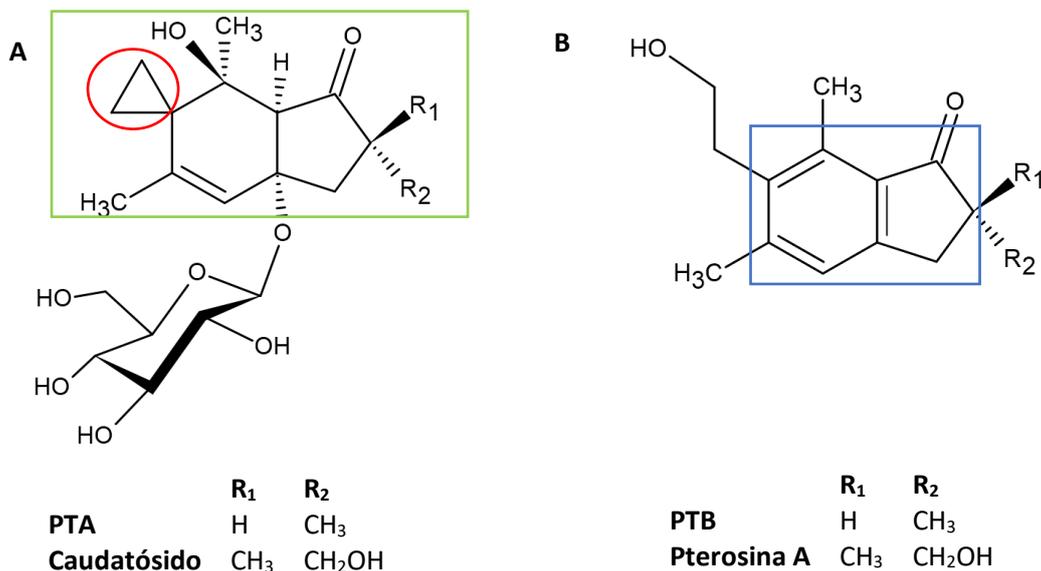


Figura 4. Estructura química general del PTA y compuestos relacionados.

A. Anillo ciclopropano (en rojo) con esqueleto del tipo iludano (recuadro en verde) unido a una glucosa. Esta estructura la comparten los compuestos relacionados a PTA como caudatósido.

B. Estructura general de las pterosinas (productos de degradación de PTA y compuestos relacionados) que contiene el esqueleto de indanona (en azul) (Modificado de [29]).

El PTA es inestable en pH inferiores a 4 y superiores a 8 debido a que, en esas condiciones sufre pérdida de glucosa. Sin embargo, es estable a pH neutro. En condiciones básicas da lugar a una dienona inestable (electrófilo fuerte, capaz de alquilar aminoácidos y ADN). En condiciones ácidas se produce aromatización y su producto de reacción es la pterosina B (Figura 5) [18]. A un pH de 4, este compuesto posee una vida media aproximada de siete días, mientras que a un pH entre 5.5 y 7, se mantendrá entre el 60 y 90% de la concentración inicial después de siete días (a 37°C). La velocidad de descomposición es

dependiente de las condiciones de temperatura y exposición a la luz [17]. Cuando las frondas están expuestas a la luz solar, más del 25% del contenido inicial de PTA estará presente después de seis semanas [27].

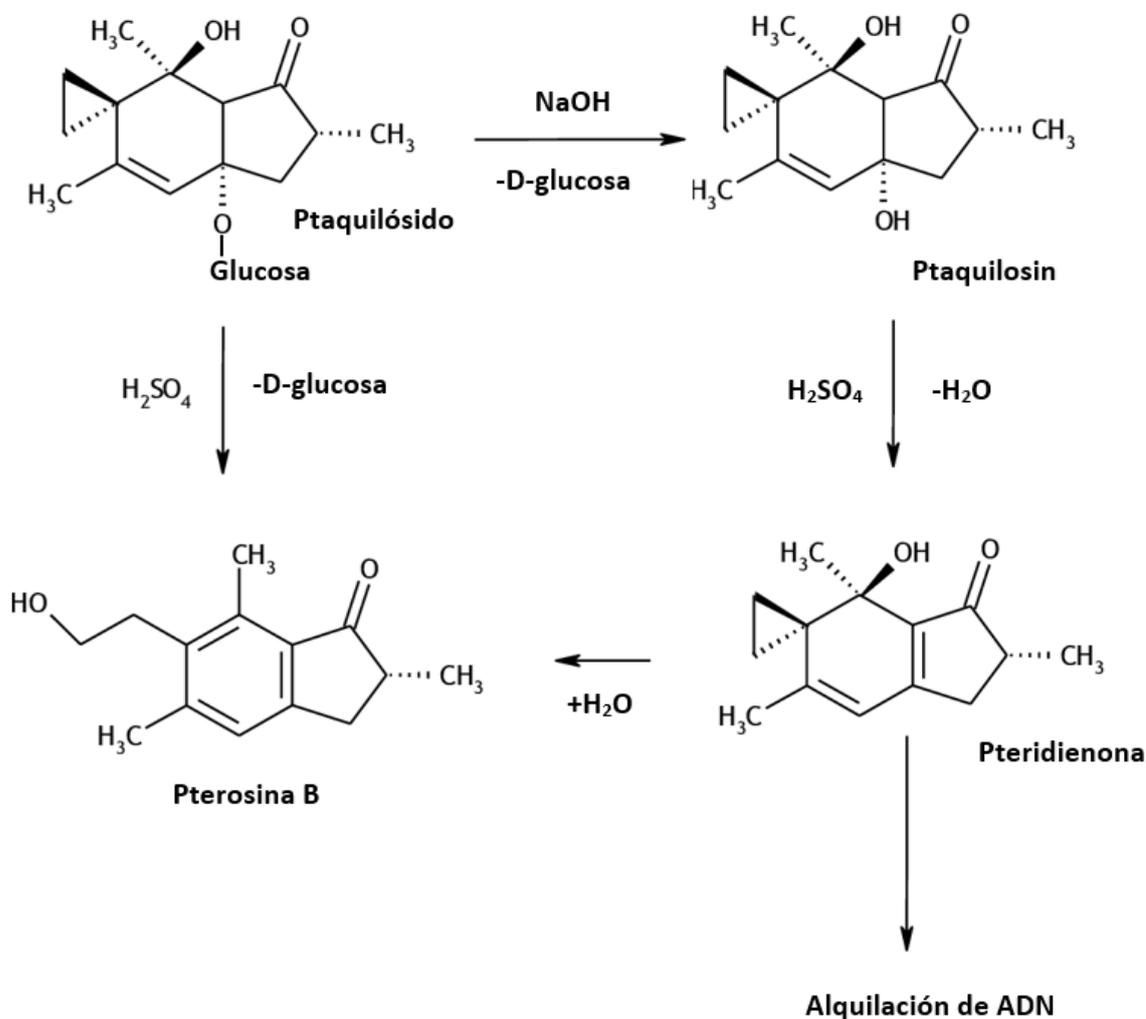


Figura 5. Reacciones del PTA en condiciones ácidas y básicas.

En condiciones básicas (en $\text{pH} > 8$) se forma el **ptaquilosin** (aglicona), que da lugar a la **pteridienona** (dienona inestable, que produce la alquilación de ADN), mientras que en condiciones ácidas (en $\text{pH} < 4$) el PTA forma **pterosina B** (producto final de la descomposición del PTA) (Modificado de: [18]).

Debido a la conexión química entre el PTA y la pterosina B (en adelante PTB) (Figura 5) y, a la variación simultánea de los dos compuestos durante el envejecimiento de las frondas, se han conducido estudios para identificar otros compuestos que pudieran estar relacionados con estas moléculas [28]. Se han aislado y caracterizado algunos como:

isoptaquilósido, caudatósido y ptaquilósido Z en muestras de *Pteridium caudatum* (L.) Maxon; y caudatósido, hypacrone, y pterosina A en *Hypolepis punctata* (Thunb.) Mett. [17,20,21] (Figura 6). El caudatósido y ptaquilósido Z son verdaderos sesquiterpenos (C_{15}), cuyas características espectrales difieren ligeramente del PTA. Son mucho más inestables que el PTA y se degradan rápidamente en sus correspondientes pterosinas y dienonas (más de 29 subproductos de degradación como pterosina A producto final de la descomposición de caudatósido, Tabla 2) [28].

Tabla 2. Propiedades y características físico-químicas del PTA y sus compuestos relacionados.

La tabla describe algunas propiedades de metabolitos especializados y sus derivados (como PTB y pterosina A), presentes en los helechos, que posibilitan su detección e identificación correspondientes (Obtenido de: [17,18,29]).

| Propiedades | Ptaquilósido | Pterosina B | Caudatósido | Pterosina A |
|--------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| Fórmula molecular | $C_{20}H_{30}O_8$ | $C_{14}H_{18}O_2$ | $C_{21}H_{32}O_9$ | $C_{15}H_{20}O_3$ |
| Número CAS: | 87625-62-5 | 34175-96-7 | - | 35910-16-8 |
| Peso Molecular | 398.45 g/mol | 218.29 g/mol | 428.5 g/mol | 248.32 g/mol |
| Punto de fusión | 85-89°C | 109-110°C | - | 125-127°C |
| Máximos de absorción en luz UV | 214; 220nm | 217; 260; 304nm | 202nm | 217; 263; 306nm |
| Ion Precursor m/z | 421,1833 (tipo [M+Na] ⁺) | 219.138 (tipo [M+H] ⁺) | 451.1939 (tipo [M+Na] ⁺) | 249.1485 (tipo [M+H] ⁺) |

Las pterosinas, derivados de 1-indanona [30], se clasifican según el número de sustituyentes en el carbono C-2 en dos tipos: pterosinas del tipo “Z” con quince carbonos (C_{15}) y pterosinas del tipo “B” con catorce carbonos (C_{14}), [30]. De estas pterosinas pueden producirse los pterósidos, derivados sesquiterpénicos de 1-indanona unidos a la molécula de glucosa. Estos glucósidos forman parte de la ruta biosintética del PTA y compuestos relacionados [17,31].

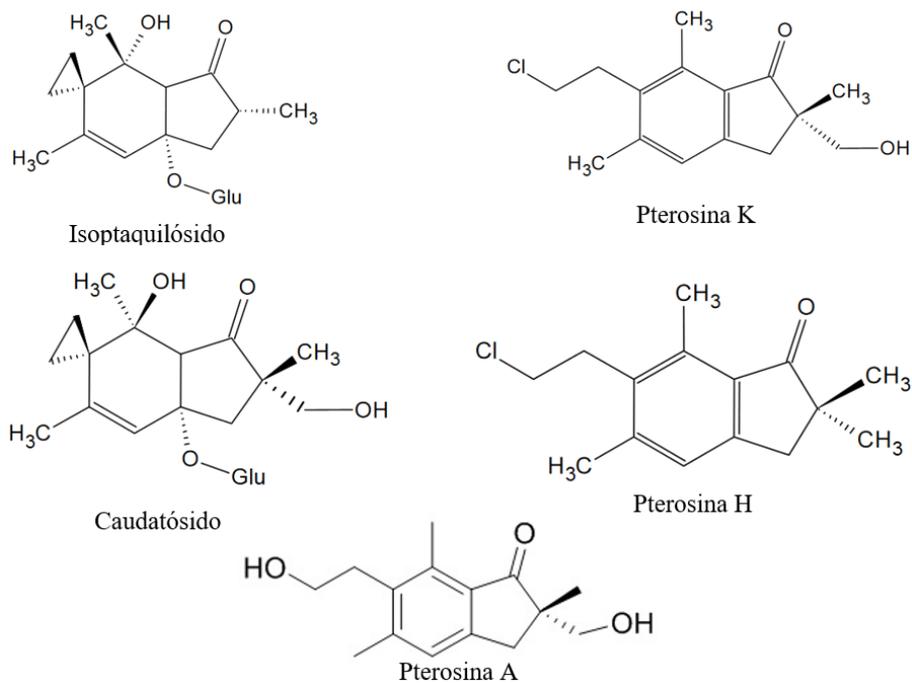


Figura 6. Compuestos relacionados a PTA.

Entre ellos: caudatósido (a diferencia del PTA posee un CH₃ y un CH₂OH en el C-10) y pterósina A (producto final de descomposición de caudatósido). (Obtenido de [17,31]).

La función del PTA en los helechos es un tema de debate. Se sugiere que actúa como un mecanismo de defensa frente a cualquier ataque, siendo las concentraciones del PTA más elevadas en las frondas jóvenes y en los brotes que son frágiles y sensibles durante su crecimiento [17]. Esta hipótesis está respaldada por el hecho de que pocos insectos y herbívoros se alimentan de esta planta a pesar de su alta disponibilidad en ciertas zonas [17].

El PTA y los compuestos relacionados, no solamente pueden encontrarse en la planta o acumulados en los tejidos de los animales, sino también pueden transferirse al suelo como consecuencia de la lixiviación de frondas, rizomas y raíces o disuelto en orina o excrementos de animales que se alimentan de helechos [32]. La concentración de estos compuestos en una misma especie puede variar a través de la ontogenia de la planta y en las diferentes partes del helecho como fue probado en *P. aquilinum* [17]. Así, por ejemplo, la concentración de PTA es mayor (15 100 µg/ g) en la fronda comparado a la raíz, (5-230

$\mu\text{g} / \text{g}$), en el periodo de crecimiento que corresponde a la época de lluvias. Y en general, los rizomas tienen un bajo contenido de PTA $1\ 200\ \mu\text{g} / \text{g}$ [17]

Detección de PTA y compuestos relacionados

Los metabolitos especializados tóxicos derivados de los helechos han sido detectados a través de distintas herramientas analíticas, sea por su identificación directa o por pterosinas relacionadas [18,33,34]. La Tabla 3, detalla los principales protocolos empleados en la extracción e identificación de estos compuestos en distintas muestras.

Tabla 3. Metodologías para detección de PTA.

Metodologías seleccionadas según su proceso de extracción y detección (por HPLC-UV o LC-MS). Para métodos indirectos (conversión de PTA a PTB) se emplea comúnmente resina de poliamida y para directos, la extracción con agua junto a un solvente orgánico.

| Nº de Protocolo | Tipo de material | Proceso | Fase móvil | Equipo | Cita |
|-----------------|---------------------|---|-----------------------------|---------|------|
| 1 | Muestras de leche | 100 mL de muestra Extracción con agua y diclorometano. Conversión a PTB con NaOH. | Metanol y Agua | HPLC-UV | [35] |
| 2 | Fronchas | 2 g de muestra. Extracción con agua y uso de resina de poliamida. Detección de PTA y PTB. | Metanol y Agua | HPLC-UV | [36] |
| 3 | Rizomas | Peso no determinado. Uso de agua desionizada para la extracción y resina de poliamida 6S. Determinación de PTA Y PTB. | Metanol y Agua | HPLC-UV | [37] |
| 4 | Fronchas | 100 mg de muestra. Extracción con diclorometano y agua destilada. Detección directa de PTA. | Metanol y Acetato de Amonio | LC-MS | [4] |
| 5 | Fronchas | Peso no determinado. Extracción con agua MilliQ y resina de poliamida. Detección de PTB. | Agua y Acetonitrilo | HPLC-UV | [38] |
| | Fronchas con raquis | 6 g de muestra. Extracción con agua MilliQ. Detección de PTA. | Ácido fórmico | LC-MS | [39] |

La columna con resina de poliamida es comúnmente utilizada en los métodos indirectos (Tabla 3: protocolos 2, 3 y 5), los cuales realizan la conversión de PTA en PTB. Este paso es fundamental para garantizar la eliminación de cualquier material no polar, que incluye otras pterosinas, y proceder con la correcta cuantificación [29,40]. Adicionalmente, se usa la resina de poliamida para procesos que conllevan síntesis de PTA [40]. Para procesos analíticos directos (Tabla 3: protocolos 1, 4 y 6), la extracción con agua o junto a un solvente orgánico es más ventajosa porque requieren menor tiempo y permiten el análisis de compuestos relacionados a PTA debido a que se forman otras pterosinas [40].

Los protocolos 4 y 6 detectan PTA mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS), una técnica analítica que permite la identificación de varios componentes (por las diferencias en la masa molecular de cada uno) en una mezcla compleja. Por lo tanto, no requiere purificación previa. En el cromatógrafo, la muestra será separada parcial o completamente en sus componentes. Este efluente se introduce en un espectrómetro de masas, donde se adquieren espectros de masas (m/z) por cada compuesto [41].

La técnica LC-MS, permite la confirmación de la estructura del compuesto por su patrón de fragmentación. Además, debido a su especificidad y bajo límite de detección, un compuesto puede ser monitoreado rápidamente por su ion molecular [42,43].

Los protocolos 1, 2, 3 y 5 utilizan la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC high-performance liquid chromatography), acoplada a un detector UV. Esta técnica permite la identificación de picos de compuestos específicos en una muestra, al compararlos con los tiempos de retención de sus estándares. Si no se cuenta con ellos, la identificación se dificulta. Por lo anterior, la técnica LC-MS presenta mayores ventajas: un menor tiempo de

análisis, mayor sensibilidad y selectividad del equipo, siendo muy útil para el estudio de componentes con propiedades pobres en absorción UV como alcoholes y azúcares [42].

Enfermedades asociadas al PTA y compuestos relacionados

Cáncer gástrico y hematuria enzoótica bovina

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo, especialmente en los países menos desarrollados económicamente [44]. Según cifras del Gen Data Base in Cancer en 2016 [45], se produjeron alrededor de 8.8 millones de defunciones, siendo el cáncer de estómago uno de los que posee el mayor índice de mortalidad: 754 mil defunciones (equivalente al 8%). Según el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC- International Agency for Research on Cancer), en Ecuador, en el 2018, la incidencia del cáncer fue de 157.2 casos por cada 100 mil habitantes, en donde el cáncer de estómago ocupó el cuarto lugar con cerca de 13.8 casos [46].

En encuestas epidemiológicas de Costa Rica (Centroamérica)[47] y Gales (Reino Unido) [48], el cáncer de estómago ha sido correlacionado positivamente con la presencia de helechos en zonas rurales (debido a la exposición de los pobladores a esporas de helechos). En Brasil, donde se consumen helechos (exposición en forma directa a PTA o compuestos relacionados) se reportan tasas significativamente más altas de cáncer de estómago que en áreas donde no se consume [49].

El comité británico de toxicidad química en alimentos, en el 2008 declaró al PTA como agente carcinógeno potencial para los humanos en todos los niveles de ingestión, incluyendo el consumo de animales expuestos a esporas o al helecho [50]. Recientemente, se ha advertido que compuestos relacionados a PTA como el caudatósido, presentan

reactividades químicas similares, aunque no se ha dado la debida importancia en los estudios toxicológicos [29].

La hematuria enzoótica bovina HEB es una enfermedad crónica de creciente relevancia mundial, por sus consecuencias económicas y de salud pública. Se caracteriza por provocar en el ganado la emisión de orina sanguinolenta, coágulos de sangre, y debilidad, mucosas pálidas, anemia, caída de los niveles de producción de leche e incluso la muerte [51,52]. El consumo de helechos como *P. aquilinum* y *Adiantopsis chlorophylla* (Sw.) Fée [52] por el ganado bovino es considerado uno de los causantes de la toxicosis que conlleva a esta enfermedad [53,54]. Estudios en muestras de leche de vacas con antecedentes de HEB en Brasil, Ecuador y Uruguay han encontrado restos de PTA y caudatósido provenientes de helechos como: *P. arachnoideum* y *P. aquilinum* en Ecuador, *P. Aquilinum* en Brasil, y *A. chloropylla* en Uruguay, lo que indica que estos compuestos permanecen en los derivados lácteos y por tanto, las personas que consumen estos alimentos están expuestas a cantidades apreciables de este carcinógeno [19,52,55,56].

En diferentes regiones ganaderas del mundo y en particular de América Latina, se ha reportado una creciente abundancia de helechos tóxicos del género *Pteridium* que afectan negativamente la crianza animal vacuna y que además de suponer un riesgo al ganado, también genera un riesgo potencial para el humano por los residuos de PTA en la carne y la leche [19,55,56].

Planteamiento del Problema

Especies relacionadas a *H. parallelogramma*, pertenecientes a la familia Dennstaedtiaceae han demostrado contener componentes tóxicos, los glucósidos del tipo iludano como el PTA [40]. En *H. punctata* en China y Japón se han encontrado caudatósido, hypacrone, y

pterosina A [20,21]. Los dos primeros componentes al igual que el PTA generan cáncer de estómago en humanos y animales o hematuria enzoótica en el ganado [47–49,52,56]. En Ecuador se han realizado 6 estudios de toxicidad en helechos [35,55–59]. En la provincia de Bolívar, Calderón y colaboradores [55] encontraron PTA de *P. aquilinum* y *P. arachnoideum*, en muestras de leche de ganado vacuno. Sin embargo, no hay reportes de estudios sobre las más de 10 especies de helechos comestibles en el país. Aunque no se conoce la comercialización de estos helechos, salvo de *H. parallelogramma* a nivel local, en la provincia de Napo [60] el consumo continuo de estos brotes podría ser perjudicial para la salud de los miembros de estas comunidades.

Justificación de la Investigación

La provincia de Napo tiene una población de 103 697 habitantes, de los cuales alrededor del 40% pertenece a la comunidad Kichwa [61,62], quienes en su dieta familiar consumen los brotes de un helecho conocido localmente como garabatoyuyo (*H. parallelogramma*) [63]. El consumo de esta especie ha incrementado en los últimos años, motivados por programas como el de Chakra Kichwa patrocinado por la Agencia de Cooperación Alemana GIZ (Gesellschaft für Internationale Zusammenarbeit, por sus siglas en alemán) y programas de la alcaldía de Tena y Archidona que promocionan e incentivan el consumo de productos locales [60].

Estudios en *P. caudatum* en Venezuela, encontraron presencia de pterossina A y caudatósido [64]. En Ecuador no existen estudios en los cuales se demuestre la presencia de PTA, o compuestos relacionados a éste, en los brotes jóvenes de *H. parallelogramma*.

Debido al incremento del consumo de esta especie es necesario determinar si los brotes que se comercializan y emplean en platos típicos dentro de la provincia de Napo contienen

algunos de estos metabolitos potencialmente carcinogénicos con el fin de recomendar o no el consumo y comercialización.

Pregunta de Investigación

¿Está presente el PTA o compuestos relacionados en los brotes jóvenes de *H. parallelogramma*?

Hipótesis

Los brotes jóvenes de *H. parallelogramma* poseen PTA o pterosinas A y B, al igual que otras especies de la familia Dennstaedtiaceae.

Objetivos de la Investigación

General

Determinar la presencia de PTA y/o compuestos relacionados en los brotes jóvenes de *H. parallelogramma*.

Específico

- Detectar PTA y pterosinas A o B en muestras de brotes del helecho *H. parallelogramma*, de diferentes lugares de procedencia y con distintas formas de procesamiento: secas, crudas, cocinadas en agua y en maito.

CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO

Campo

El primer paso para trabajar con el helecho consumido en Napo, consistió en la identificación de la especie. Para esto se recurrió a identificar los lugares de producción o cosecha de los brotes. Se visitaron los sitios de venta de los brotes en mercados de Tena y Archidona. Se conocieron a los vendedores, quienes nos indicaron los lugares donde cosechaban la especie. A partir de esto, se visitaron los lugares varias veces y con los vendedores se tomaron fotografías de la especie. Los días de cosecha, con la ayuda de la señora Rosalina Chimbo Alvarado (vendedora), se compraron brotes y frondas *in situ*: Alto Pano, El Calvario, Pumayacu y Lucián, comunidades a menos de 6 km de la ciudad de Tena, y se observó si los brotes se cortaban del suelo (estado fenológico I) o de plantas adultas (en estado fenológico IV) (Figura 1B y Figura 7).



Figura 7. Visita a los lugares de procedencia de los brotes de *H. parallelogramma*.

A: Alto Pano. B: Lucián, lugar del que se obtiene el garabatoyuyo tanto del suelo como de las frondas adultas.

Las frondas se secaron en la Universidad Ikiam y mediante claves de identificación [16], se revisaron sus características, el pecíolo y la forma y posición de los soros en la hoja. Se fotografiaron en detalle las muestras secas y se compararon con muestras botánicas en el herbario de la Pontificia Universidad Politécnica del Ecuador y en el herbario del Instituto Nacional de Biodiversidad (INABIO). Se encontró la misma especie en el herbario de INABIO como *H. parallelogramma*.

Los brotes, desde el lugar de colecta fueron transportados en caja fría (4°C) con una estructura aislante de poliuretano, al laboratorio de Productos Naturales de la Universidad Regional Amazónica Ikiam. Para ello, fueron extendidos sobre papel absorbente y se protegieron en bolsas plásticas para mantener la humedad adecuada de la muestra [65]. Se mantuvieron refrigeradas a 4°C hasta realizar sus distintos tratamientos.

De cada sitio: Lucián, Pumayacu, Alto Pano y El Calvario, se analizaron tres individuos (provenientes de plantas adultas, estado fenológico IV). Las muestras pasaron por cuatro procesos de preparado y cocción: 1-cruda, 2-muestra seca (a 45 °C por un día en una estufa Esco Isotherm–OFA-54-9), 3-cocinada directa (en agua durante 5 minutos) y 4-cocinada en maito con sal (envueltos en hojas de bijao y asados hasta que las hojas se doraron) para un total de 48 muestras. En el caso de Lucián, el lugar del que la mayoría de personas obtiene el garabatoyuyo para su venta, se añadieron brotes provenientes tanto del suelo (estado fenológico I) como de frondas adultas (en estado fenológico IV) solamente para el tratamiento crudo. El número total de muestras fue de n=51. (Figura 8).

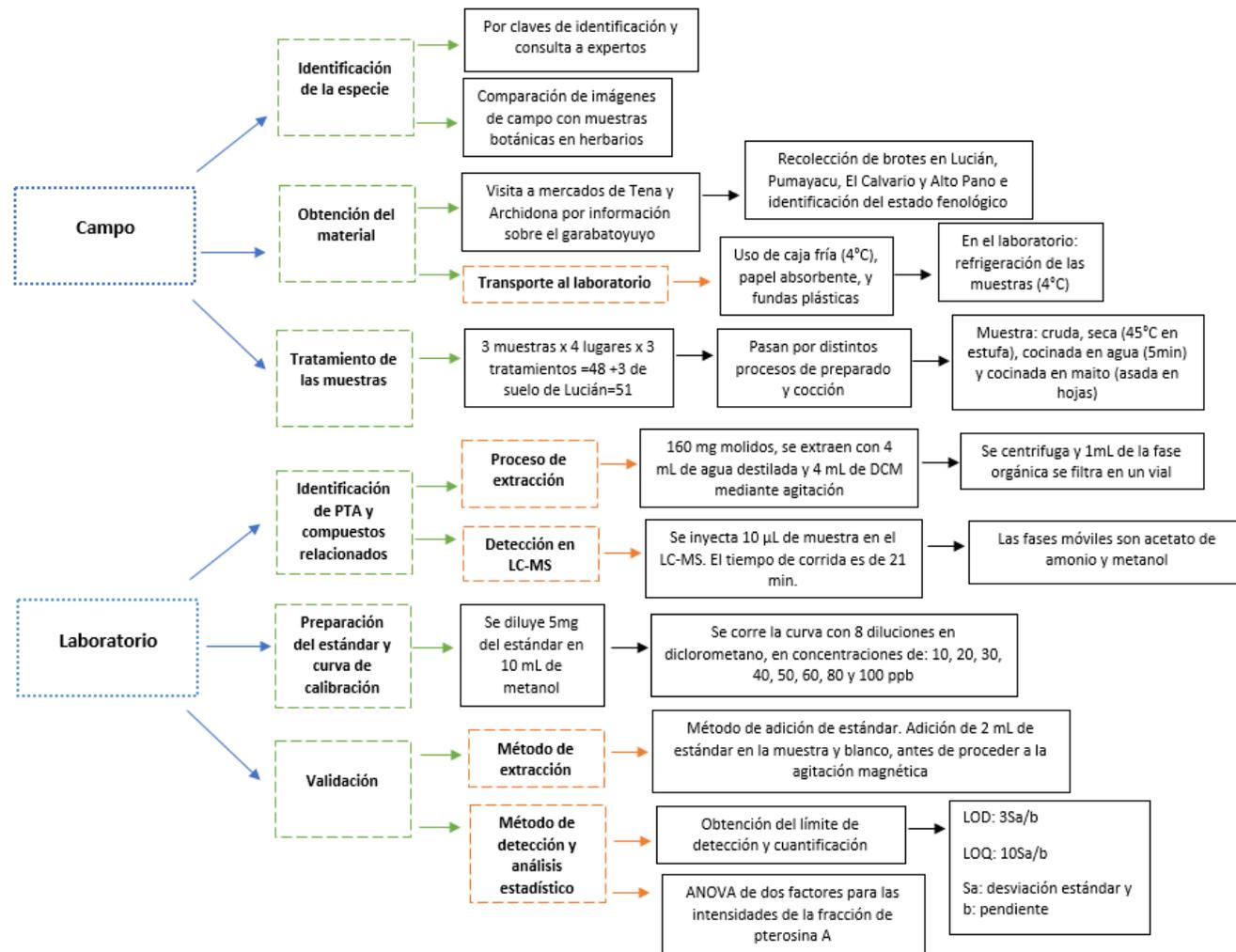


Figura 8. Descripción resumida de la metodología empleada para detección de PTA y compuestos relacionados. Dividida en campo que hace referencia a las actividades de identificación, recolección y tratamiento de las muestras y laboratorio para la detección de PTA y pterosinas.

Laboratorio

La extracción y detección se basó en el protocolo 4 de la tabla 3 [4], en función de los insumos necesarios, disponibilidad en Ikiam y de la sensibilidad de la técnica. En resumen, esta metodología permite la determinación de PTA y pterosinas de compuestos relacionados mediante LC-MS, que monitorea los iones moleculares y patrones de fragmentación característicos.

Los brotes procesados (160 mg-peso húmedo) fueron machacados y agitados con 4 mL de agua destilada y 4 mL de diclorometano mediante agitación magnética en vasos precipitados de 50 mL cerrados con aluminio durante 2 horas a 350 rpm. La mezcla fue traspasada a tubos cónicos para centrífuga de 15 mL y se centrifugaron (Centrífuga Sorvall ST40R, Thermo Scientific) a 3 000 rpm por 10 minutos para ayudar a separar las capas de los solventes. De la fase orgánica, se filtró 1 mL (filtro Millipore millex-GV de 0,22 µm, marca: Merck) que fue transferido a un vial para su análisis por LC-MS (cromatógrafo líquido con espectrómetro de masas Q-TOF, modelo: Acquity I Class UPLC Xevo G2-XS QTOF, marca: Waters (UPLC -esi(+)-MS)). Las muestras se inyectaron y eluyeron a un flujo de 0.3 mL/min con gradiente de metanol grado LC-MS (B) y acetato de amonio 10 mM (A) de la siguiente manera (Tabla 4):

Tabla 4. Gradiente empleado para las fases móviles.

Se empleó acetato de amonio 10mM y metanol (grado LC-MS) para las fases móviles. El tiempo de corrida total fue de 21 minutos y el flujo al que eluyeron las muestras fue de 0,3mL/min.

| Flujo | Tiempo (min) | %A (Acetato de Amonio) | %B (Metanol) |
|------------|--------------|------------------------|--------------|
| | Inicial | 95 | 5 |
| | 3 | 95 | 5 |
| 0,3 mL/min | 4 | 60 | 40 |
| | 15 | 10 | 90 |
| | 16 | 95 | 5 |
| | 21 | 95 | 5 |

Las condiciones para la corrida cromatográfica pueden ser observadas en la Tabla 5. El flujo de la columna se conectó a la fuente de ionización del espectrómetro de masas y se escaneó en el rango de masas de 100 a 800 uma [4].

Los perfiles cromatográficos fueron analizados mediante el paquete de software MassLynx™ (Corporación Waters). El primero fue el cromatograma total de iones (TIC) para todas las muestras de *H. parallelogramma* (con base a la Figura 11A). El segundo cromatograma muestra el pico específico para los compuestos analizados a un tiempo de retención definido (tanto para PTA como para pterosina A), el cual se obtuvo por la búsqueda de la m/z de los compuestos (Figura 11B). El tercero, es el espectro de masas para cada uno de los compuestos (Figura 11C).

Tabla 5. Condiciones para la corrida cromatográfica.

Estas condiciones fueron empleadas con todas las muestras analizadas de *H. parallelogramma* para la detección de PTA y compuestos relacionados. Los valores fueron establecidos antes de iniciar la corrida cromatográfica.

| Condiciones del LC | Condiciones del MS |
|--|-------------------------------------|
| Volumen inyectado: 10 µL | Sampling cone: 40V |
| Tiempo de corrida total: 21 minutos | Voltaje de capilaridad: 1kV |
| Columna: C18 130Å, 1.7 µm, 2.1 mm x 100 mm-Waters | Temperatura de la fuente: 120°C |
| | Temperatura de desolvatación: 500°C |

Curva de calibración para PTA

Con la finalidad de cuantificar PTA en las muestras, se realizó una curva de calibración utilizando un estándar de PTA. El estándar se adquirió de la casa ChemFaces con >=98% de pureza, identificado por RMN de ¹³C (Anexo 2, Figura 23).

Para la preparación de la solución madre del analito (disolución de concentración conocida) se agregó 5mg del estándar de PTA en 10 mL de metanol. Luego, se realizaron 8 diluciones

en diclorometano como disolvente en concentraciones de: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80 y 100 ppb para la curva de calibración[4]

Validación del método de extracción

Para la validación de la extracción, se usó el método de adición de estándar. Se agregó 2mL de estándar de PTA de 500 ppb a la muestra y luego al blanco, se los sometió a agitación magnética por dos horas, posteriormente se centrifugaron a 3 000 rpm por 10 minutos y finalmente, se analizaron en el LC-MS tanto la parte acuosa como la orgánica. Todo esto, para asegurar que el proceso de extracción fue el correcto y que la molécula que se analiza, está presente en la fase orgánica y no en la acuosa.

Límite de detección y cuantificación de PTA

El límite de detección (LOD-Limit of Detection) se define como la concentración mínima de una sustancia que puede ser detectada con fiabilidad por un método analítico. Éste no es necesariamente cuantificable mientras que, el límite de cuantificación (LOQ-Limit of Quantification) es la concentración más baja de un analito en una muestra que se puede determinar con precisión y exactitud aceptables bajo condiciones establecidas [66,67].

Para medir tanto el LOD como el LOQ, se obtuvo una regresión lineal de la curva de calibración del estándar de PTA junto a la ecuación de la forma: $y=a+bx$. El LOD y LOQ, se expresaron como [67]:

$$LOD = 3.3S_a/b,$$

$$LOQ = 10S_a/b,$$

Donde, S_a es la desviación estándar de la respuesta y b , la pendiente de la curva de calibración. Los valores se obtuvieron aplicando la herramienta de análisis de los datos a los puntos de la curva de calibración en la hoja de cálculo Excel.

Análisis estadístico

Para determinar diferencias en las intensidades de la fracción correspondiente a pterossina A entre las muestras de *H. parallelogramma* de distinta localidad, se realizó un ANOVA (análisis de varianza) de dos factores. Una prueba paramétrica que permite comparar las medias de dos o más grupos de variables (en este caso tres variables: tratamiento, lugar e intensidad de las muestras). Este análisis se desarrolló en la plataforma RStudio (versión R 3.6.2).

CAPÍTULO III: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS

Curva de calibración para PTA

A partir de los datos que se presentan en la Tabla 6 obtenidos del LC/MS, se calculó la curva de calibración para el PTA. Se obtuvo una regresión lineal (concentración del estándar vs área) con un coeficiente de correlación r de 0.995972 y un r^2 de 0.991961 junto a un gráfico de residuales para determinar si la regresión lineal es la adecuada (Figura 9).

Tabla 6. Datos de área, concentración y tiempo de retención del estándar de PTA para su curva de calibración.

La tabla muestra las concentraciones del estándar que se emplearon para realizar la curva de calibración, a más del blanco de diclorometano. El tiempo de retención promedio para la fracción correspondiente a PTA fue de 9,56 min.

| N° | Nombre | Tipo | Concentración (ppb) | RT | Área | %Dev |
|----|---------|----------|---------------------|------|------------|------|
| 1 | Blanco | Blanco | - | 9.54 | 27793.691 | - |
| 2 | Std_10 | Estándar | 10 | 9.52 | 74880.586 | 13.6 |
| 3 | Std_20 | Estándar | 20 | 9.54 | 100721.391 | -2.9 |
| 4 | Std_30 | Estándar | 30 | 9.54 | 127695.953 | -7.2 |
| 5 | Std_40 | Estándar | 40 | 9.56 | 159459.156 | -5.6 |
| 6 | Std_50 | Estándar | 50 | 9.57 | 184461.484 | -8.8 |
| 7 | Std_60 | Estándar | 60 | 9.59 | 239531.688 | 4.6 |
| 8 | Std_80 | Estándar | 80 | 9.59 | 307818.188 | 5.1 |
| 9 | Std_100 | Estándar | 100 | 9.61 | 362397.594 | 1.1 |

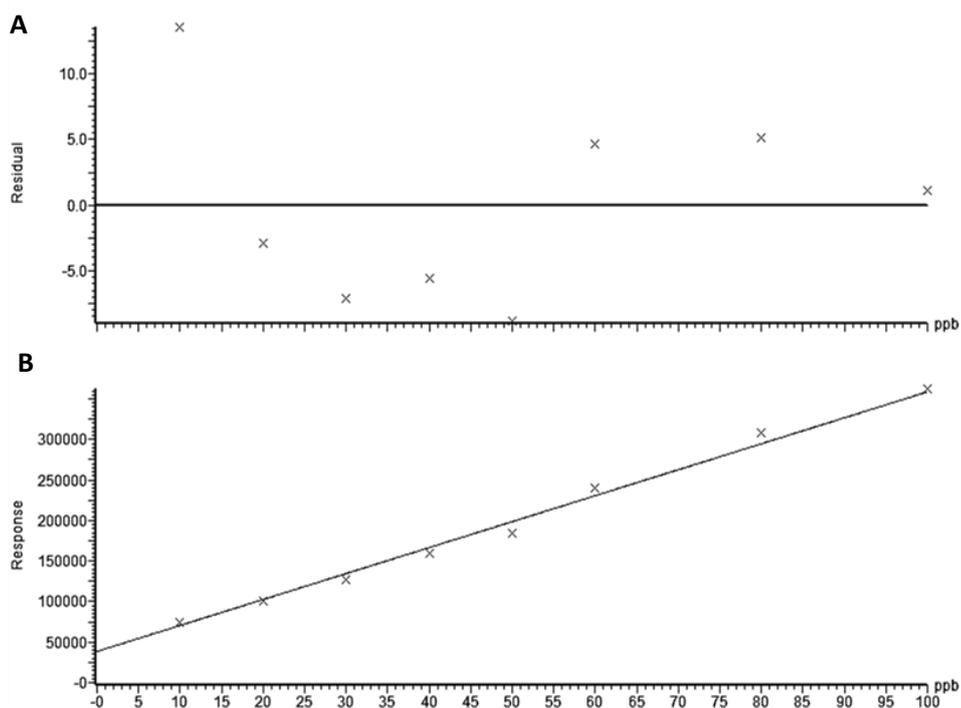


Figura 9. Curva de calibración para el estándar de PTA.

A. Gráfico de residuales para determinar si la regresión lineal es la adecuada. B. Regresión lineal con un coeficiente de correlación: $r = 0.995972$ y un $r^2 = 0.991951$ y una curva de calibración: $3202.14x + 38516.4$

Los picos de los estándares de menor (10 ppb) y mayor concentración (100 ppb) que sirven para la cuantificación de PTA se observan en la Figura 10. En la figura 10A, se observa el pico correspondiente a PTA y dos picos satélites con una m/z similar, sin embargo, estos pertenecen al blanco de diclorometano, por lo que se descartan. El tiempo de retención promedio fue de 9.56 min y la m/z de 399.163, correspondiente al ion precursor $[M+H]^+$.

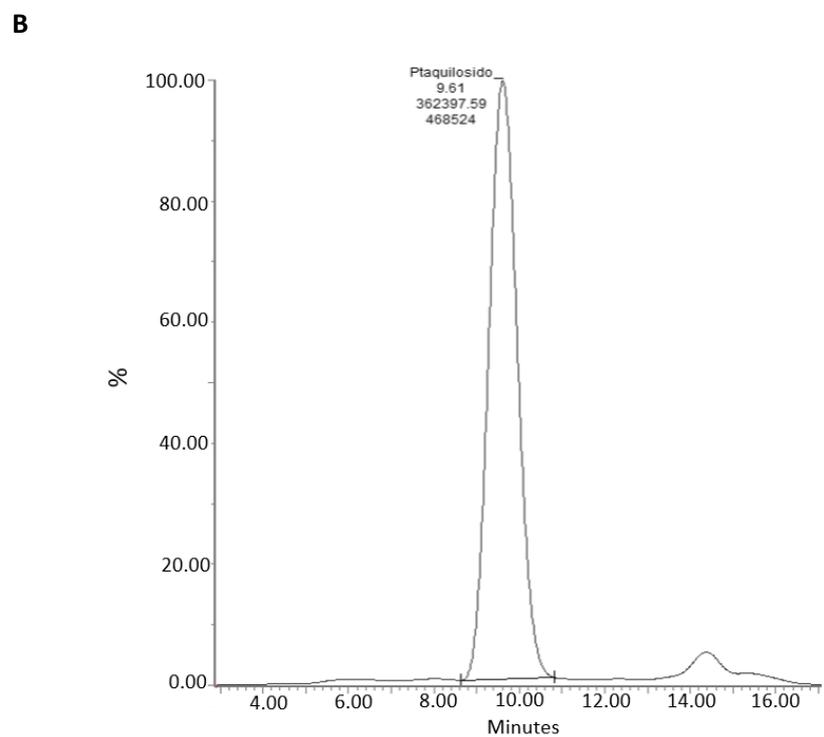
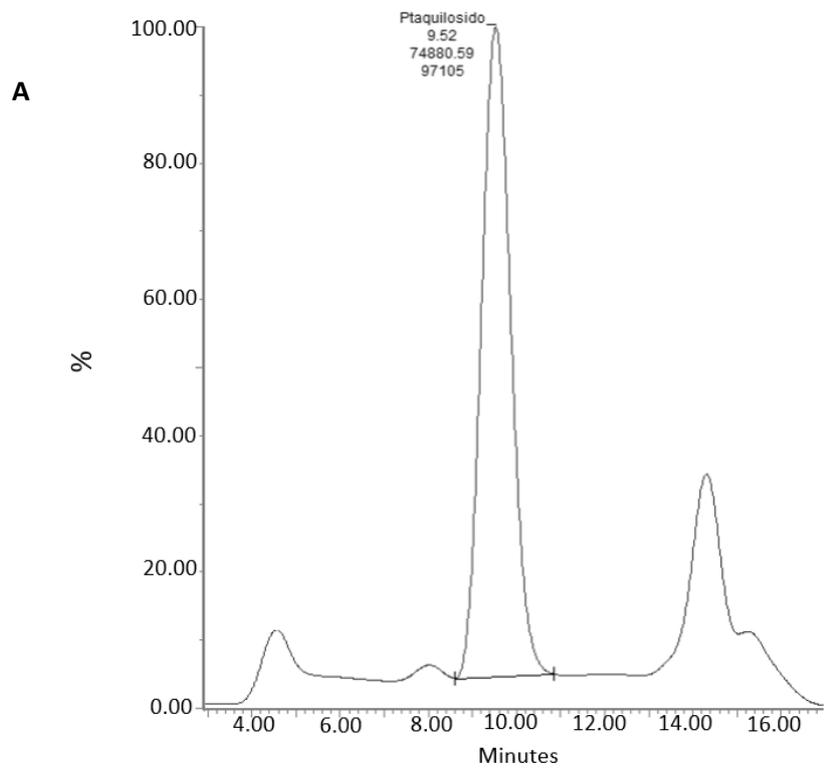


Figura 10. Perfil cromatográfico de los estándares de PTA para el pico de 399.163.

A: pico de 399.163 m/z para el estándar de 10 ppb y B: pico de 399.163 m/z para el estándar de 100ppb. Las fracciones que eluyen en los minutos 4.5 y 14.5 son parte del blanco de diclorometano.

Validación del método para LC-MS

Límite de detección y cuantificación de PTA

Los límites de detección y cuantificación para el PTA fueron los siguientes:

$$LOD = 3.3 * 18058.5/3202.14$$

$$LOD = 18.6 \text{ ppb}$$

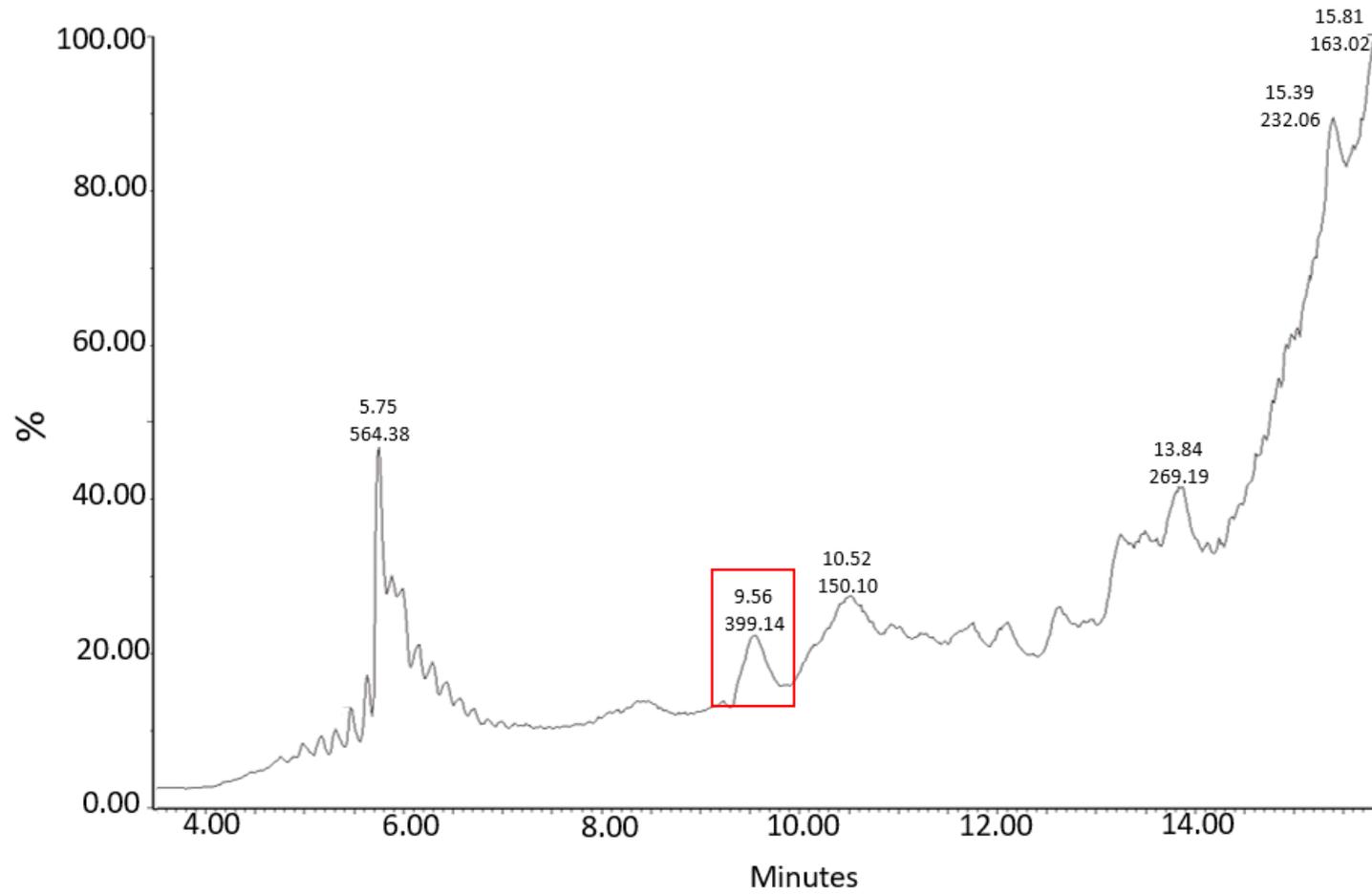
$$LOQ = 10 * 18058.5/3202.14$$

$$LOQ = 56.39 \text{ ppb}$$

Validación del método de extracción

Para validar el método de extracción, se añadió el estándar de 500 ppb tanto en el blanco como en una muestra cruda al azar y se inyectó la fase acuosa y la fase orgánica. El estándar, como se esperaba, estaba en las fases orgánicas del blanco y la muestra. El pico respectivo fue detectado en el equipo con un tiempo de retención de 9.54 min (Figuras 11 y 12), mientras que en la fase acuosa no se detectó ningún pico característico del PTA (Figura 13 y 14). De igual forma, al buscar la masa exacta de 399,16 m/z en otros tiempos de retención, no se obtuvo ningún resultado positivo (Figura 13 C y 14 C).

A



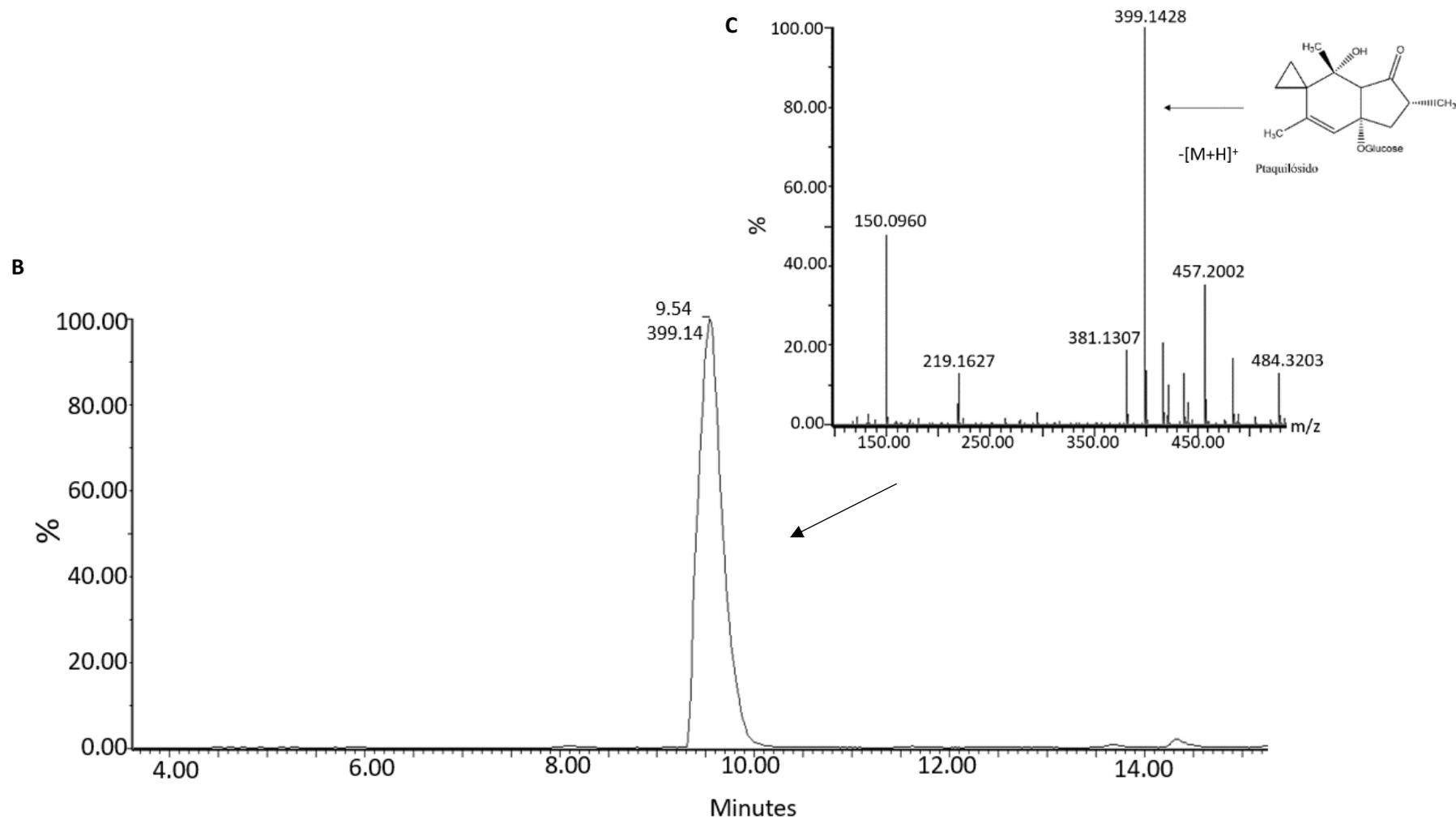
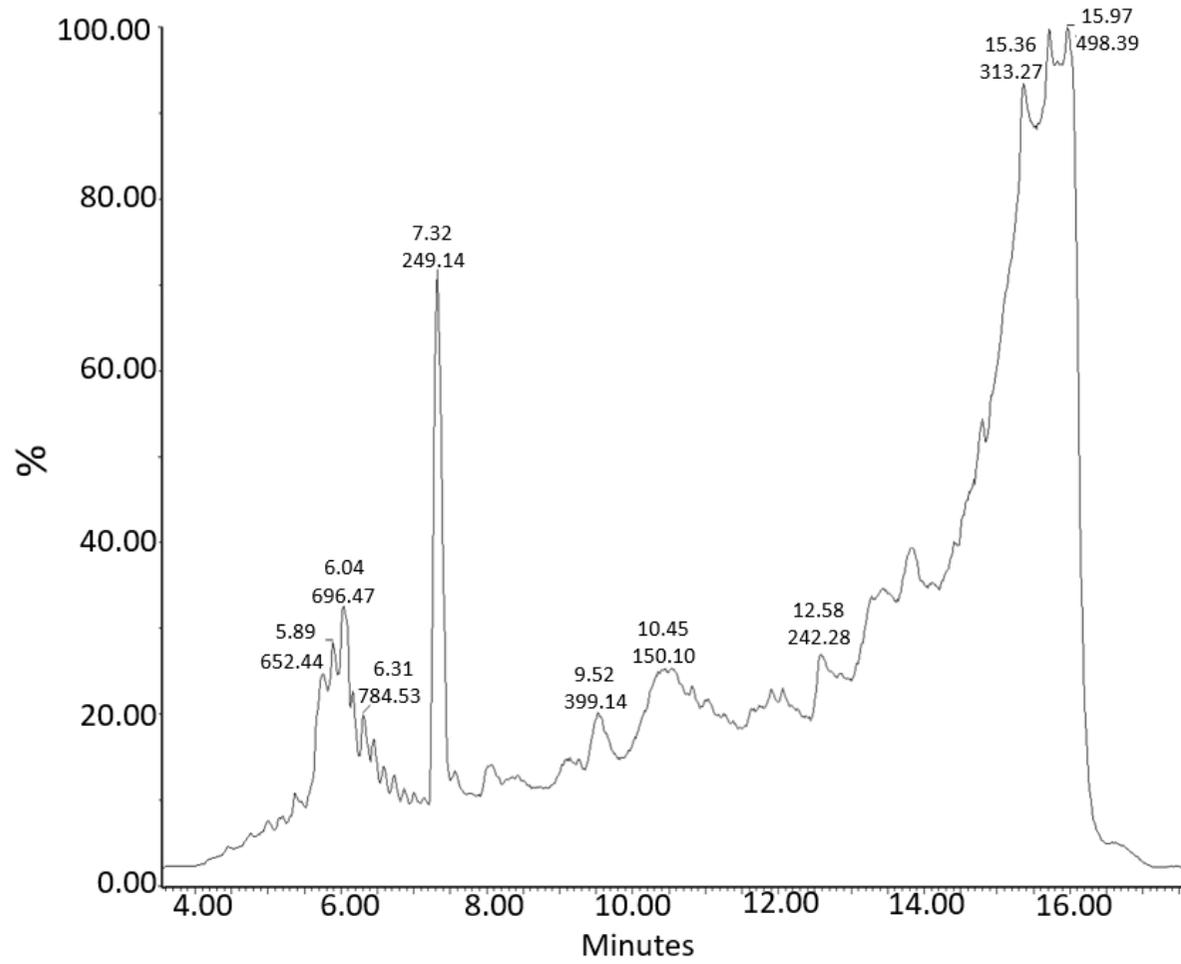


Figura 11. Perfil cromatográfico para el blanco de diclorometano (fase orgánica) con estándar de 500 ppb de PTA.

A: Perfil cromatográfico completo del blanco con una fracción que eluye en el minuto 9.54 correspondiente a PTA (rojo) B: Pico específico de PTA. C: Espectro de masas que muestra la m/z característica de 399 $[M+H]^+$, los otros picos son parte del blanco.

A



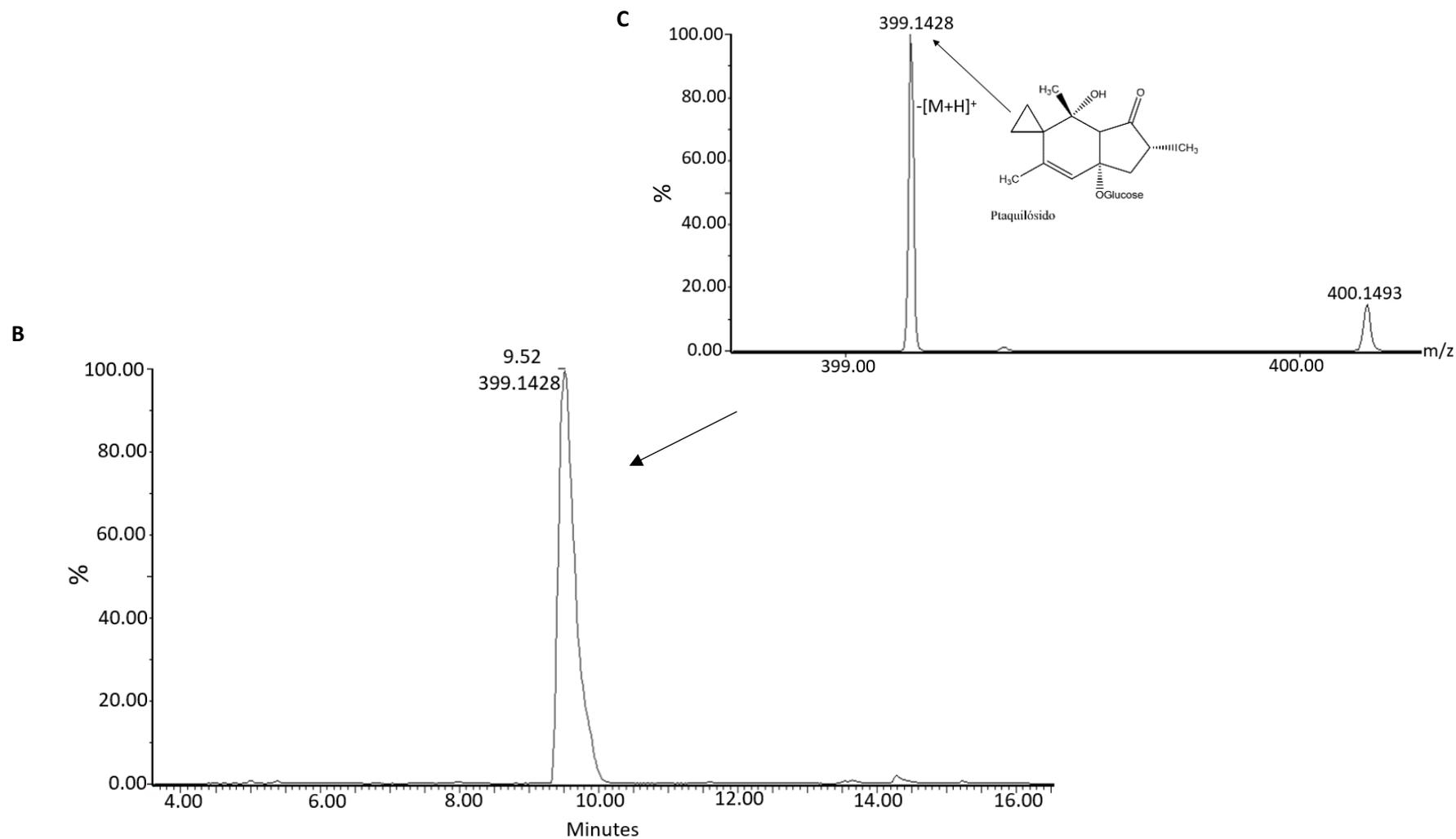
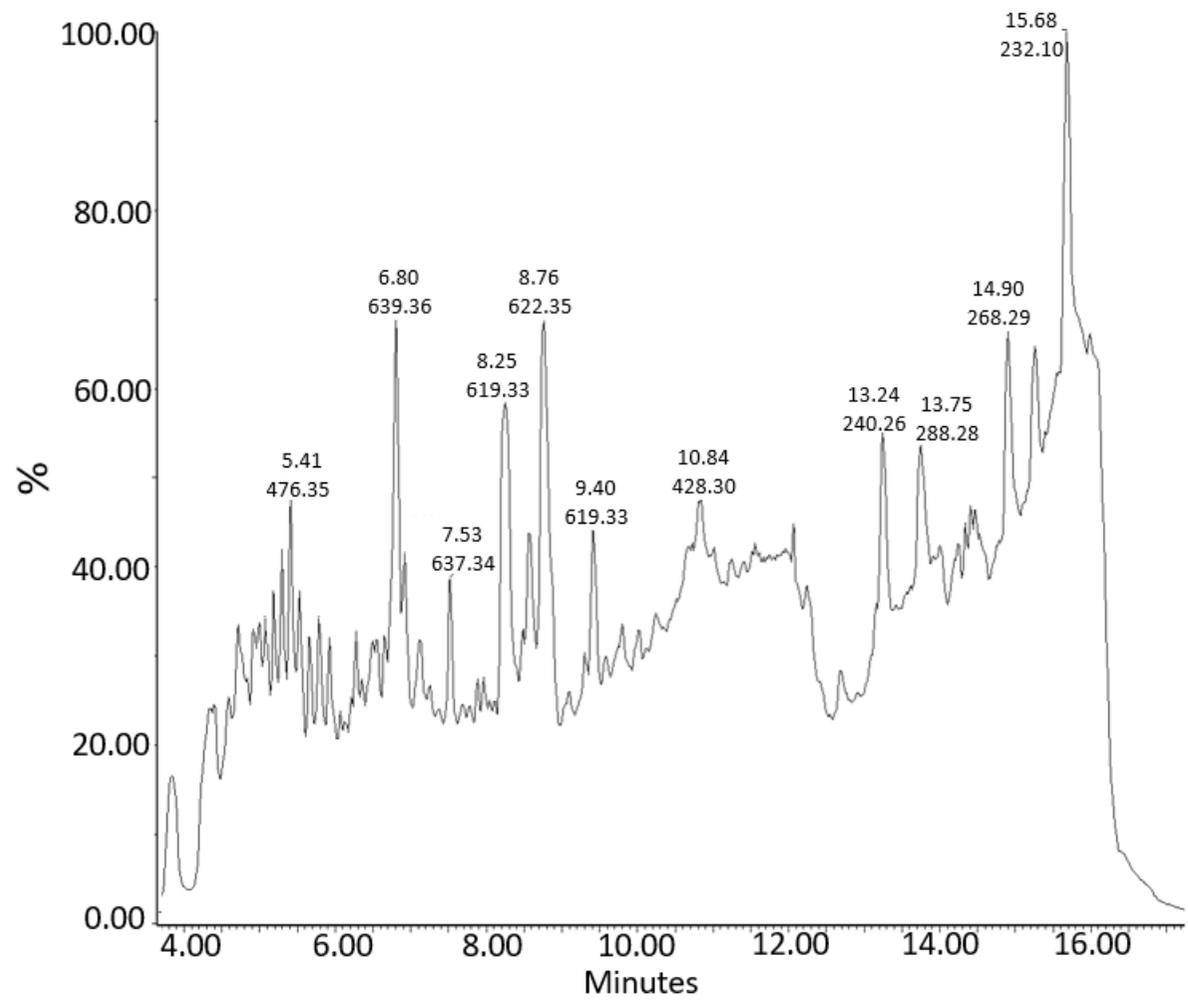


Figura 12. Perfil cromatográfico para muestra cruda de *H. parallelogramma* en diclorometano (alícuota de la muestra presente en la fase orgánica) con estándar de 500 ppb de PTA.

A: Perfil cromatográfico completo de la muestra con una fracción que eluye en el minuto 9.52 correspondiente a PTA. B: Pico específico de PTA. C: Espectro de masas que muestra la m/z característica de 399 $[\text{M+H}]^+$ para PTA.

A



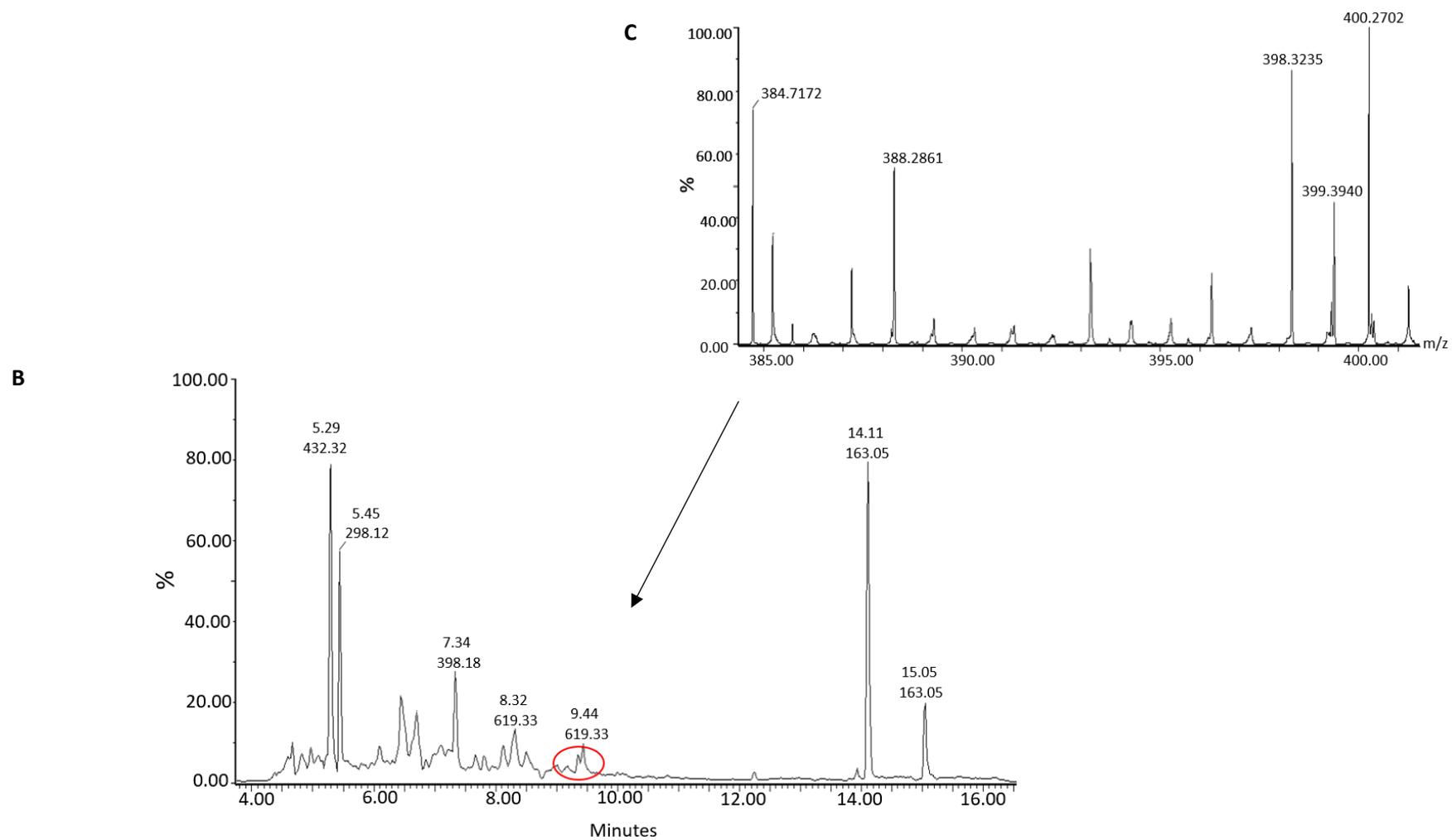
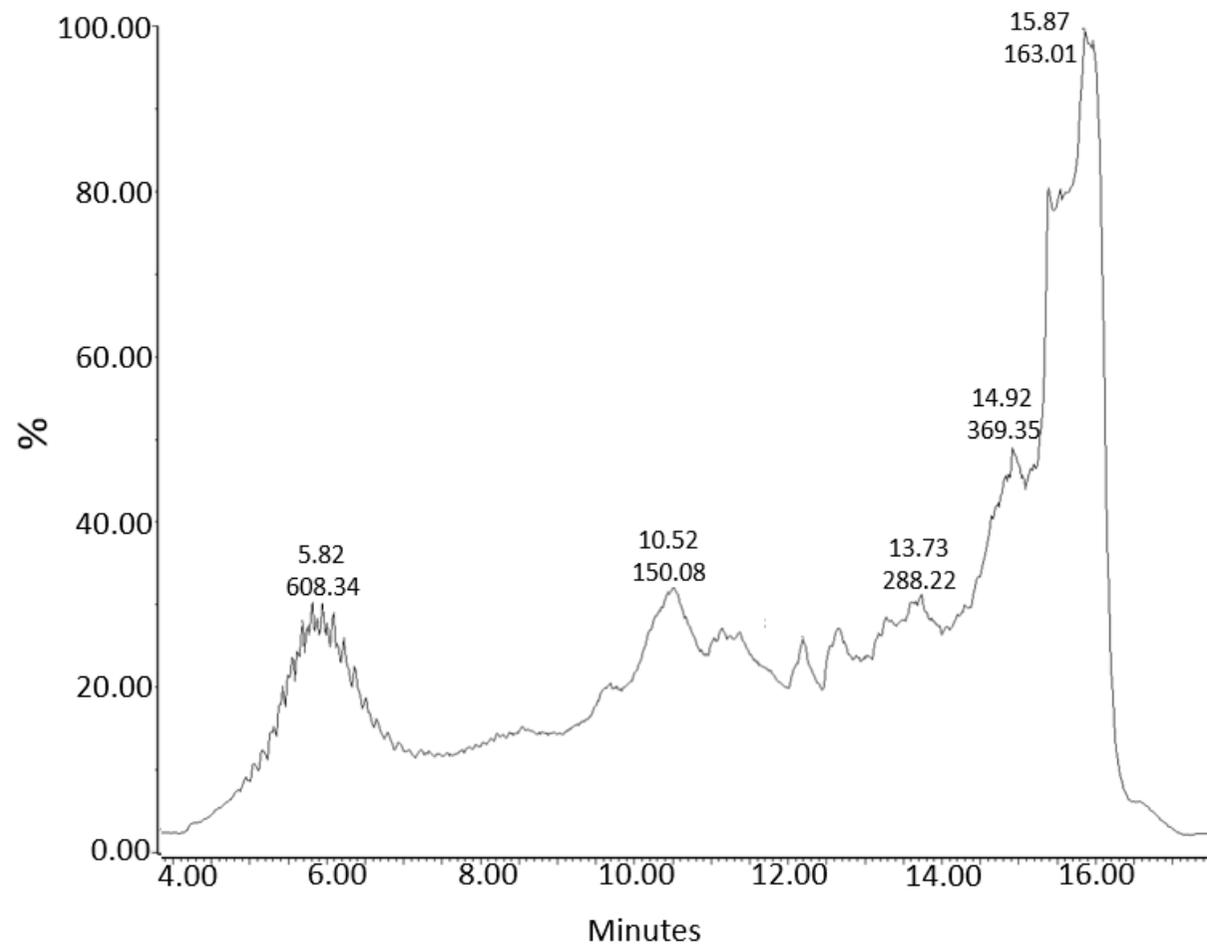


Figura 13. Perfil cromatográfico para el blanco de agua (fase acuosa) con estándar de 500 ppb de PTA.

A: Perfil cromatográfico completo del blanco sin presencia de la fracción correspondiente a PTA. B: No se detecta el pico de PTA, en un círculo rojo se observa el ruido. C: Espectro de masas que confirma la ausencia del pico de m/z 399 $[M+H]^+$ para PTA.

A



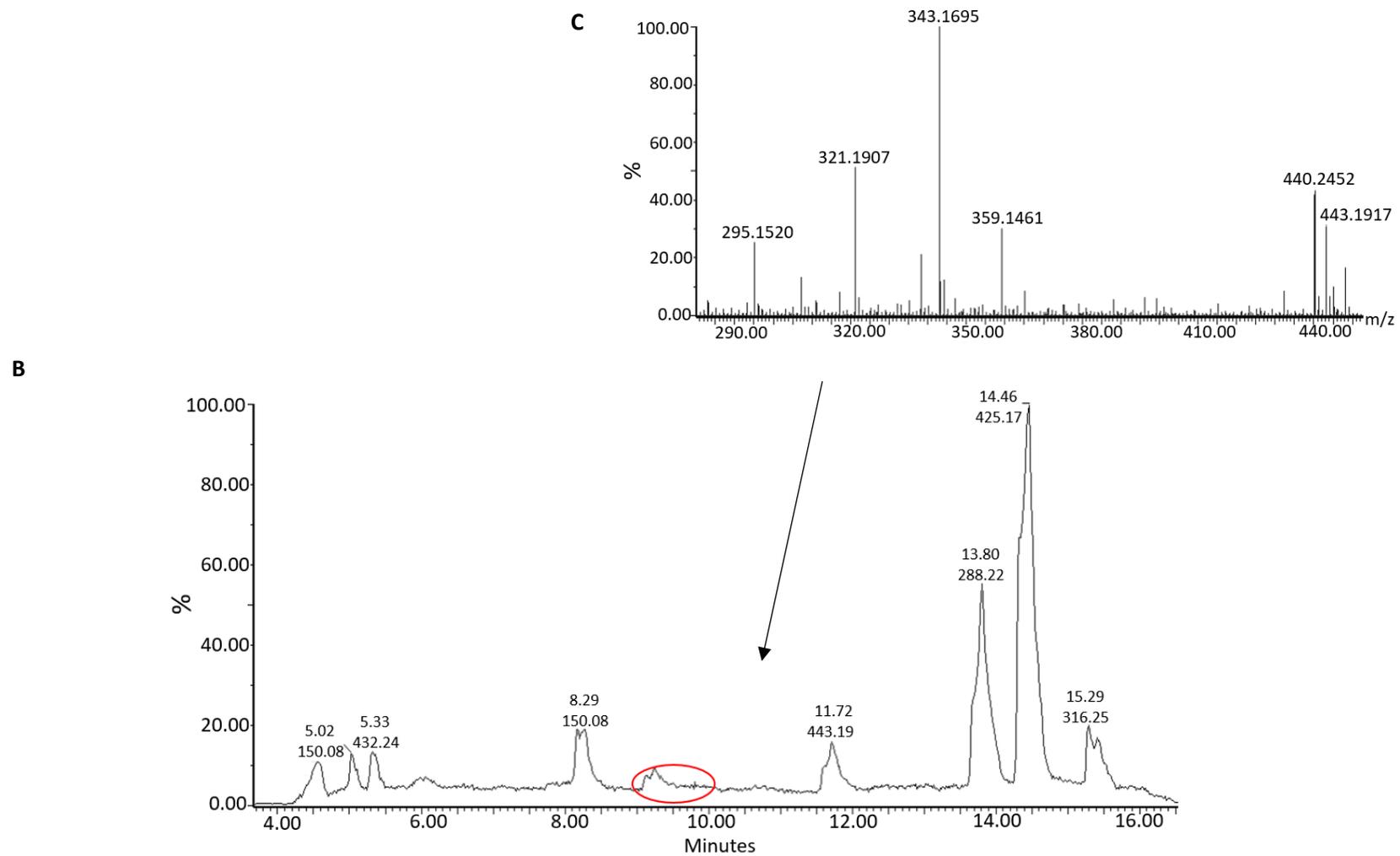


Figura 14. Perfil cromatográfico para muestra cruda de *H. parallelogramma* en agua (alícuota obtenida de la fase acuosa) con estándar de 500 ppb de PTA.

A: Perfil cromatográfico completo sin presencia de la fracción correspondiente a PTA. B: No se detecta el pico de PTA, en un círculo rojo el ruido. C: Espectro de masas que confirma la ausencia del pico con m/z 399 $[M+H]^+$ para PTA.

Identificación de PTA en las muestras

El blanco de diclorometano no presentó un pico parecido al de PTA, por lo que no interfirió en los resultados (Figura 15). De las 51 muestras analizadas, solamente en una de ellas (muestra de Alto Pano, tratada en fresco) se observó la masa característica del PTA (Figura 16). Sin embargo, éste no pudo ser cuantificado pues presentó un nivel menor del LOQ y LOD obtenidos previamente. Por lo que se descartó la presencia de PTA en las muestras.

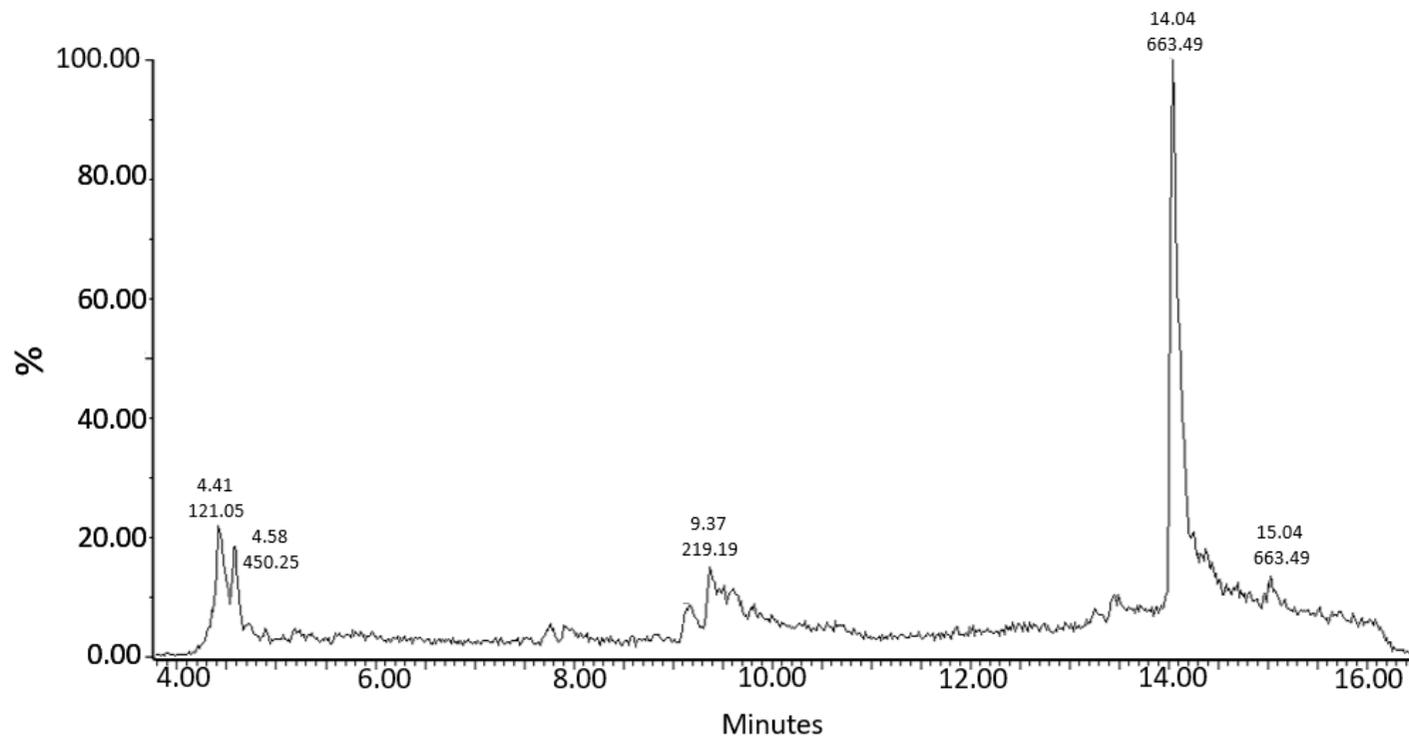
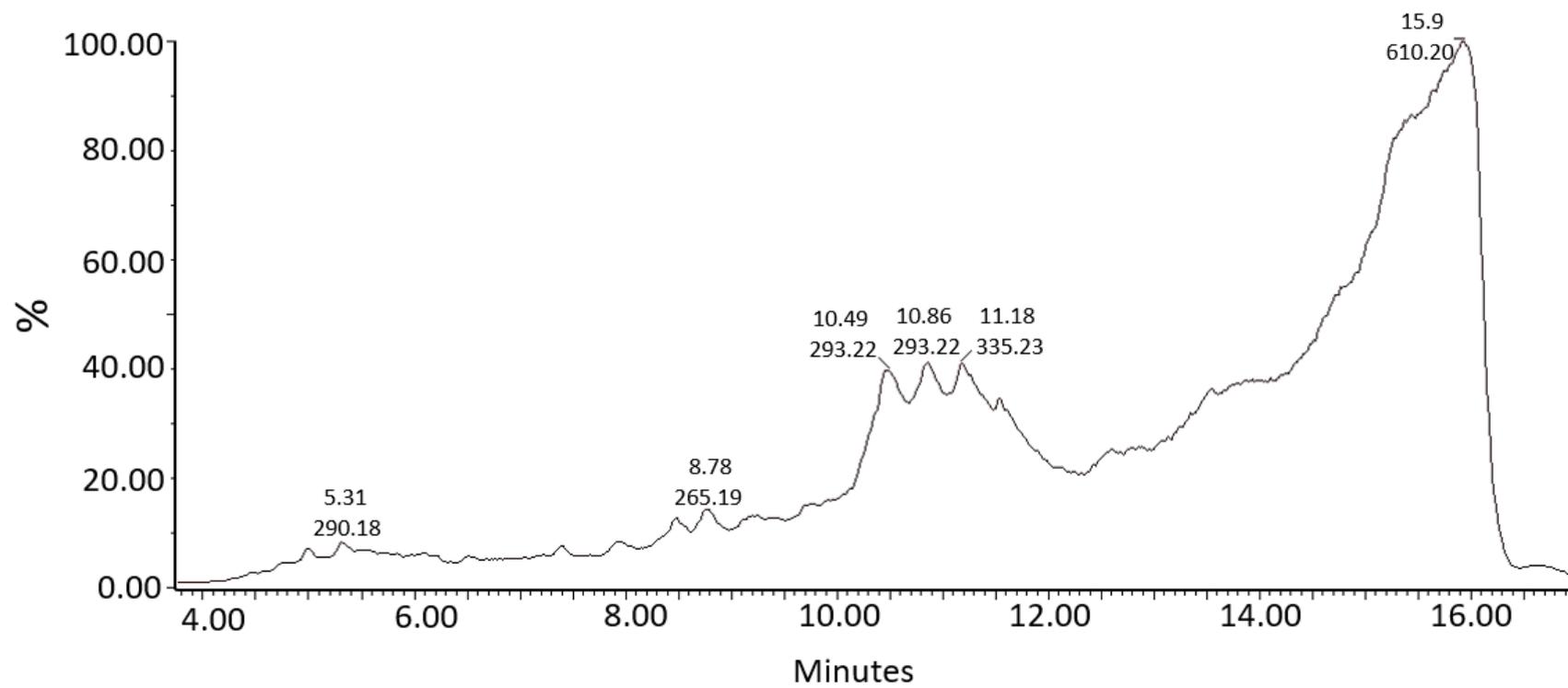


Figura 15. Perfil cromatográfico para el blanco de diclorometano, sin presencia del pico de 399 m/z para PTA.
Se pueden observar 3 fracciones que eluyen en los minutos 4.41, 9.37 y 14.04, que corresponden al blanco, lo demás representa ruido.

A



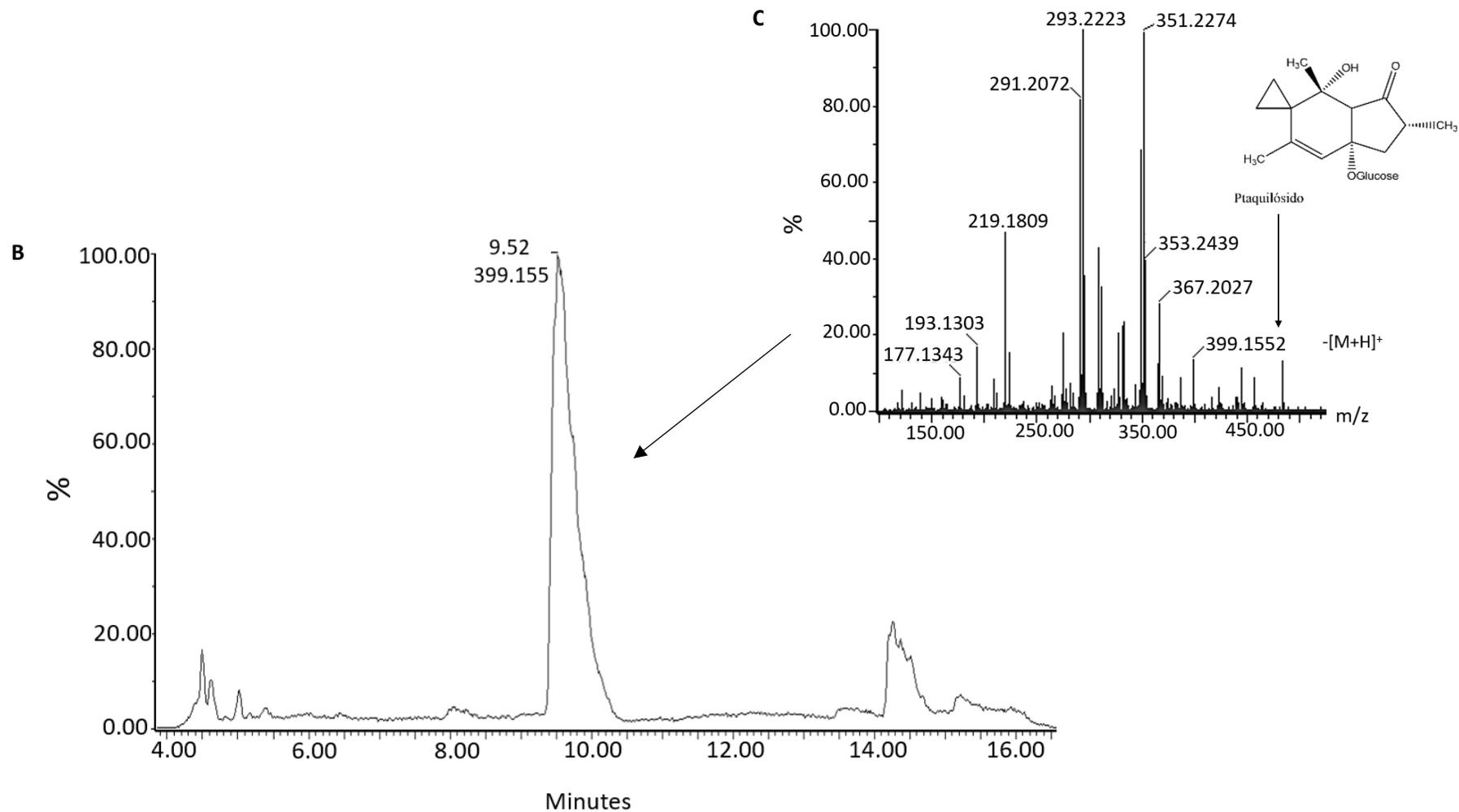


Figura 16. Perfil cromatográfico para la muestra de *H. parallelogramma* de Alto Pano con presencia del pico para PTA.

A: Perfil cromatográfico completo de la muestra, no se observa la fracción correspondiente a PTA. B: Pico integrable para PTA que eluye en el minuto 9.52.

C: Espectro de masas que muestra la presencia de m/z 399 [M+H]⁺ para PTA. Sin embargo, el valor se encuentra por debajo del LOD y LOQ.

Identificación de compuestos relacionados a PTA

Considerando que se descartó la presencia de PTA y que, mediante la verificación del proceso de extracción ningún compuesto con masa y perfil similar a PTB (compuesto de degradación de PTA) fue identificado, se prosiguió con la búsqueda de compuestos relacionados.

El análisis de los espectros de las diferentes muestras evidenció la presencia de pterosina A que se produce por la degradación del caudatósido (no encontrado en las muestras). El pico obtenido en el tiempo de retención de 7.32 con un m/z de 249 correspondiente al ion precursor $[M+H]^+$ de Pterosina A, fue visualizado junto a otros picos característicos [29,68] de 185.1187 ($C_{14}H_{17}^+$), 203.1300 ($C_{14}H_{19}O^+$) y 231.1261 ($C_{15}H_{19}O_2^+$), además de un pico de 271.1197 m/z de la forma $[M + Na]^+$ (Figura 18). No hubo necesidad de seleccionar el ion molecular y realizar otra fragmentación pues la ionización fue suficiente para visualizar su patrón característico. En el blanco de diclorometano, no se presentó la m/z característica de pterosina A, por lo que este disolvente no interfirió con los resultados (Figura 17).

Todas las muestras analizadas (n=51) presentaron los cinco picos característicos mencionados anteriormente. Al comparar los espectros de las muestras, se observan diferencias en la intensidad de su pico con m/z 249.1403 $[M+H]^+$ (Figura 19). La tabla 7 detalla los cambios en las intensidades del pico correspondiente a pterosina A dependiendo del lugar y los tratamientos. Las muestras en maito mostraron mayor estabilidad en el pico de 271 m/z característico al unirse al sodio.

Para las intensidades de pterosina A obtenidas en las muestras de cada lugar, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores (Tabla 7, 8 y Figura 20 A). Del análisis estadístico, no se encontraron diferencias significativas entre los lugares de procedencia

de las muestras, excepto entre Lucián y El Calvario (Figura 20A). A pesar de esto, cabe recalcar que se observó una tendencia de mayor intensidad de pterosina A para los tratamientos de muestras secas y en maito de Lucián y Pumayacu respecto al resto de lugares (Lucián en mayor medida). Además, en todos los tratamientos, las muestras que menores intensidades presentaron fueron las cocinadas, especialmente en Lucián y el Calvario. Con respecto a los procesados de las muestras, se encontraron diferencias significativas entre los mismos ($p < 0.05$), siendo la muestra seca, el tratamiento donde se encontró la mayor intensidad para la fracción de pterosina A (Figura 20B).

En cuanto a la diferencia entre los brotes recolectados tanto del suelo como de frondas adultas (estados I y IV) en Lucián, se encontró una mayor intensidad en las del estado I (Tabla 9).

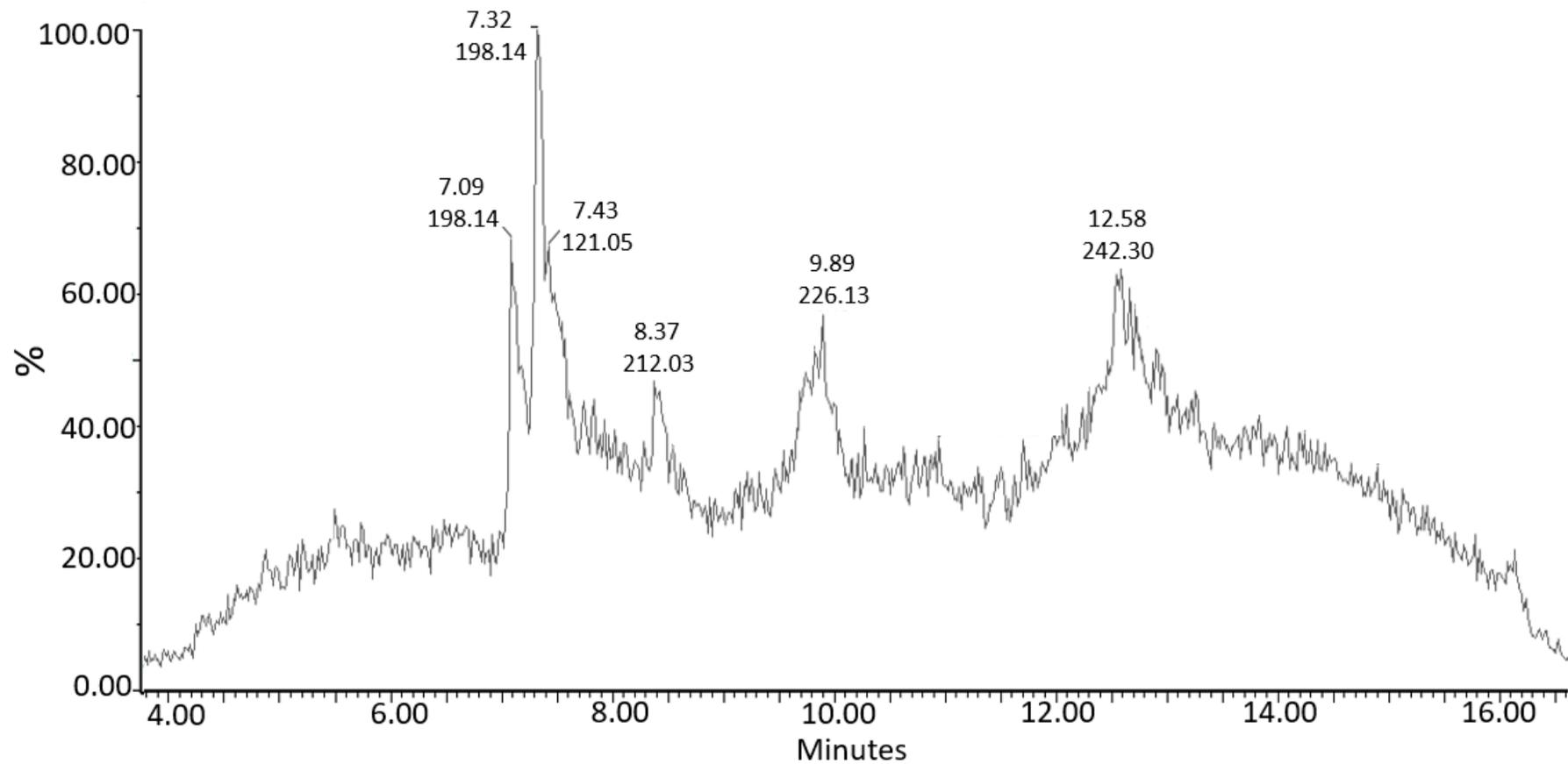
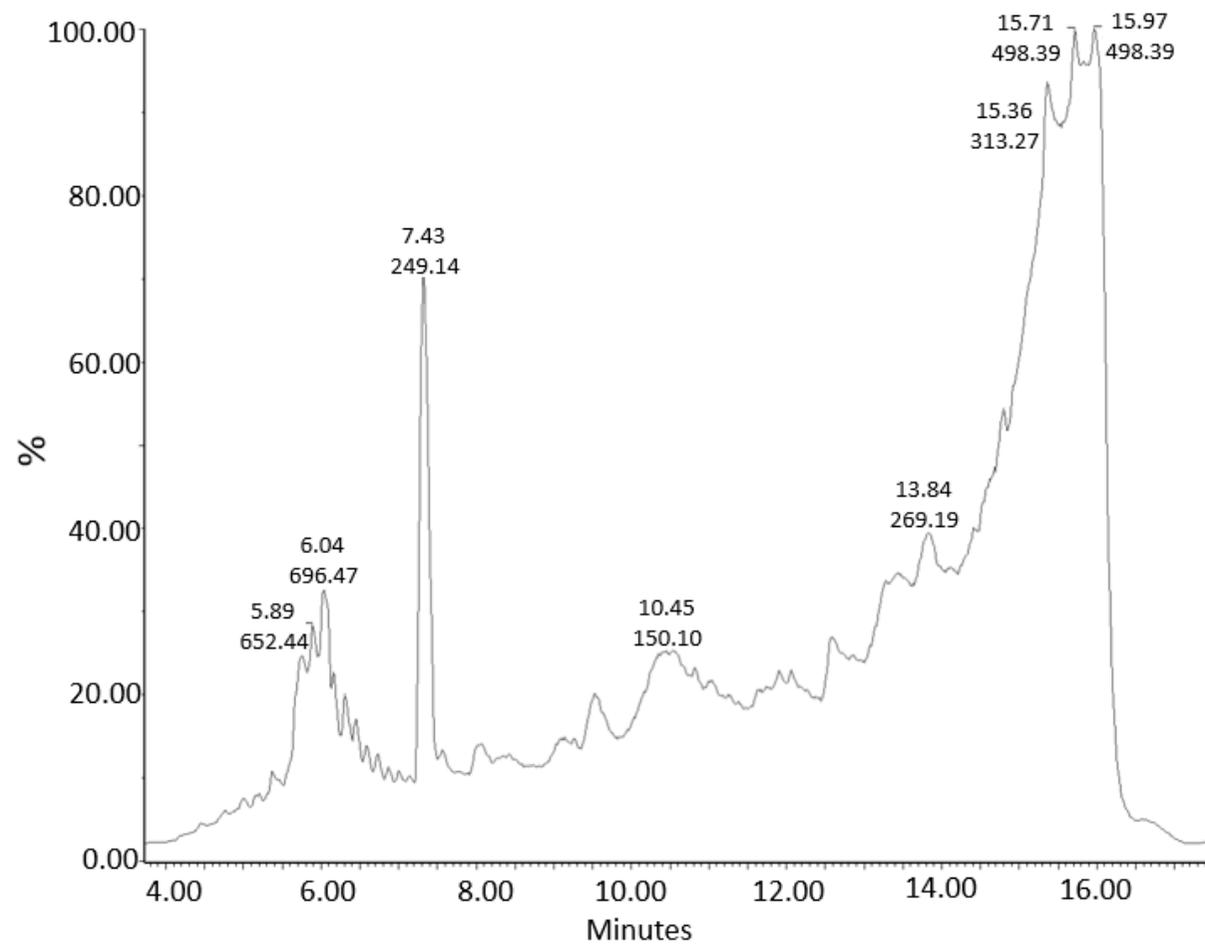


Figura 17. Perfil cromatográfico para el blanco de diclorometano sin presencia de un pico de m/z de 249.
 Lo que se puede observar son 5 fracciones pertenecientes al blanco y lo demás ruido. Se confirma la ausencia del pico de m/z 249 [M+H]⁺ perteneciente a pterosina A en el blanco.

A



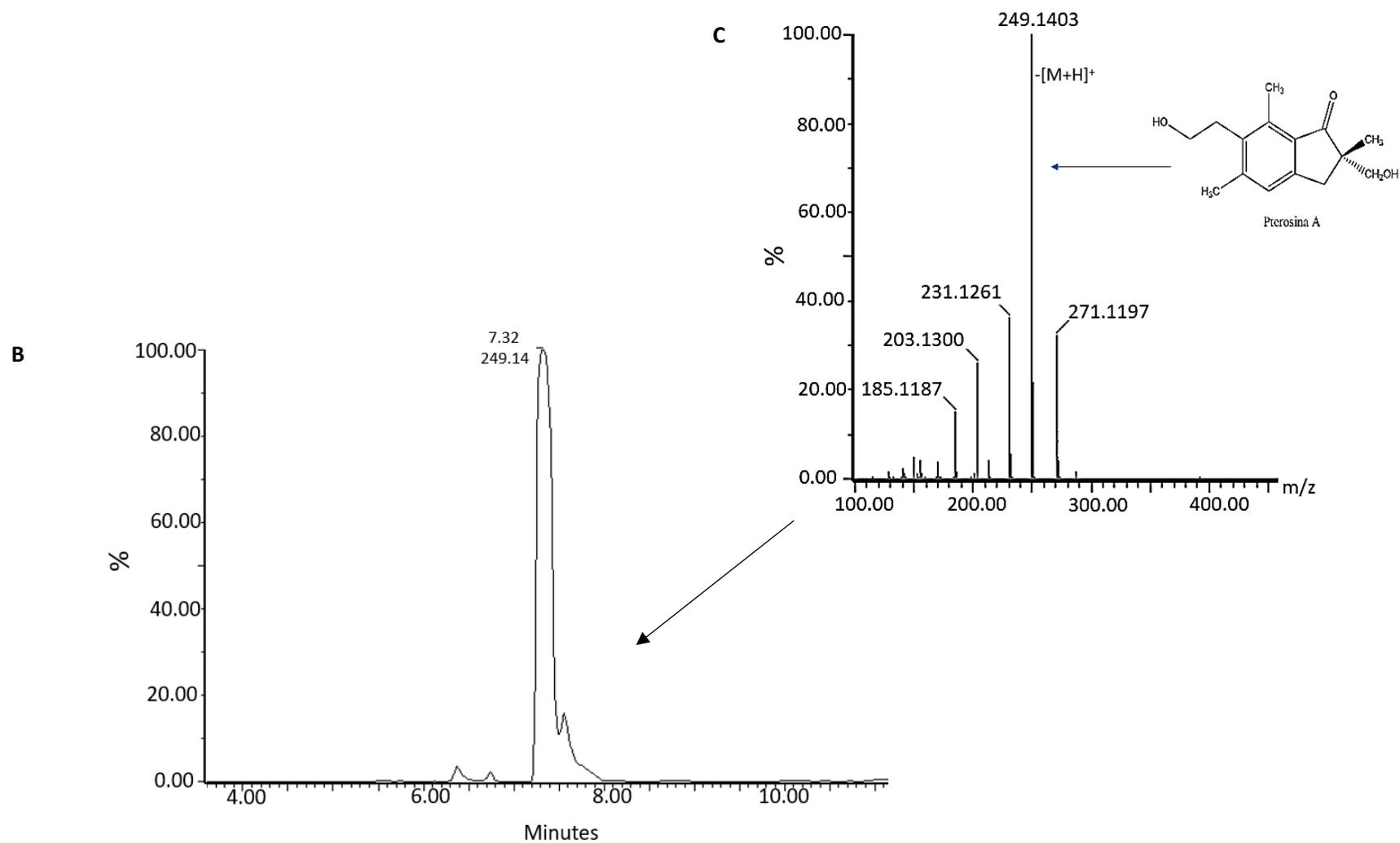


Figura 18. Perfil cromatográfico de una muestra de *H. parallelogramma* con la fracción correspondiente a pterosina A.

A: Perfil cromatográfico completo, se muestra el pico base de 249 m/z $[M+H]^+$ que eluye en el minuto 7.3. B: Vista del pico base de 249 $[M+H]^+$ saturado.

C: Perfil de fragmentación de Pterosina A, además del pico de 271 m/z $[M+Na]^+$.

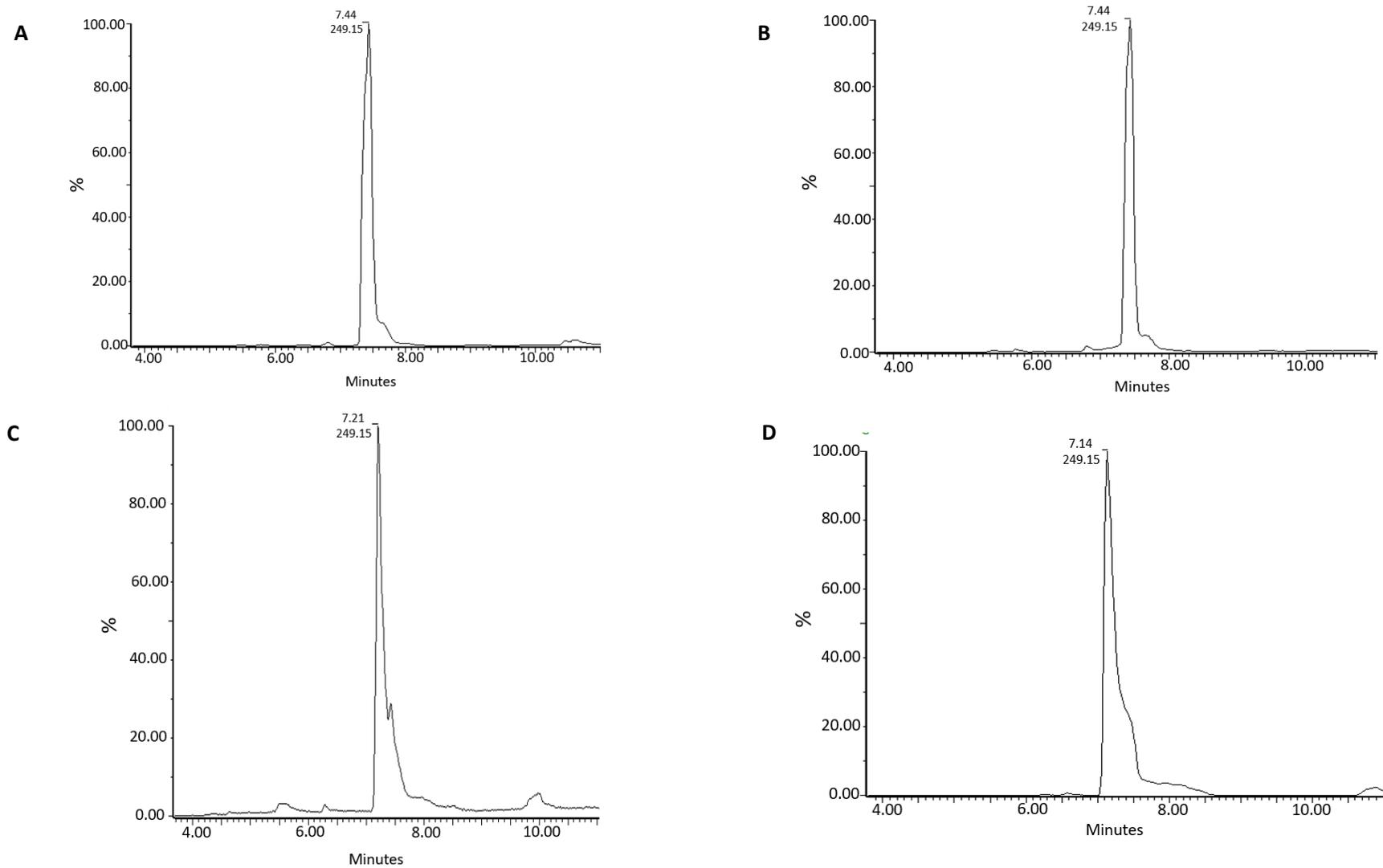


Figura 19. Perfiles cromatográficos que señalan el pico con m/z de 249 [M+H]⁺ sugerida como Pterosina A en muestras con diferentes tratamientos.
 La intensidad varía según el tratamiento y el lugar. A: muestra fresca. B: muestra seca. C: muestra cocinada. D: muestra en maito

Tabla 7. Intensidad de los picos con m/z 249 [M+H]⁺ para pterosina A en las muestras de *H. parallelogramma* según el tratamiento y lugar.

La tabla detalla las intensidades para la fracción correspondiente a pterosina A (en triplicado) y relaciona el procesado de la muestra con el lugar de procedencia, importantes para el análisis estadístico (ANOVA). *: Picos saturados. +: Picos de 271 m/z [M+Na]⁺ más estables.

| Tratamiento | Lugar | Intensidad 1 | Intensidad 2 | Intensidad 3 |
|------------------|-------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Muestra fresca | El Calvario | 4.39e5 | 4.35e5 | 4.30e5 |
| | Alto Pano | 2.13e6 | 2.11e6 | 2.20e6 |
| | Pumayacu | 2.57e6 | 2.57e6 | 2.40e6 |
| | Lucián | 2.88e6 | 2.78e6 | 2.81e6 |
| Muestra seca | El Calvario | 2.00e7 | 1.96e7 | 2.03e7 |
| | Alto Pano | 1.80e7 | 1.84e7 | 1.75e7 |
| | Pumayacu | 2.81e7* | 2.90e7* | 2.83e7* |
| | Lucián | 3.05e7* | 3.02e7* | 2.96e7* |
| Muestra cocinada | El Calvario | 2.08e5 | 2.03e5 | 2.10e5 |
| | Alto Pano | 1.96e6 | 1.89e6 | 2.00e6 |
| | Pumayacu | 1.22e6 | 1.25e6 | 1.21e6 |
| | Lucián | 4.56e5 | 4.56e5 | 4.44e5 |
| Muestra en maito | El Calvario | 4.84e6 ⁺ | 4.82e6 ⁺ | 4.84e6 ⁺ |
| | Alto Pano | 6.08e6 ⁺ | 6.03e6 ⁺ | 6.05e6 ⁺ |
| | Pumayacu | 1.37e7 ⁺ | 1.38e7 ⁺ | 1.41e7 ⁺ |
| | Lucián | 2.37e7 ⁺ | 2.35e7 ⁺ | 2.40e7 ⁺ |

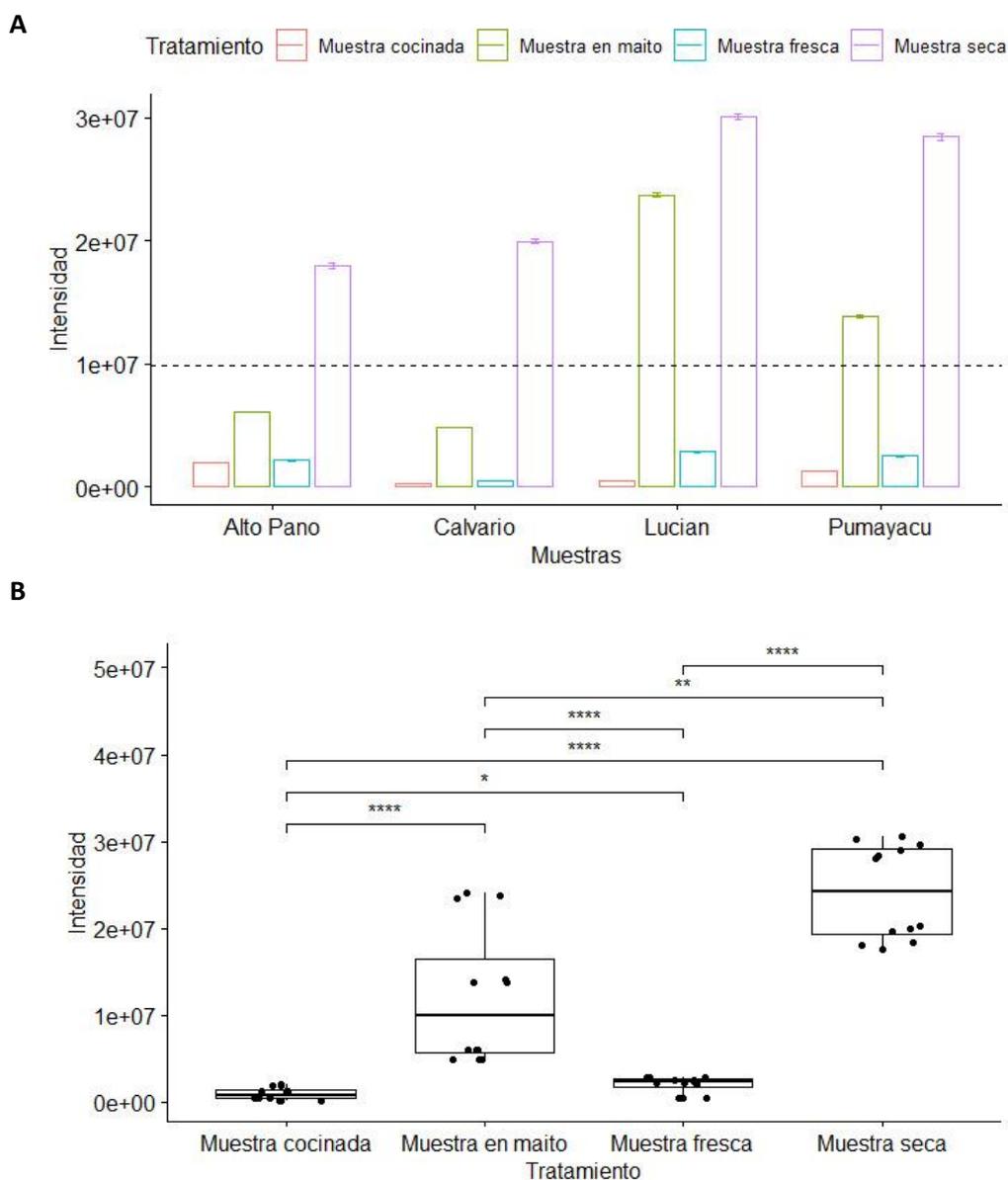


Figura 20. Diferencias en la intensidad del pico con m/z 249 $[M+Na]^+$ para pterosina A en muestras de *H. parallelogramma*.

A: Resultados del ANOVA de dos factores (lugar de procedencia y procesado de la muestra). Se puede observar que las muestras en maito y secas de Lucian y Pumayacu, presentan mayores intensidades. Las muestras con menores intensidades son las cocinadas, especialmente de El Calvario y Lucian.

B: Análisis estadístico que demuestra las diferencias significativas entre los tratamientos.

Tabla 8. Diferencias en la intensidad del pico m/z de 249 $[M+Na]^+$ en los brotes de *H. parallelogramma* provenientes de Lucian.

En la tabla, se comparan los valores de intensidad (triplicado) de las muestras crudas de Lucian dependiendo de su estado fenológico: brotes recolectados del suelo (estado I) y de frondas adultas (IV). Además, se pueden observar sus respectivas varianzas y desviaciones estándar.

| Estado Fenológico | Intensidad 1 | Intensidad 2 | Intensidad 3 | Promedio | Varianza | Desviación estándar |
|-------------------|--------------|--------------|--------------|----------|----------|---------------------|
| IV | 2.88e6 | 2.85e6 | 2.90e6 | 2,88e06 | 4,22e08 | 20548,05 |
| I | 6.54e6 | 6.53e6 | 6.51e6 | 6,53e06 | 1,56e08 | 12472,19 |

CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN

El análisis de 51 muestras de brotes del helecho *H. parallelogramma* en comunidades de Napo, sugiere la presencia de Pterosina A en la totalidad de las muestras (Figura 18 y 19). Los picos encontrados son similares a los identificados en bases espectrales [68], que revelan 5 picos característicos, el último de 271 del tipo $[M + Na]^+$, mucho más estable y con más intensidad en condiciones salinas de muestras de tratamiento en maito.

La presencia de pterosina A en los brotes de garabatoyuyo es coherente con lo encontrado en otras especies del género como en *H. punctata*, pese a que esta especie es originaria de China [21]. La presencia de PTA y compuestos relacionados también ha sido documentado en otras especies en lugares distantes indicando que esta característica puede deberse a un mecanismo de defensa frente a cualquier ataque de animales, aunque sigue siendo un tema de debate [17].

Por otra parte, como se observa en la Tabla 7, las intensidades del pico de 249 m/z de la forma $[M + H]^+$ varían para cada uno de los tratamientos y los lugares, presentándose picos más intensos en las muestras secas y en maito de Lucían. Esta intensidad podría estar relacionada con la abundancia del helecho en este lugar, como se ha observado en otros estudios en Nueva Zelanda con *Pteridium esculetum* (G. Forst.) Cockayne [38] donde encontraron una correlación positiva entre la densidad del helecho y la producción de estos compuestos. Sin embargo, se requieren futuros análisis cuantitativos que permitan conocer si la intensidad observada en las muestras está relacionada con la concentración.

Las muestras cocinadas para todos los lugares mostraron una reducción en la intensidad de los picos (Tabla 7), lo cual podría ser consecuente con estudios donde se ha demostrado que el calentamiento, conduce a una disminución de los compuestos y una posible

reducción de la toxicidad, atribuible a la inestabilidad térmica de los principios activos (pteridienona) [69]. En un estudio en Japón, con helechos procesados (tratados con agua hirviendo, cenizas de madera, bicarbonato de sodio y NaCl), se demostró que, a pesar de la reducción de estos compuestos, la actividad cancerígena se conservaba en el helecho. Una actividad más leve que en helechos crudos, pero que era capaz de producir el desarrollo lento de tumores en ratas de experimentación [50,70].

Con referencia a la comparación entre los brotes recolectados del suelo y de frondas adultas (I y IV, respectivamente. Tabla 8) en Lucién, se observó diferencias en la intensidad de picos para las muestras recién brotadas del suelo (I). Estudios y análisis adicionales son fundamentales para la cuantificación de este compuesto y relaciones correspondientes. Este resultado podría responder a la hipótesis propuesta de que los compuestos son un mecanismo de defensa de la planta al momento en el que comienzan a emerger los brotes, pues trasladan el PTA y compuestos relacionados, a los mismos para protegerlos [71].

El PTA y sus compuestos relacionados pueden también generarse por estrés ante las condiciones climáticas, el tipo de suelo y su uso. Se ha verificado que los cortes de los helechos pueden aumentar la cantidad de PTA y compuestos relacionados en los rebrotes y en el ambiente, a diferencia de aquellos helechos que no han sido perturbados [72]. Dado que Lucién parece ser el lugar de donde más se obtiene el garabatoyuyo para su venta, los individuos pueden estar sujetos a corte constante de sus brotes y hojas (observación personal y comunicación con Rosalina Chimbo Alvarado de la comunidad de Lucién), lo cual deberá analizarse mediante la cuantificación de este compuesto.

Aunque el caudatósido, del que se produce la pterosina A, no fue encontrado en las muestras, la presencia de su respectiva pterosina indica que el caudatósido se encuentra

en la planta viva (como ha sido demostrado en varios estudios que analizan las pterosinas para rastrear la presencia previa de estos compuestos) [21,29,52,73–78]. En un estudio realizado en frondas adultas del género *Pteridium*, se demostró que en ocasiones pueden encontrarse tanto las pterosinas como el PTA y componentes relacionados, o en otros casos pueden encontrarse únicamente las pterosinas [29]. Se considera que, las pterosinas normalmente no están presentes en plantas vivas, sino que son productos de degradación de moléculas como el PTA, caudatósido, o pueden producirse durante el tratamiento de la muestra (dependiendo de los solventes empleados) [29].

En relación al caudatósido, en un estudio realizado en Venezuela en *P. aquilinum var. caudatum*, se indicó que el contenido de caudatósido va descendiendo desde el primer estado fenológico del helecho hasta que llegan a adultos [64], siendo los brotes los que conservan una mayor actividad cancerígena, por lo que su consumo podría representar un riesgo para la salud [50]. Adicionalmente, el caudatósido puede encontrarse en los brotes a mayores concentraciones superando al PTA (que en ocasiones también puede estar presente), lo que aumenta el potencial carcinogénico de la planta [64].

Finalmente, se demostró que una cuantificación únicamente dirigida al PTA no representa el contenido total de los glucósidos del tipo Iludano reactivos que existen en la planta [29], por lo cual es importante buscar compuestos relacionados a éste en las muestras como hypacrone y caudatósido. Mientras más compuestos tóxicos sean identificados en la planta, mayor es la probabilidad de carcinogenicidad. Como consecuencia, se debe realizar el estudio completo de la planta.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

- En efecto, *H. parallelogramma* como otras especies de la familia Dennstaedtiaceae posee un glucósido del tipo iludano.
- En el análisis de las 51 muestras de brotes del helecho *H. parallelogramma* en comunidades de Napo, se descartó la presencia de PTA y se sugiere la presencia de pterosina A (producto de degradación de caudatósido) en todas.
- En Lucían, los brotes que recién emergen del suelo poseen una mayor intensidad del pico para pterosina A comparados a los brotes recolectados de frondas.
- Se observó una mayor intensidad del pico para pterosina A en las muestras secas y una reducción de la misma en todas las muestras cocinadas, que podría estar relacionado a la inestabilidad térmica de estos compuestos. Pese a ello, aún se requieren estudios cuantitativos junto a un estándar para su confirmación.

Recomendaciones

- A pesar de que se sugiere la presencia de pterosina A por los cinco picos característicos en la totalidad de las muestras analizadas; es necesario continuar con la cuantificación junto a un estándar para conocer si la intensidad para el pico de pterosina A está relacionada con la concentración de este compuesto.
- Además, es necesario continuar con la comprobación de otros glucósidos de tipo iludano que pueden estar presentes en *H. parallelogramma* como hypacrone y ptaquilósido Z, con estándares que permitan realizar sus respectivas detecciones y cuantificaciones.

- Se recomienda analizar la presencia de PTA y compuestos relacionados en esta especie de helecho a lo largo del año, para determinar si existe una variación como consecuencia de sus fases de latencia, crecimiento, maduración y senescencia o con los datos de clima.
- Se propone, realizar estudios basados en el estrés fisiológico que sufre la planta por pastoreo o por corte constante, que afectan en la concentración de los compuestos cancerígenos. Esto traería consigo el mejor manejo de la especie dentro de la provincia, así como su control en áreas donde posee dominancia.
- Considerando que comunidades como Awá, Cachi, Tsáchila y otras pertenecientes a las zonas rurales de Ecuador, consumen helechos, es importante determinar la presencia de compuestos tóxicos que podrían representar un gran riesgo para los seres humanos y animales.
- Es necesario realizar ensayos de toxicidad para analizar el rol que tienen estos compuestos ante enfermedades como el cáncer y la HEB.

REFERENCIAS

1. Vázquez AJD, Arregui LP. Helechos amenazados de Andalucía: avances en conservación. 2da ed. Sevilla: Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía; 2010.
2. Navarrete H. Helechos comunes de la amazonia baja ecuatoriana. 1ra ed. Quito: Editorial Simbioe; 2001.
3. Øllgaard B, Tind K. Scandinavian ferns: a natural history of the ferns, clubmosses, quillworts, and horsetails of Denmark, Norway and Sweden [keys]. 1st ed. Copenhagen: Rhodos; 1993.
4. Rincón DF, Díaz GJ, Gardner DR. Detección de ptaquilósido en diferentes estados fenológicos de “helecho macho” (*Pteridium aquilinum*) y análisis de muestras de leche en granjas con hematuria en Tolima, Colombia. CES Med Vet y Zootec. 2016;11(1): 72–77. doi:10.21615/cesmvz.11.1.7
5. Muñiz Díaz de León M, Mendoza Ruiz A, Pérez García B. Usos de Los Helechos y Plantas Afines. Etnobiología. 2007;5: 117–125.
6. Arana MD, Bianco CA. Helechos y Licofitas del centro de Argentina. 1era ed. Río Cuarto: Editorial Universidad Nacional de Río Cuarto; 2011.
7. Chettri S, Manivannan S, Muddarsu VR. Nutrient and Elemental Composition of Wild Edible Ferns of the Himalaya. Am Fern J. 2018;108(3): 95–106. doi:10.1640/0002-8444-108.3.95
8. Turner N, Gottesfeld L, Kuhnlein H, Ceska A. Edible wood fern rootstocks of Western North America: Solving an ethnobotanical puzzle. J Ethnobiol. 1992;12(1):

1–34.

9. Martínez OG, Assis FC, Meza Torres EI, Cacharani DA, Jaimez DG. El género *Pecluma* (Polypodiaceae) en Argentina. *Darwiniana*. 2016;4(2): 234+. doi:10.14522/darwiniana.2016.42.719
10. Navarette H, León B, Gonzales J, Aviles DK, Lecaro JS, Mellado F, et al. Helechos. 1era ed. In: Moraes M, Øllgaard B, Kvist LP, Borchsenius F, Balslev H, editors. *Botánica económica de los Andes centrales*. 1era ed. La Paz; 2006. pp. 385–411.
11. Asanza M, Reyes D, Carrillo L, Cruz G. Etnobotánica de helechos del nororiente ecuatoriano. *Rev Amaz Cienc y Tecnol*. 2012;1(3): 186–209. Available: <https://biblat.unam.mx/en/revista/revista-amazonica-ciencia-y-tecnologia/articulo/etnobotanica-de-helechos-del-nororiente-ecuatoriano>
12. Carranza Caiza JI, Samaniego Duque LX. Proyecto para la Creación de un Centro de Almacenamiento, Distribución y Comercialización Comunitario de Productos Orgánicos “Pakarihuasi.” Universidad de Especialidades Turísticas. 2015.
13. Schwartsburd PB, Prado J. A Taxonomic Revision of the South American Species of *Hypolepis* (Dennstaedtiaceae), Part II. *Am Fern J*. 2016;106(1): 1–53. doi:10.1640/0002-8444-106.1.1
14. Tryon AF, Lugardon B. Spores of the Pteridophyta: surface, wall structure, and diversity based on electron microscope studies. 1st ed. New York: Springer Science & Business Media; 1991. doi:10.1007/978-1-4613-8991-0
15. Perrie LR, Shepherd LD, Brownsey PJ. An expanded phylogeny of the Dennstaedtiaceae ferns: *Oenotrichia* falls within a non-monophyletic *Dennstaedtia*,

and *Saccoloma* is polyphyletic. *Aust Syst Bot.* 2015;28(4): 256–264.

doi:10.1071/SB15035

16. Schwartsburd PB, Prado J. A Taxonomic Revision of the South American Species of *Hypolepis* (Dennstaedtiaceae), Part I. *Am Fern J.* 2015;105(1): 263–313.
doi:10.1640/amfj-105-04-263-313.1
17. Rasmussen LH. Ptaquiloside—an Environmental Hazard?: Occurrence and Fate of a Bracken (*Pteridium sp.*). PhD thesis, Toxin in Terrestrial Environments. Royal Veterinary and Agricultural University. 2003.
18. do Paço Caçador J. Ptaquiloside, a natural compound with toxicological interest: Monitoring and optimization of isolation. M.Sc. Thesis, Universidade do Porto. 2014. Available: <https://repositorio-aberto.up.pt/handle/10216/88684>
19. Whitacre DM. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volumen 224. 1st ed. Whitacre D, Nigg H, Doerge D, editors. New York: Springer Science & Business Media; 2008. doi:10.1016/0278-6915(90)90060-z
20. Hayashi Y, Nishizawa M, Sakan T. Studies on the sesquiterpenoids of *Hypolepis punctata* mettr.-l. Isolation and structure determination of hypacrone, a new seco-illudoid. *Tetrahedron.* 1977;33(19): 2509–2511. doi:10.1016/0040-4020(77)80073-2
21. Chen CY, Chiu FY, Lin Y, Huang WJ, Hsieh PS, Hsu FL. Chemical constituents analysis and antidiabetic activity validation of four fern species from Taiwan. *Int J Mol Sci.* 2015;16(2): 2497–2516. doi:10.3390/ijms16022497
22. Potter DM, Baird MS. Carcinogenic effects of ptaquiloside in bracken fern and

- related compounds. *Br J Cancer*. 2000;83(7): 914–920. doi:10.1054/bjoc.2000.1368
23. Alonso-Amelot M, Avendano M. Human Carcinogenesis and Bracken Fern: A Review of the Evidence. *Curr Med Chem*. 2012;9(6): 675–686.
doi:10.2174/0929867023370743
 24. Virgilio A, Sinisi A, Russo V, Gerardo S, Santoro A, Galeone A, et al. Ptaquiloside, the Major Carcinogen of Bracken Fern, in the Pooled Raw Milk of Healthy Sheep and Goats: An Underestimated, Global Concern of Food Safety. *J Agric Food Chem*. 2015;63(19): 4886–4892. doi:10.1021/acs.jafc.5b01937
 25. Tourchi-Roudsari M. Multiple effects of bracken fern under in vivo and in vitro conditions. *Asian Pacific J Cancer Prev*. 2014;15(18): 7505–7513.
doi:10.7314/APJCP.2014.15.18.7505
 26. Kushida T, Uesugi M, Sugiura Y, Kigoshi H, Tanaka H, Hirokawa J, et al. DNA damage by ptaquiloside, a potent bracken carcinogen: Detection of selective strand breaks and identification of DNA cleavage products. *J Am Chem Soc*. 1994;116(2): 479–486. doi:https://doi.org/10.1021/ja00081a007
 27. Rasmussen LH, Kroghsbo S, Frisvad JC, Hansen HCB. Occurrence of the carcinogenic Bracken constituent ptaquiloside in fronds, topsoils and organic soil layers in Denmark. *Chemosphere*. 2003;51(2): 117–127. doi:10.1016/S0045-6535(02)00694-X
 28. Rahman A-U. *Bioactive Natural Products (Part G), Volume 26 (Studies in Natural Products in Chemistry)*. 1st ed. Karachi: Elsevier Science; 2002.
 29. Kisielius V, Lindqvist DN, Thygesen MB, Rodamer M, Hansen HCB, Rasmussen LH.

- Fast LC-MS quantification of ptesculentoside, caudatoside, ptaquiloside and corresponding pterosins in bracken ferns. *J Chromatogr B Analytical Technol Biomed Life Sci.* 2020;1138: 9. doi:10.1016/j.jchromb.2019.121966
30. Castillo Aparicio UF. Aislamiento y caracterización de nuevos compuestos en la fracción tóxica del *Pteridium aquilinum var. caudatum*(L.) Kuhn. (Pteridaceae). Tesis de maestría, Universidad de los Andes. 1996. Available: <http://bdigital.ula.ve/RediCiencia/busquedas/DocumentoRedi.jsp?file=34259&type=ArchivoDocumento&view=pdf&docu=27385&col=5>
31. Murakami T, Tanaka N, Herz W, Steglich W, Zechmeister L. Progress in the chemistry of organic natural products: Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe 54. 1st ed. Herz W, Grisebach H, Kirby G, Tamm C, editors. New York: Springer Science & Business Media; 1988.
32. Rasmussen LH, Bruun Hansen HC, Lauren D. Sorption, degradation and mobility of ptaquiloside, a carcinogenic Bracken (*Pteridium sp.*) constituent, in the soil environment. *Chemosphere.* 2005;58(6): 823–835. doi:10.1016/j.chemosphere.2004.08.088
33. Attya M, Nardi M, Tagarelli A, Sindona G. A new facile synthesis of D 4-pterostin B and D 4-bromopterostin, deuterated analogues of ptaquiloside. *Molecules.* 2012;17(5): 5795–5802. doi:10.3390/molecules17055795
34. Miele G, Costi R, Bonadies F, Nicoletti R. Simple synthesis of deuterated pterostins. *Synth Commun.* 2008;38(10): 1553–1559. doi:10.1080/00397910801929366
35. Calderón Tobar Á, Sánchez LM, Mancebo B, Marrero E, Chiriboga X, Silva J.

- Residualidad del ptaquilósido en la leche procedente de granjas bovinas en tres cantones de la provincia Bolívar, Ecuador. *Rev Salud Anim.* 2014;36(1): 19–27.
Available: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0253-570X2014000100004&lng=es&nrm=iso
36. Agnew MP, Lauren DR. Determination of ptaquiloside in bracken fern (*Pteridium esculentum*). *J Chromatogr A.* 1991;538(2): 462–468. doi:10.1016/S0021-9673(01)88870-1
37. Rasmussen LH, Jensen LS, Hansen HCB. Distribution of the carcinogenic terpene ptaquiloside in bracken fronds, rhizomes (*Pteridium aquilinum*), and litter in Denmark. *J Chem Ecol.* 2003;29(3): 771–778. doi:10.1023/A:1022885006742
38. Rasmussen LH, Lauren DR, Smith BL, 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. doi:10.1080/00480169.2008.36851
39. O’Driscoll C, Ramwell C, Harhen B, Morrison L, Clauson-Kaas F, Hansen HCB, et al. Ptaquiloside in Irish bracken ferns and receiving waters, with implications for land managers. *Molecules.* 2016;21(5): 543–558. doi:10.3390/molecules21050543
40. Acamovic T, Stewart C, Pennycott T. *Poisonous Plants and Related Toxins.* 1st ed. Acamovic T, Stewart C, Pennycott T., editors. Wallingford: CABI Publishing; 2003.
41. Ligon WV. *Liquid Chromatography Mass Spectrometry.* 2nd ed. In: Buschow K, Canh R, Flemings M, Ilschner B, Kramer E, Mahajan S, et al., editors. *Encyclopedia of Materials: Science and Technology.* 2nd ed. 2001. pp. 4508–4511.
doi:10.1016/b0-08-043152-6/00789-0

42. Abdel-Hamid ME. Comparative LC-MS and HPLC analyses of selected antiepileptics and beta-blocking drugs. *Farmaco*. 2000;55(2): 136–145. doi:10.1016/S0014-827X(00)00006-9
43. Jensen PH, Jacobsen OS, Hansen HCB, Juhler RK. Quantification of ptaquiloside and pterosin B in soil and groundwater using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *J Agric Food Chem*. 2008;56(21): 9848–9854. doi:10.1021/jf801986u
44. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2015;65(2): 87–108.
45. Collaborators GBD 2015 RF, others. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990--2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet (London, England)*. 2016;388(10053): 1659. doi:[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31679-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31679-8)
46. International Agency for Research on Cancer (IARC). Cancer today. 2018. Available: https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map?v=2018&mode=population&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=7&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&gro
47. Villalobos Salazar J. Carcinogenicidad del *Pteridium aquilinum* y alta incidencia del cáncer gástrico en Costa Rica. *Rev costarric cienc méd*. 1985;6(3): 131–139.

48. Galpin OP, Whitaker CJ, Whitaker R, Kassab JY. Gastric cancer in Gwynedd. Possible links with bracken. *Br J Cancer*. 1990;61(5): 731–740. doi:10.1038/bjc.1990.165
49. Alonso-Amelot ME, Avendaño M. Possible association between gastric cancer and bracken fern in Venezuela: An epidemiologic study. *Int J Cancer*. 2001;91(2): 252–259. doi:10.1002/1097-0215(200002)9999:9999<:aid-ijc1028>3.0.co;2-h
50. COT. Committee on the toxicity of chemicals in food, consumer products and the environment, COT statement on the risk to consumer of eating foods derived from animals that have eaten bracken, food standards agency, London. 2008. pp. 20–21.
51. Christian Gonzáles E, Alfonso Chavera C, Rosa Perales C, Néstor Falcón P, Roberto Evaristo R. Caracterización de las lesiones encontradas en bovinos con hematuria vesical enzoótica en la zona de oxapampa, pasco. *Rev Investig Vet del Peru*. 2004;15(1): 25–36. Available: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172004000100004
52. de Oliveira LGS, Boabaid FM, Kisielius V, Rasmussen LH, Buroni F, Lucas M, et al. Hemorrhagic diathesis in cattle due to consumption of *Adiantopsis chlorophylla* (Swartz) Fée (Pteridaceae). *Toxicon X*. 2020;5: 1–5. doi:10.1016/j.toxcx.2020.100024
53. Sánchez-Villalobos A, de Alvarado CM, Garcia-Bracho D, Pino-Ramírez D, Villarroel-Neri R, Boscán-Ocando J. Observaciones clínico patológicas en vacas con hematuria enzoótica bovina. *Rev Científica FCV-LUZ*. 2004;14(4): 317–323.
54. Fan LCR, da Cunha Moreira E, Schons JAB, Post H. Achados hematológicos da

- Hematúria enzoótica em bovinos. Rev do Cent Ciências Rurais. 2008;9(3): 343–347.
55. Calderón Á, Mancebo B, Sánchez L, Chiriboga X, Lucero D, Marrero E. Niveles de ptaquilósido en muestras de leche bovina en granjas de San Miguel de Bolívar, provincia Bolívar, Ecuador. Rev Salud Anim. 2013;35(2): 109–115.
56. Rosero Negrete DM. Extracción, identificación, cuantificación de Ptaquilósido en leche de ganado vacuno que pastorea en zonas donde crece *Pteridium arachnoideum*. Quito: UCE. 2013. Available: <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/1903>
57. Calderón Tobar Á, Marrero Faz 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, provincia Bolívar, Ecuador. Rev Salud Anim. 2011;33(3): 197–202.
58. Bulnes C, Calderón Tobar Á. Lesiones asociadas a la Hematuria Enzoótica Bovina (HEB) en animales de matadero (camal) de la Provincia Bolívar, Ecuador. Rev Salud Anim. 2014;36: 97–105.
59. Calderón Tobar Á, Jiménez Sánchez A, Sánchez Perera LM, Mancebo Dorvigny B, Marrero Faz E. Risk by Human Health for Invasion of *Pteridium arachnoideum*, in Bolívar, Ecuador Ptaquiloside's Content in Fronds and in Milk. Int J Appl Sci Technol. 2014;4(6): 84–94.
60. Lehmann S, Rodríguez J. La chakra Kichwa: criterios para la conservación y fomento de un sistema de producción sostenible en la asociación Kallari y sus organizaciones socias. Quito; 2013.

61. INEC. Resultados del censo 2010 de población y vivienda en el Ecuador. Fascículo provincial Napo. 2010. Available: <https://www.ecuadorencifras.gob.ec/wp-content/descargas/Manu-lateral/Resultados-provinciales/napo.pdf>
62. Chisaguano S. Análisis de Estadísticas Socio-Demográficas. 2006. Available: https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Bibliotecas/Estudios/Estudios_Socio-demograficos/Poblacion_Indigena_del_Ecuador.pdf
63. Segarra Largo DS. Utilización del garabato-yuyo, (*Hypolepis hostilis*) para la preparación de alternativas gastronómicas de vanguardia en la ciudad del Tena. 2014. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. 2015.
64. Borges J, Domínguez L, Camacaro O. Heterogeneidad en el contenido de iludanos en *Pteridium aquilinum subsp. Caudatum* colectado en el estado Yaracuy, Venezuela. Rev toxicológica en línea. 2014;43: 46–57. Available: <https://www.sertox.com.ar/es/heterogeneidad-en-el-contenido-de-iludanos-en-pteridium-aquilinum-subsp-caudatum-colectado-en-el-estado-yaracuy-venezuela/>
65. Agrocalidad. Instructivo INT/FP/01 Toma de Muestras para el Laboratorio de Fitopatología. 2018. Available: <http://www.agrocalidad.gob.ec/documentos/lab/01-INT-FP-01-Rev.-3-Toma-de-muestras-para-el-lab-de-FP-Vigente.pdf>
66. Boqué R. El límite de detección de un método analítico. Técnicas Lab. 2004;296: 878–881.
67. Shrivastava A, Gupta V. Methods for the determination of limit of detection and

- limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles Young Sci.* 2011;2(1): 21–25. doi:10.4103/2229-5186.79345
68. Schulze T, Kisielius V, Liang X, Nanusha M, Krauss M. Pterosin A; LC-ESI-ITFT; MS2; CE: 20%; R=15000; [M+H]⁺. 2019.
69. Fenwick GR. Bracken (*Pteridium aquilinum*)—toxic effects and toxic constituents. *J Sci Food Agric.* 1989;46(2): 147–173. doi:10.1002/jsfa.2740460204
70. Hirono I, Grasso P. Natural carcinogenic products of plant origin. *CRC Crit Rev Toxicol.* 1981;8(3): 235–277. Available: <http://dx.doi.org/10.3109/10408448109109659>
71. Wink M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry.* 2003;64(1): 3–19. doi:10.1016/S0031-9422(03)00300-5
72. Rasmussen LH, Donnelly E, Strobel BW, Holm PE, Hansen HCB. Land management of bracken needs to account for bracken carcinogens - A case study from Britain. *J Environ Manage.* 2015;151: 258–266. doi:10.1016/j.jenvman.2014.12.052
73. Cáceres-Peña YC, Naya M, Calcagno-Pissarelli MP, Alonso-Amelot ME. Influence of bracken fern (*Pteridium caudatum* L. Maxon) pre-treatment on extraction yield of illudane glycosides and pterosins. *Phytochem Anal.* 2013;24(4): 290–295. doi:10.1002/pca.2409
74. Skourti-Stathaki E, Clauson-Kaas F, Brandt KK, Rasmussen LH, Hansen HCB. Dissipation of pterosin B in acid soils – Tracking the fate of the bracken fern carcinogen ptaquiloside. *Chemosphere.* 2016;165: 453–459.

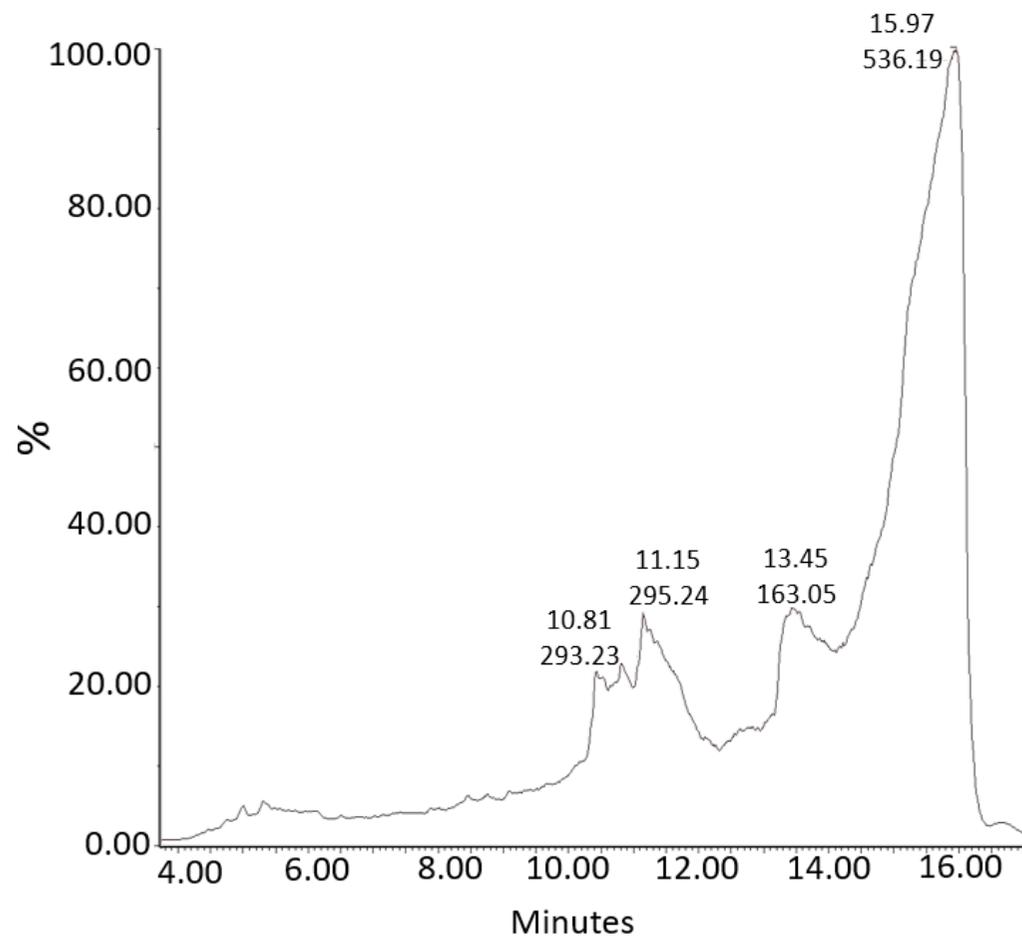
doi:10.1016/j.chemosphere.2016.09.050

75. Castillo UF, Wilkins AL, Lauren DR, Smith BL, Towers NR, Alonso-Amelot ME, et al. Isoptaquiloside and caudatoside, illudane-type sesquiterpene glucosides from *Pteridium aquilinum* var. *caudatum*. *Phytochemistry*. 1997;44(5): 901–906.
doi:10.1016/S0031-9422(96)00593-6
76. Fletcher MT, Reichmann KG, Brock IJ, McKenzie RA, Blaney BJ. Residue potential of norsesquiterpene glycosides in tissues of cattle fed austral bracken (*Pteridium esculentum*). *J Agric Food Chem*. 2011;59(15): 8518–8523. doi:10.1021/jf201342t
77. Fletcher MT, 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. doi:10.1021/jf104267c
78. Naya M, Avila-Núñez JL, Calcagno-Pissarelli MP. Haemolymph Defense Capacity of the Neotropical sawfly *Aneugmenus merida* against Ant Predation. *J Insect Behav*. 2016;29(4): 459–472. doi:10.1007/s10905-016-9573-1

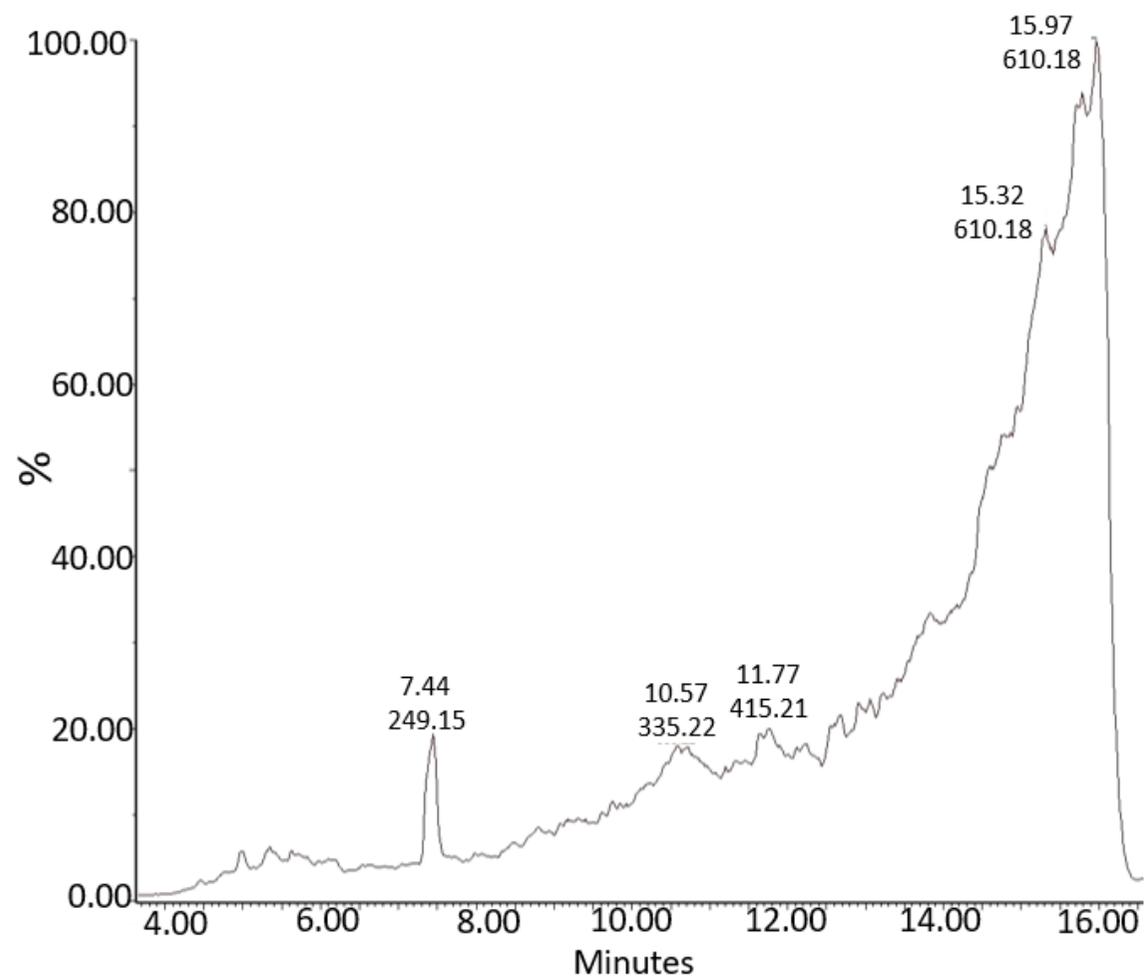
ANEXOS

Anexo 1: Perfiles cromatográficos completos de las muestras analizadas que presentan la m/z de 249 correspondiente a Pterosina A.

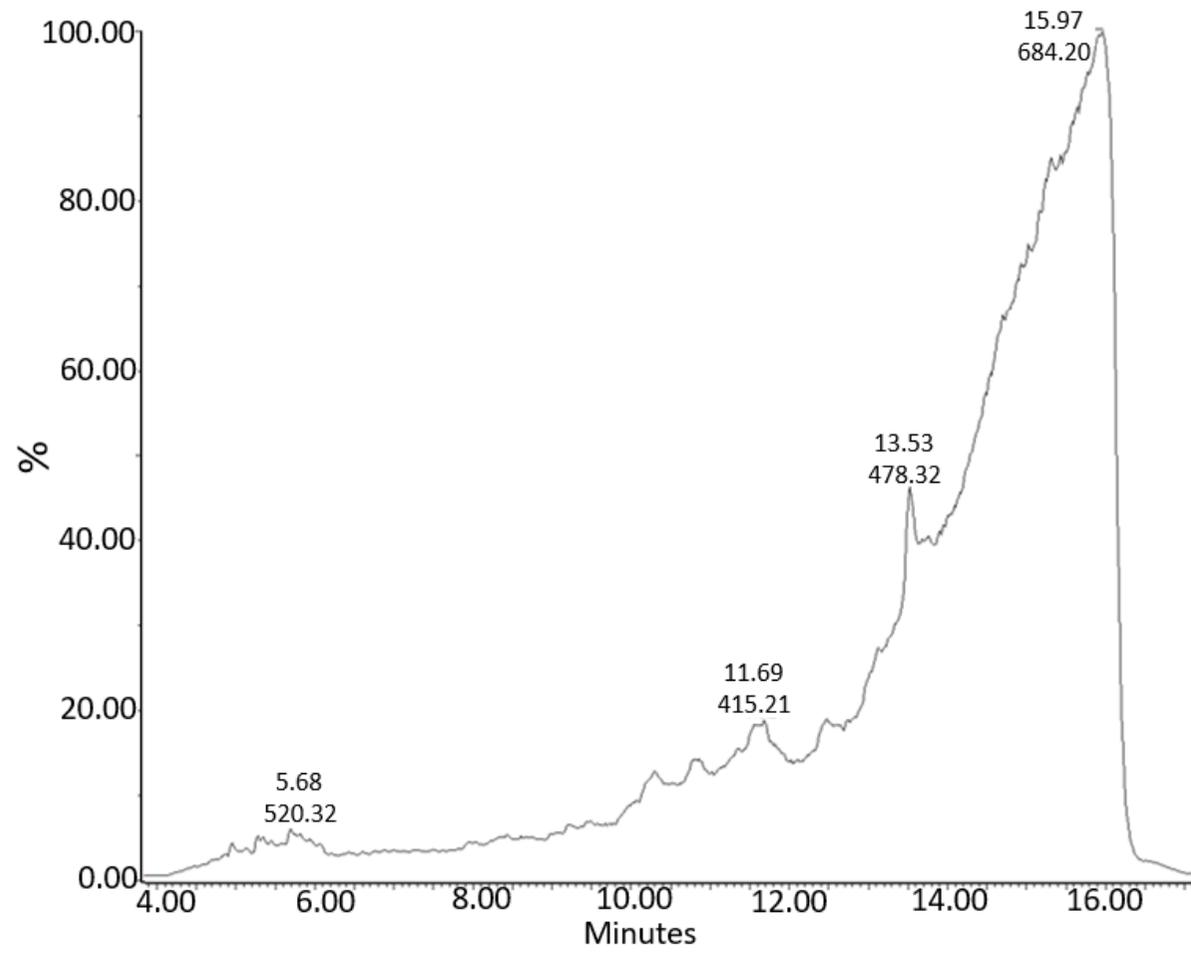
A



B



c



D

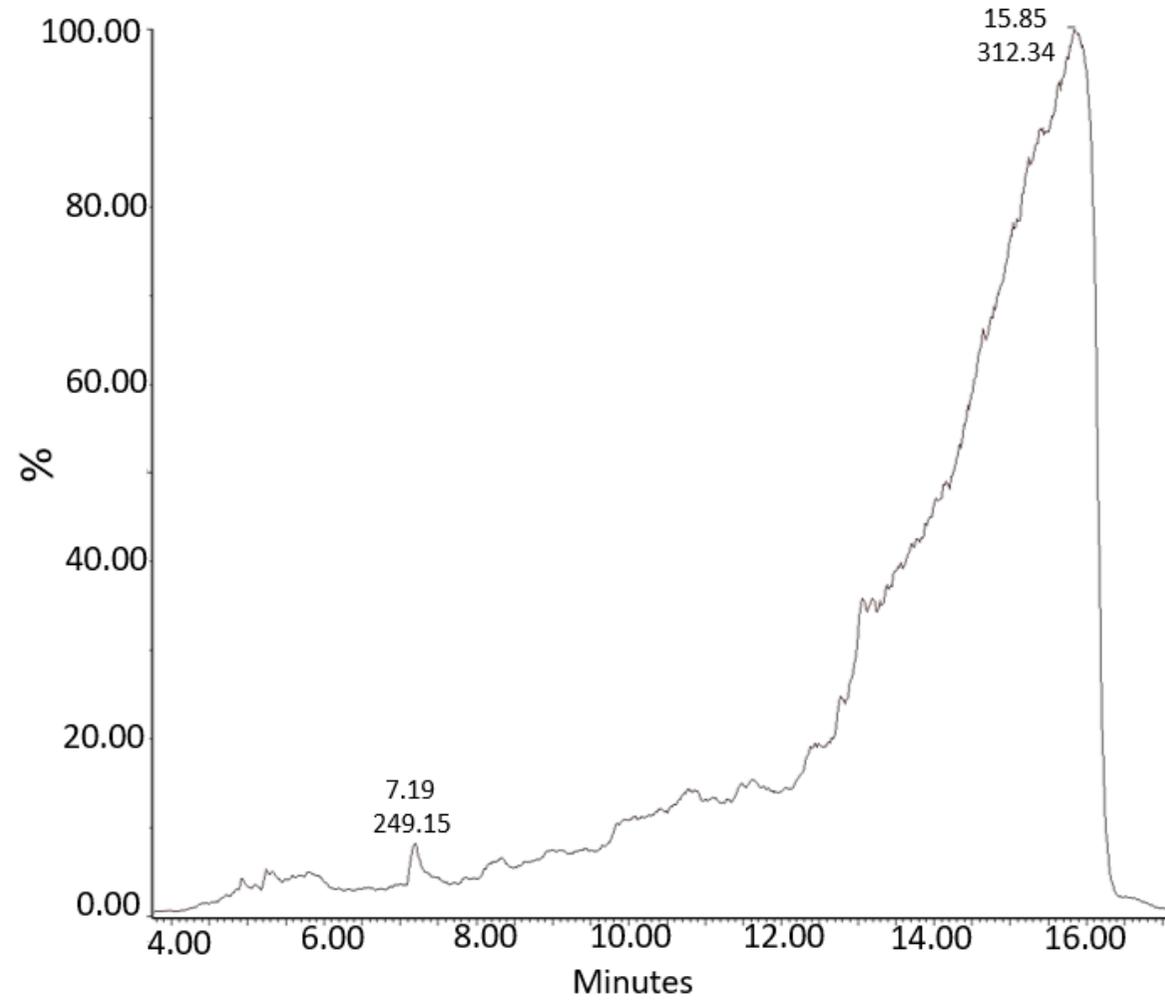
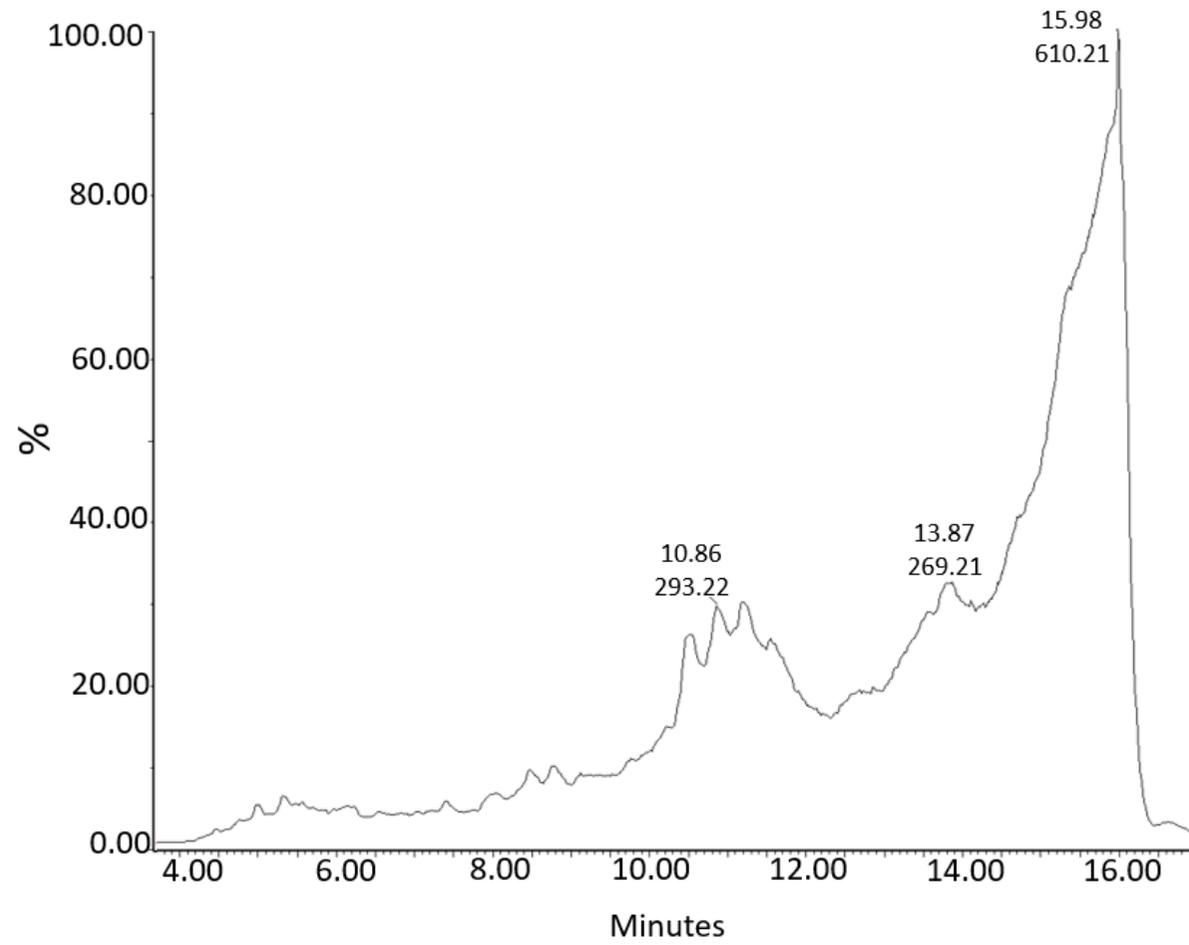
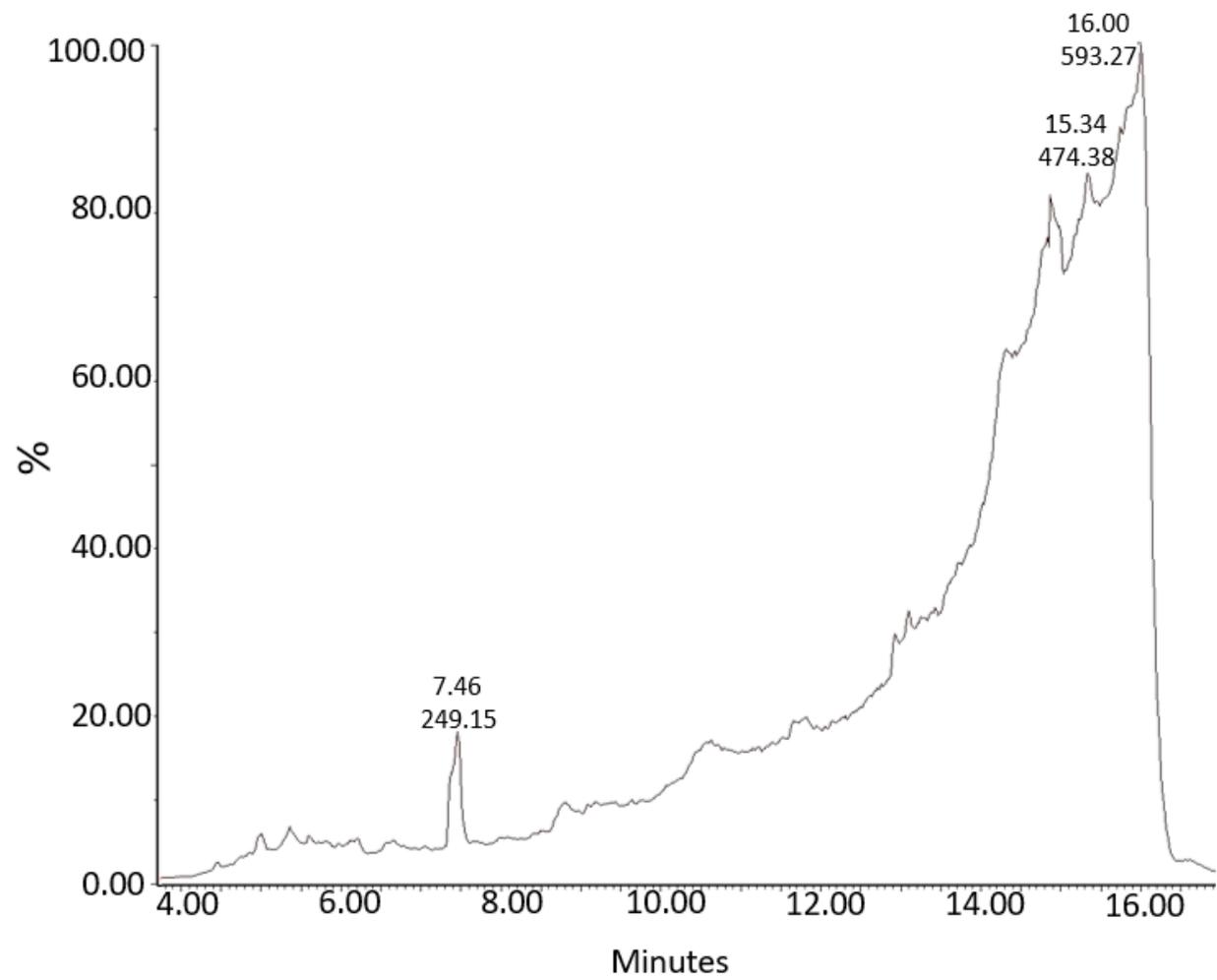


Figura 21. Perfiles cromatográficos completos para las muestras de El Calvario.
A: Muestra cruda. B: Muestra seca. C: Muestra cocida. D: Muestra en maito.

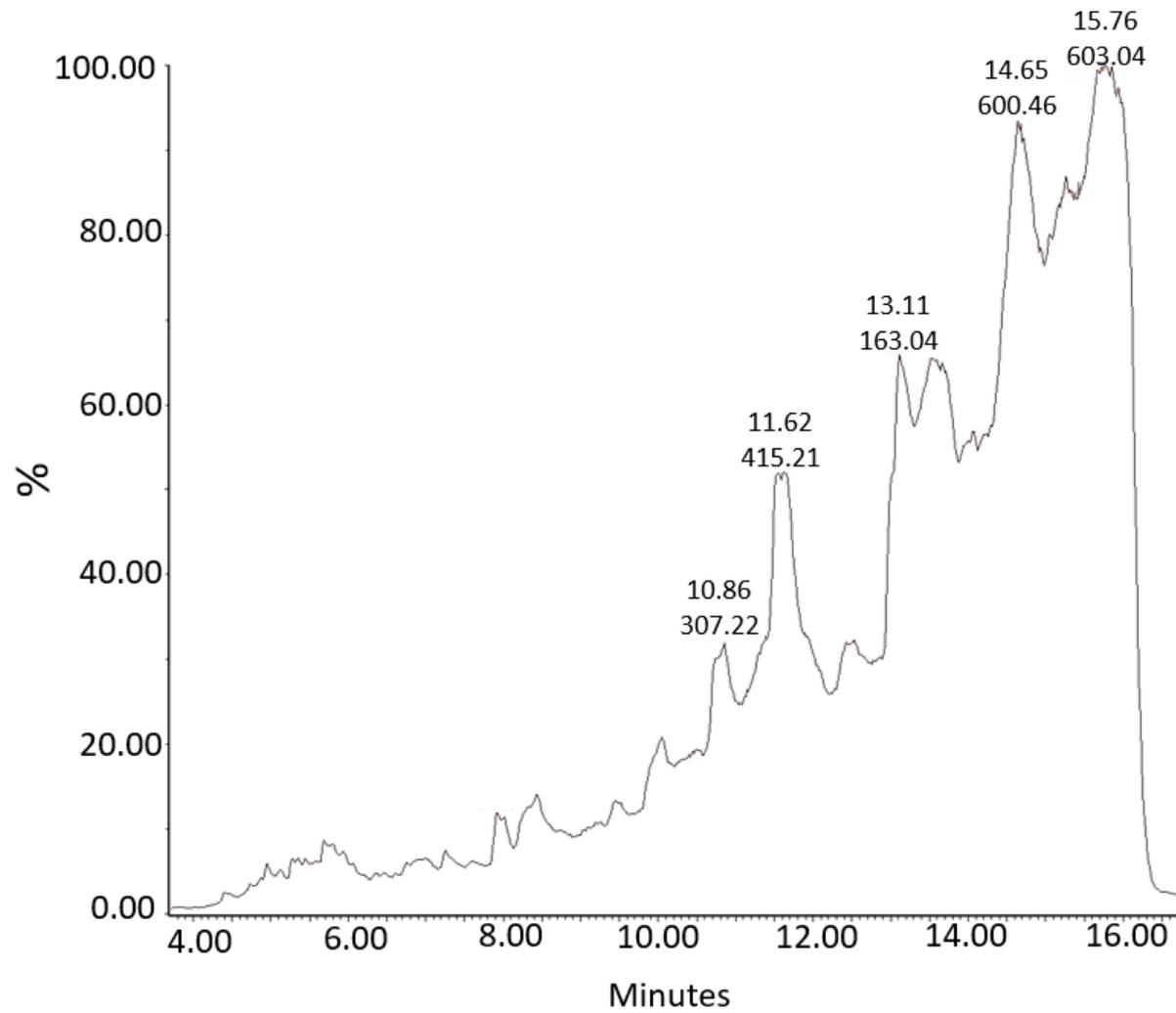
A



B



c



D

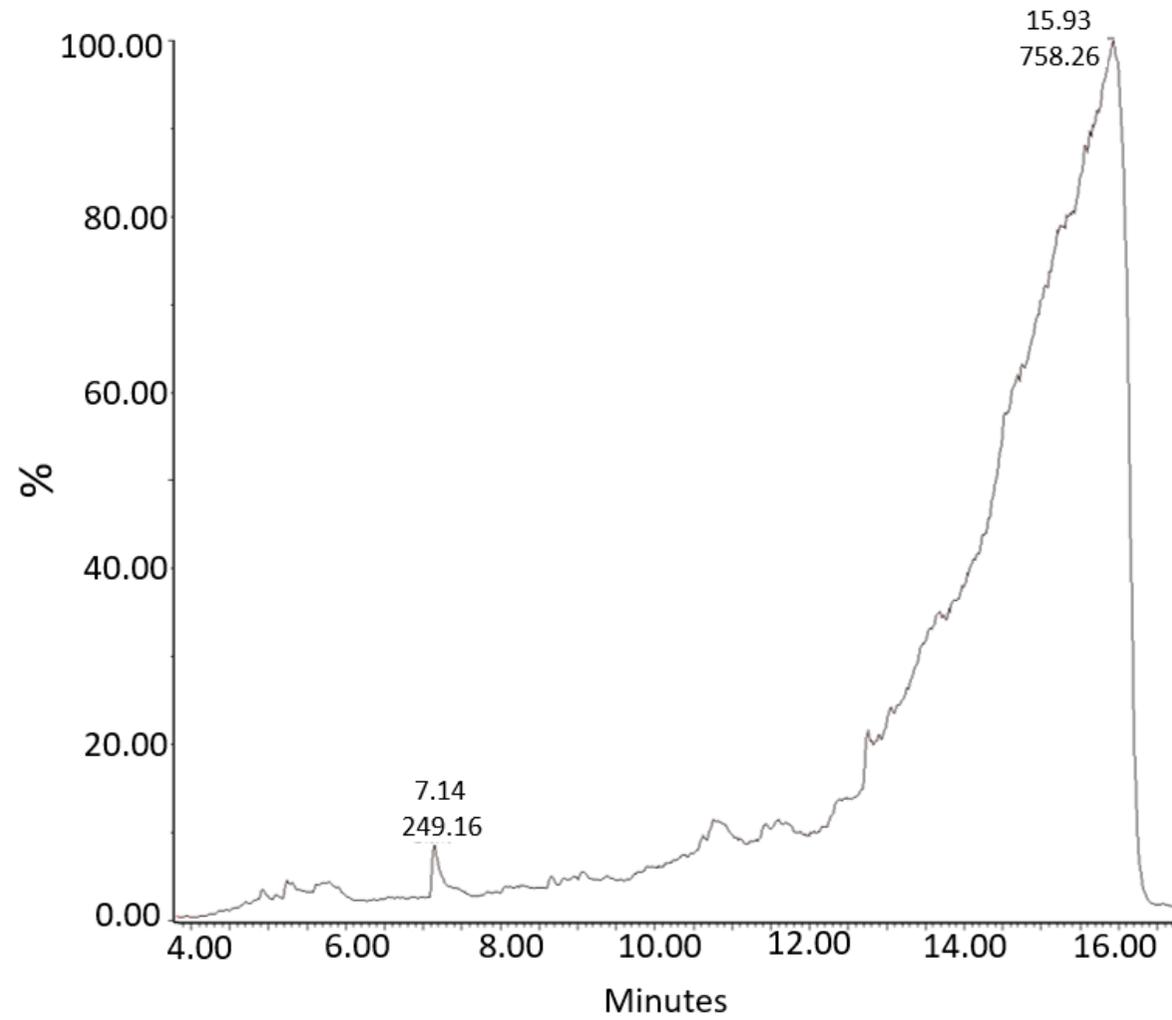
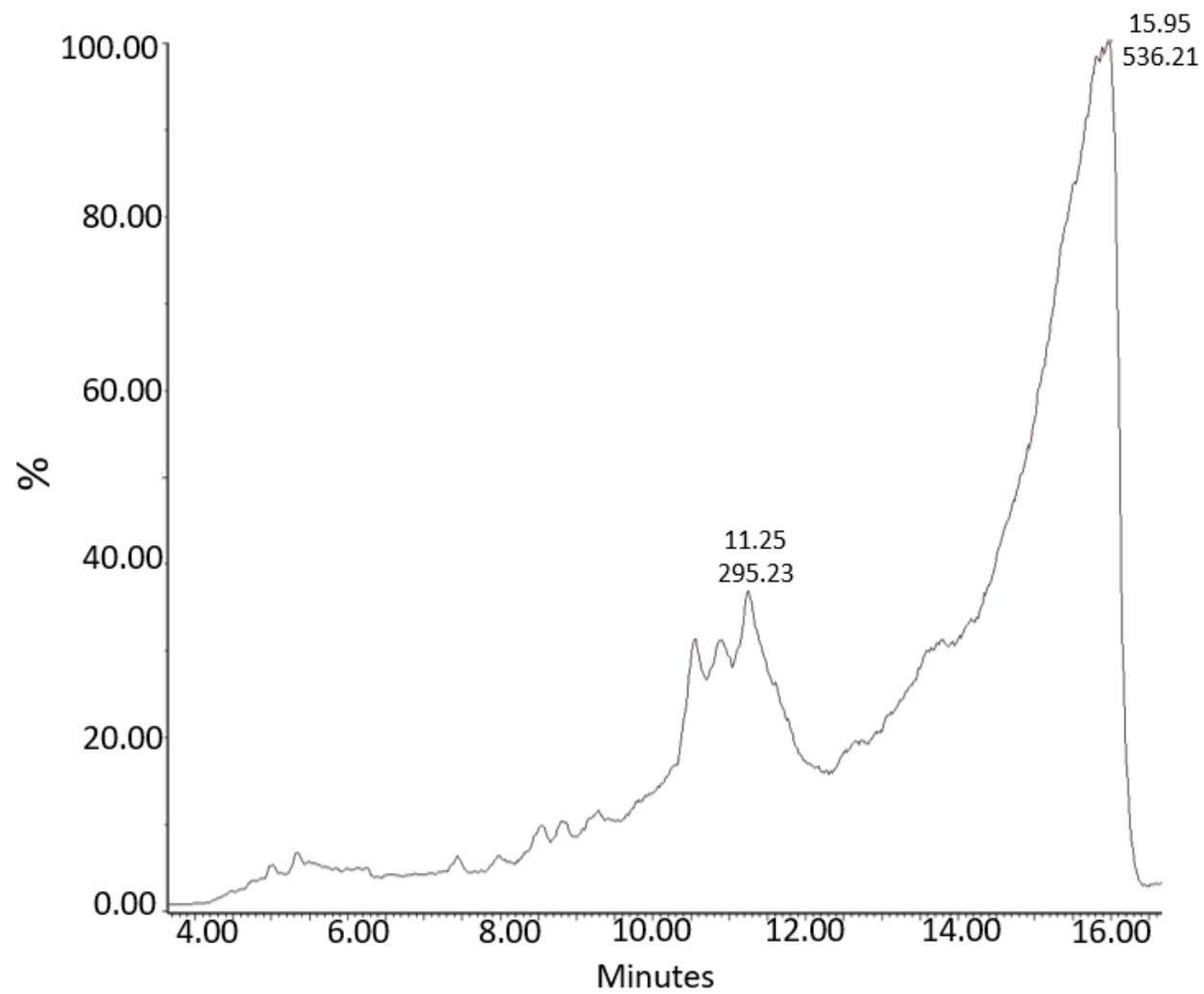
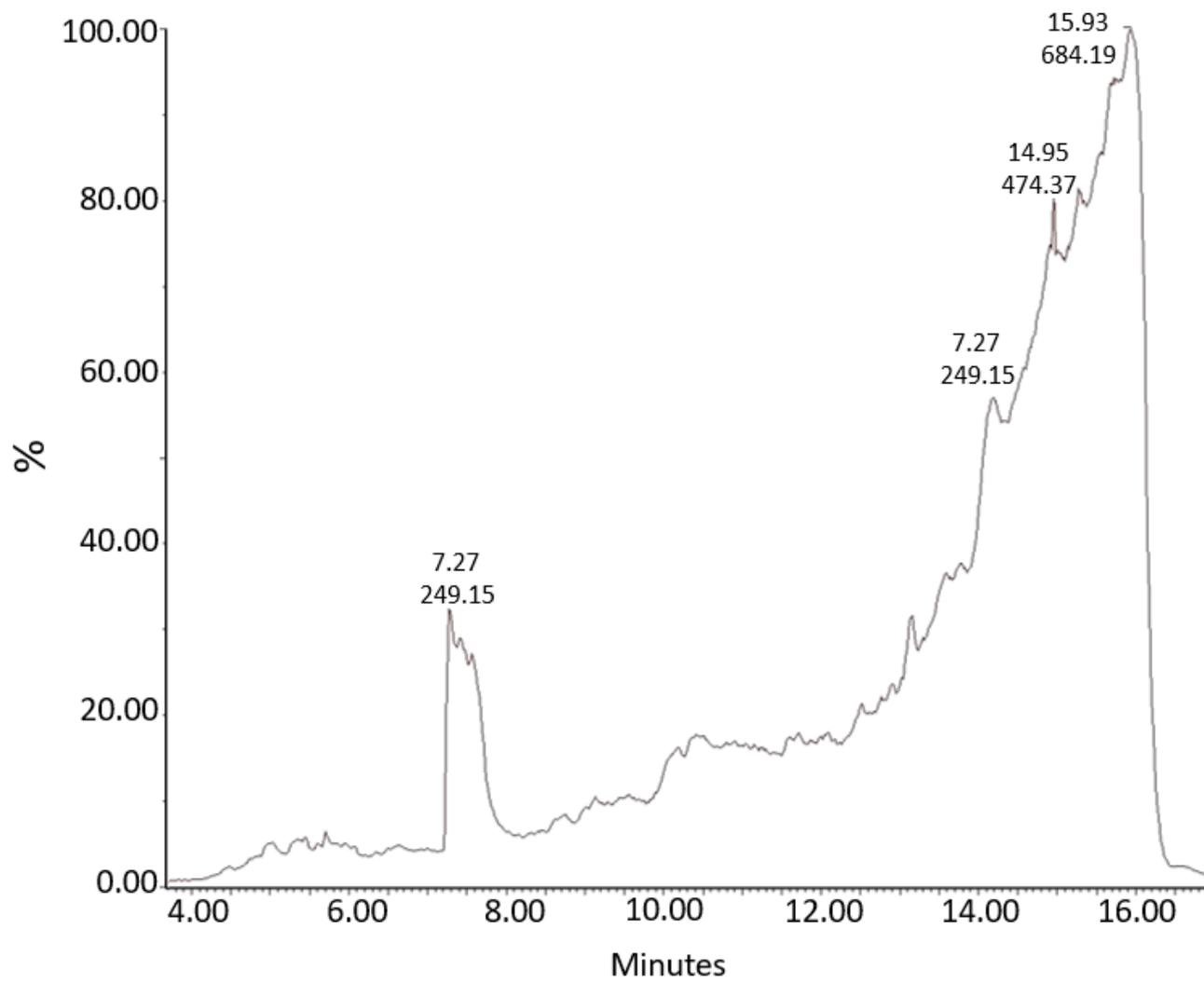


Figura 22. Perfiles cromatográficos completos para las muestras de Alto Pano.
A: Muestra cruda. B: Muestra seca. C: Muestra cocida. D: Muestra en maito.

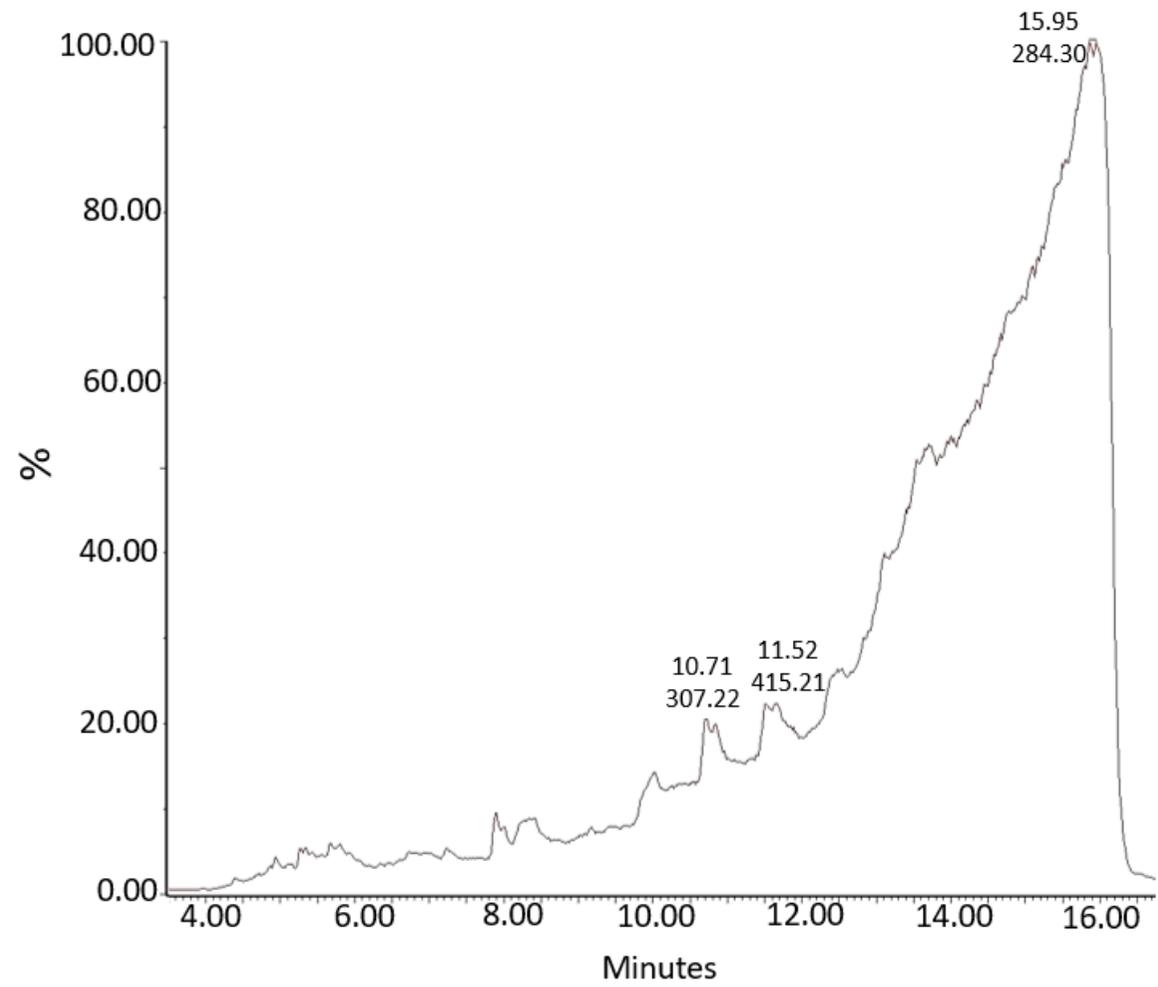
A



B



c



D

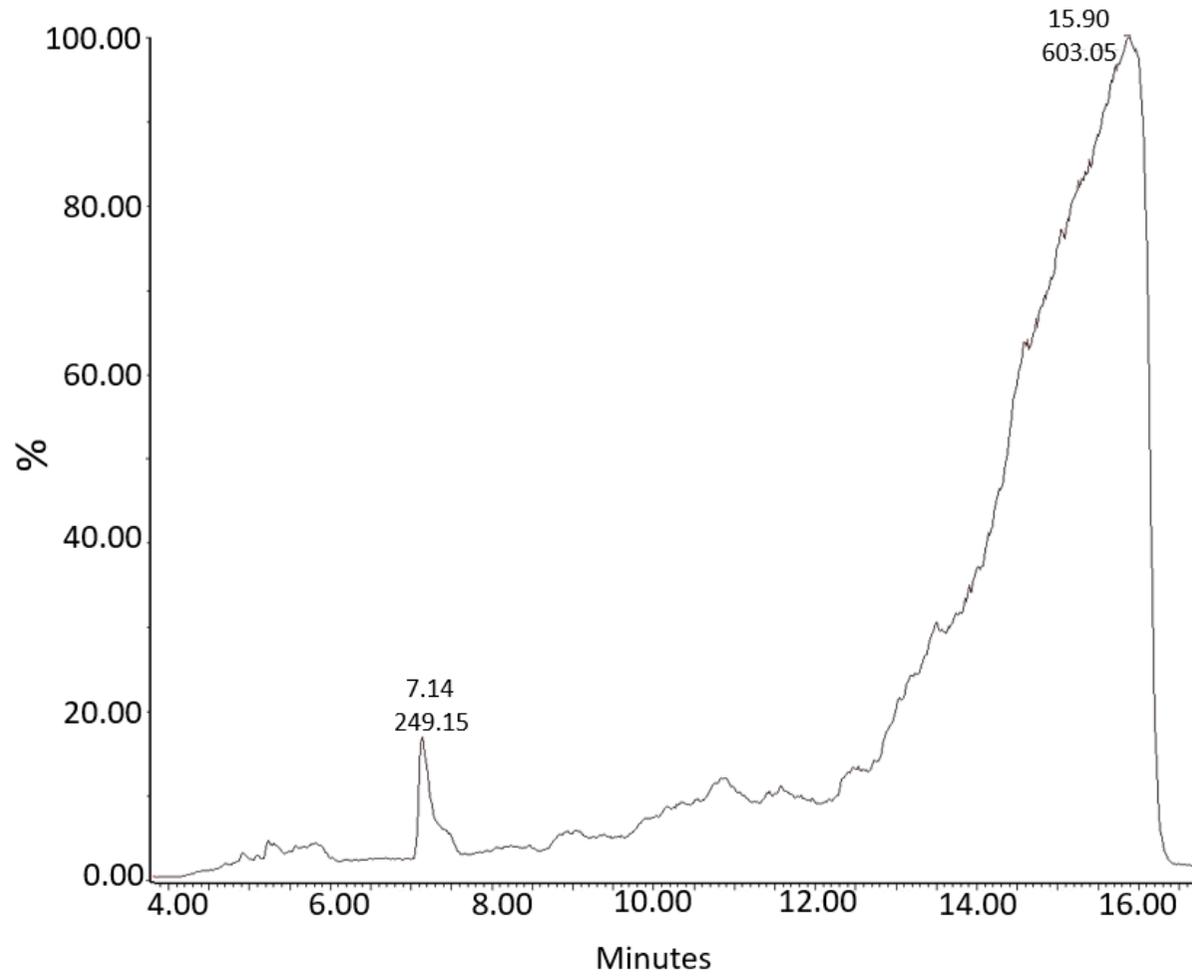
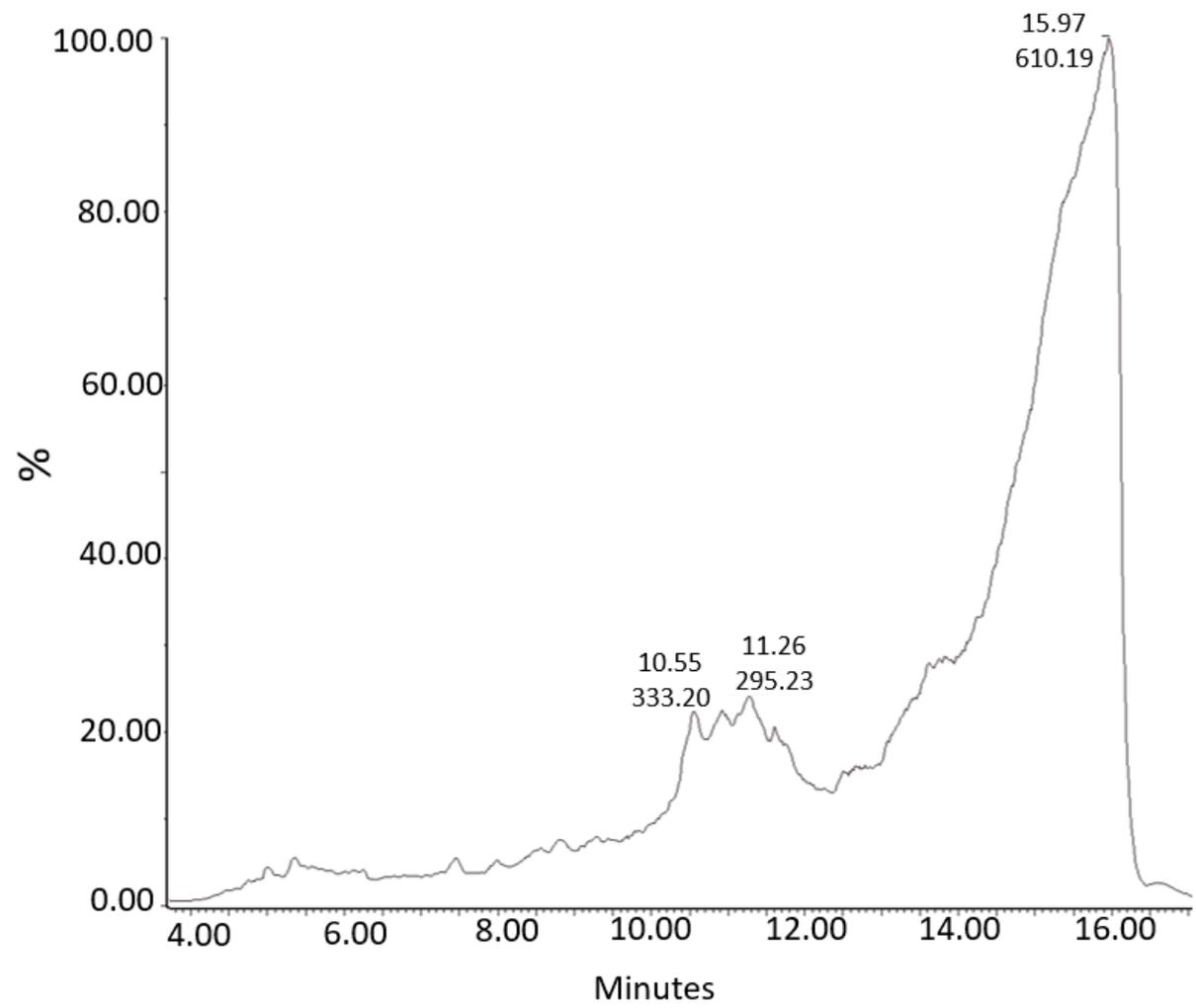
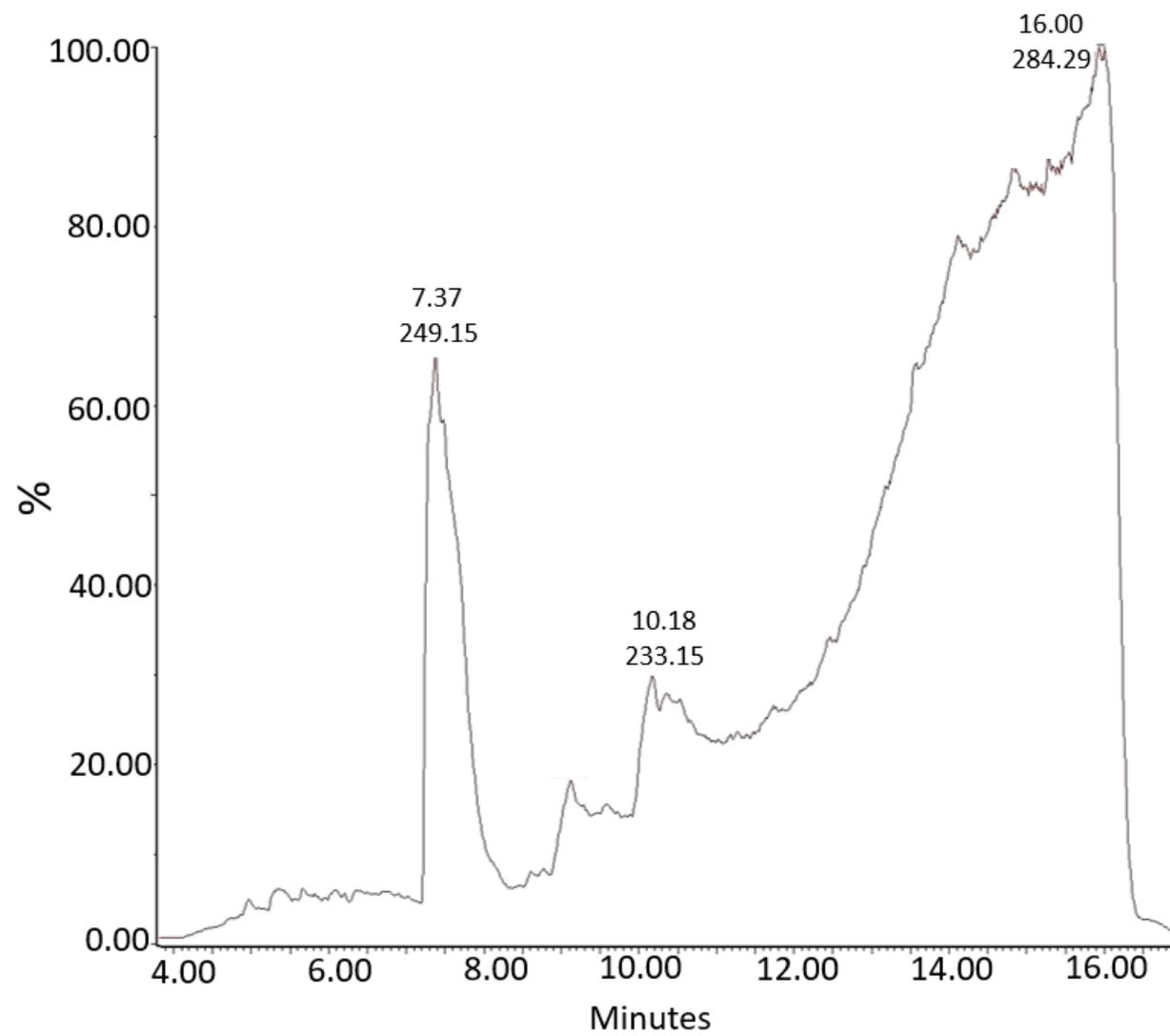


Figura 23. Perfiles cromatográficos completos para las muestras de Pumayacu.
A: Muestra cruda. B: Muestra seca. C: Muestra cocida. D: Muestra en maito.

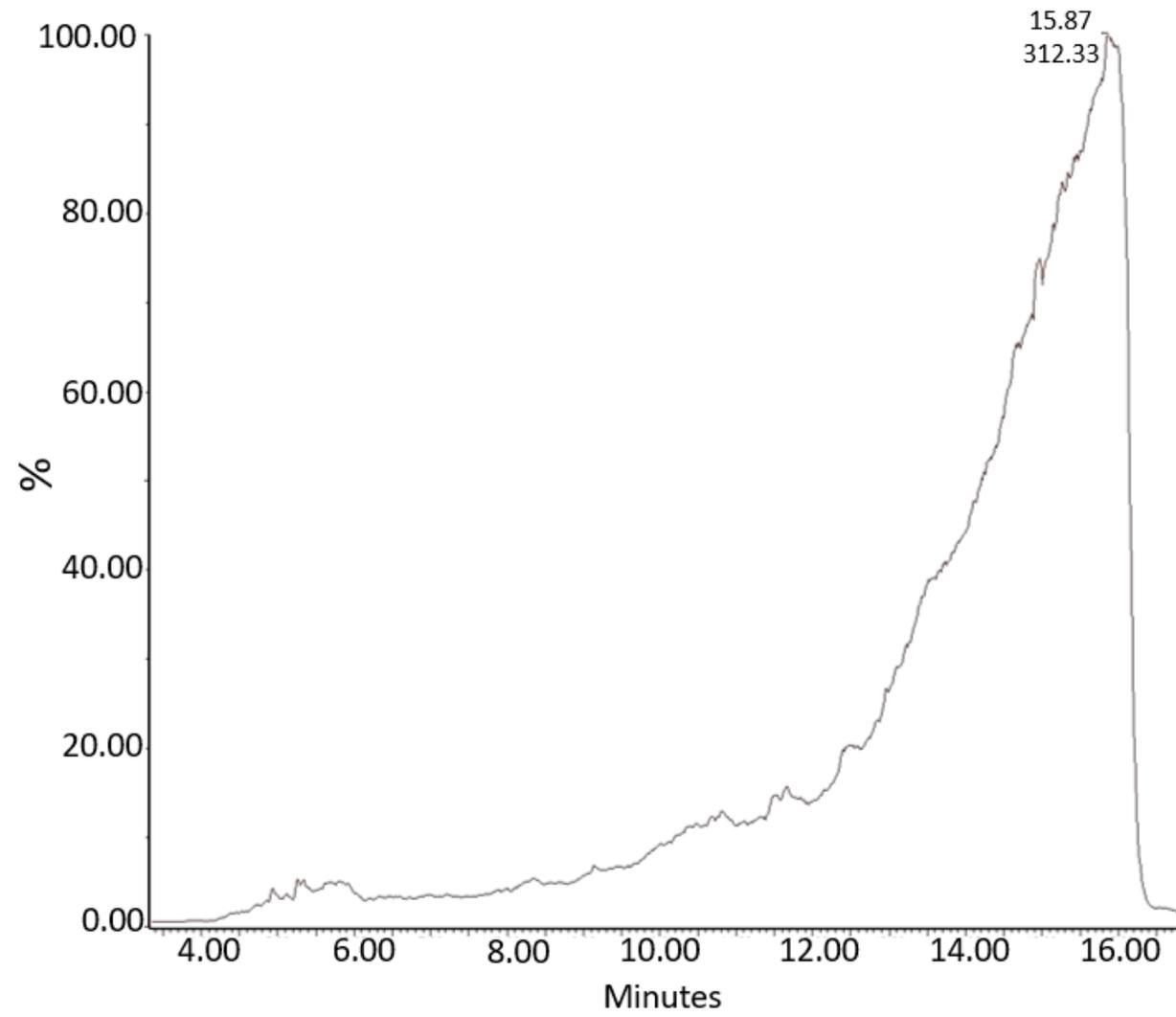
A



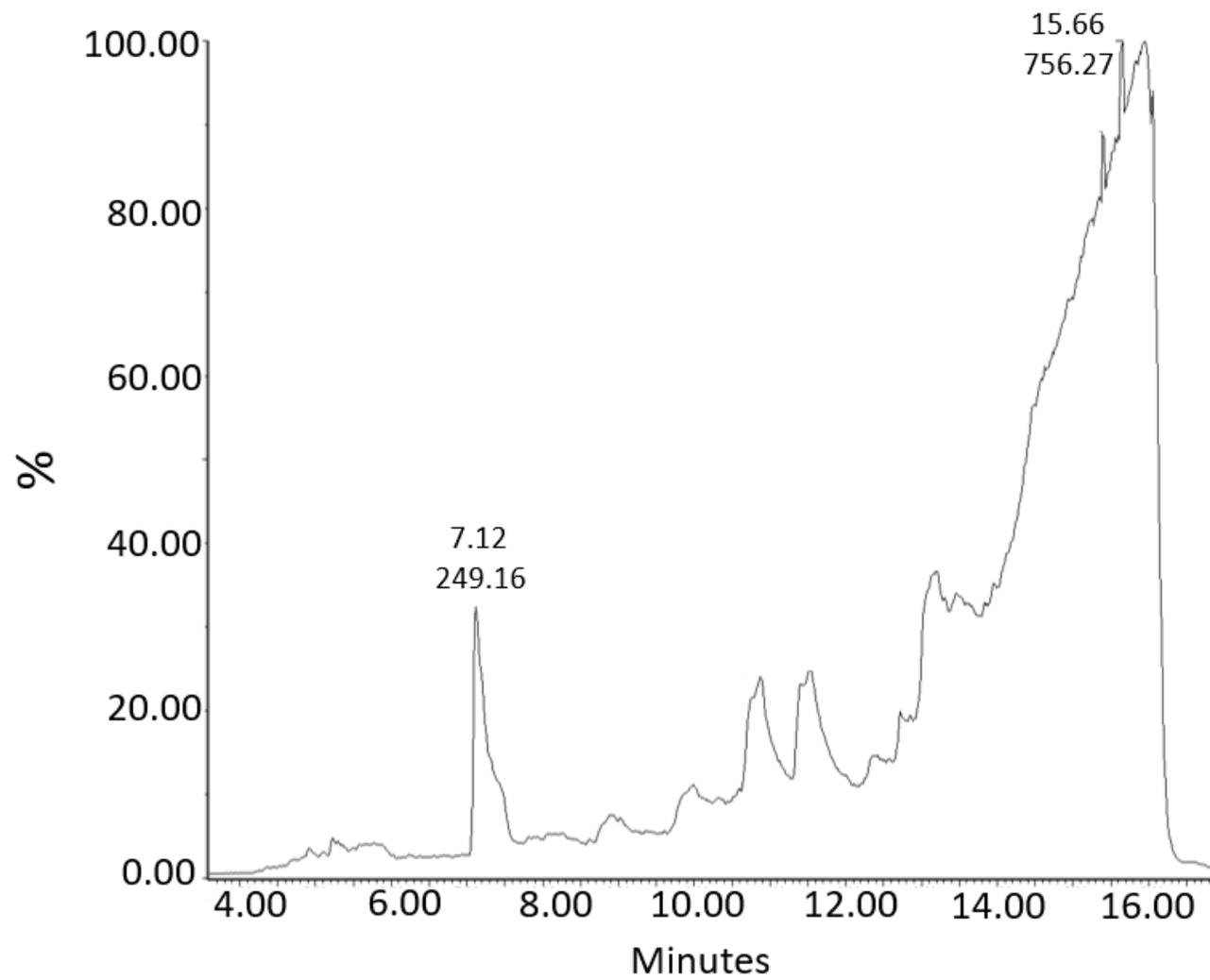
B



c



D



E

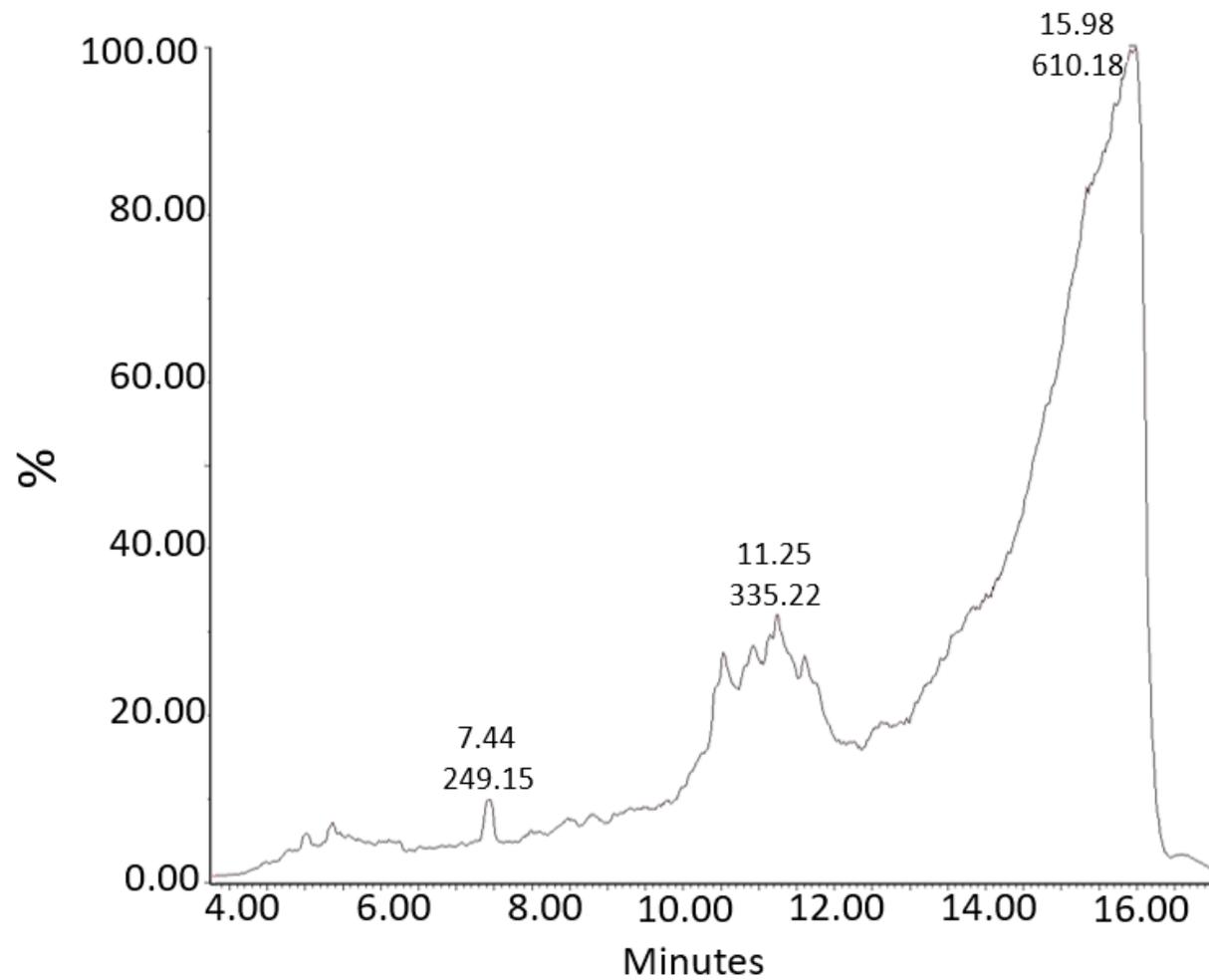


Figura 24. Perfiles cromatográficos completos para las muestras de Lución.

A: Muestra cruda. B: Muestra seca. C: Muestra cocida. D: Muestra en maito. E: Muestra cruda en estado fenológico I.

Anexo 2: RMN de ^{13}C del estándar adquirido en ChemFaces

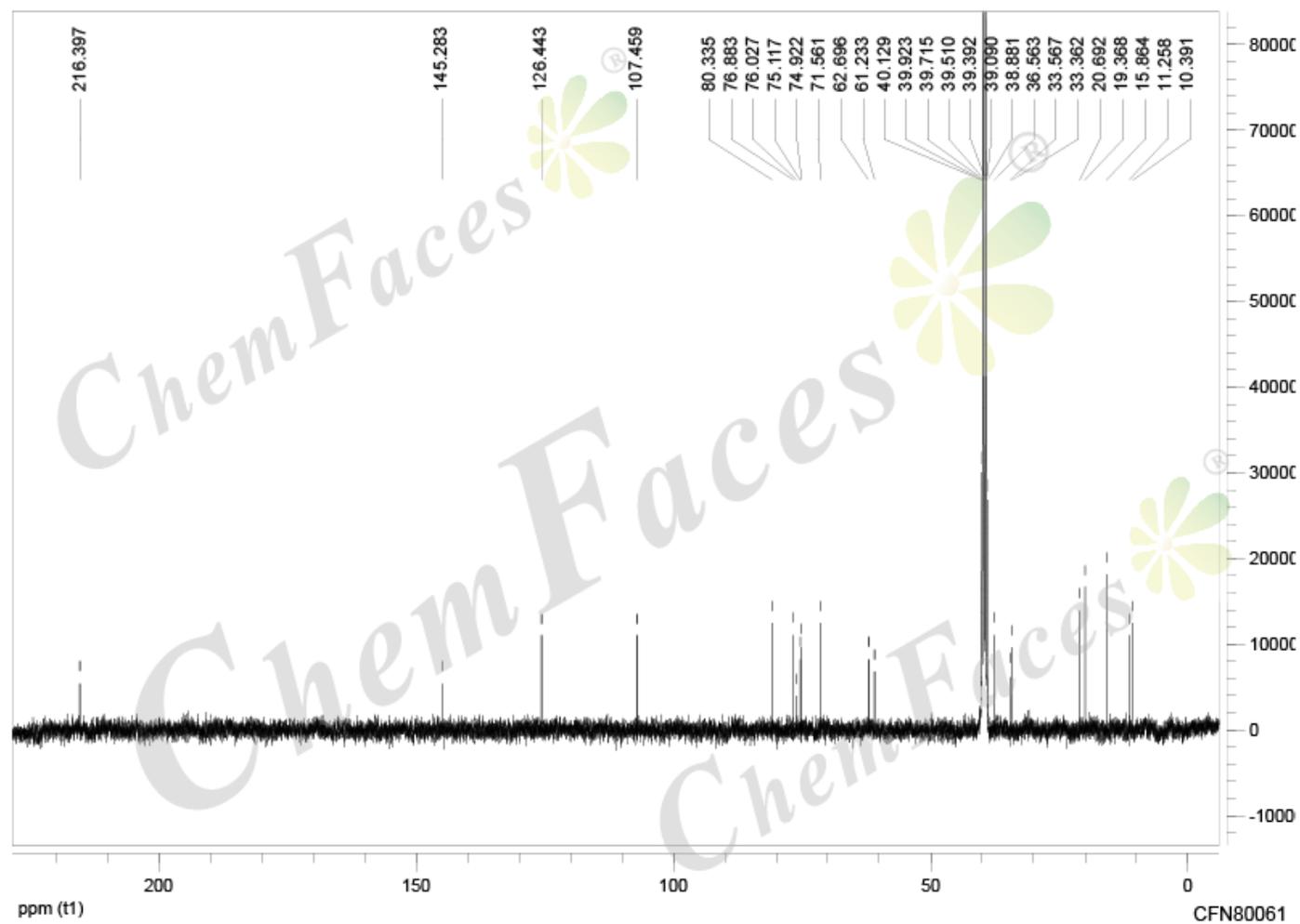


Figura 25. RMN de ^{13}C del estándar de ptaquilósido.