

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD Y PREVALENCIA DE LA BIOTOXINA
PTAQUILÓSIDO EN LECHE BOVINA Y SUBPRODUCTOS LÁCTEOS

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado
en Ciencia de Alimentos para optar al grado de
Maestría académica en Ciencia de Alimentos

MASSIEL V. RODRÍGUEZ SALAZAR

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2021

DEDICATORIA

A mis padres Claudio y Silvia, por ser mi motor para siempre luchar por conseguir mis sueños.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, quiero agradecer a Dios por permitirme culminar esta etapa de mi vida, por darme la sabiduría y perseverancia día con día para concluir esta tesis. Gracias Dios por siempre estar conmigo y por ayudarme tanto para obtener mi anhelada maestría.

Quiero dar gracias a mi compañero de vida, amigo y colega Rodrigo por construir juntos nuestros sueños, por darme su apoyo y ayuda incondicional durante el desarrollo de la tesis, por su motivación para continuar firme en cada etapa, gracias por cada uno de tus aportes y tus sugerencias que sin duda ayudaron a que esta tesis sea hoy concluida.

Gracias a mi familia, a mis padres Claudio y Silvia por su amor, por enseñarme la importancia de obtener un estudio, de siempre luchar por mis metas y objetivos y no dejarme vencer por los obstáculos de la vida, gracias a mis padres por darme la mejor herencia que me pueden dar “El estudio”. Y a mis hermanas Jéssica y Mónica por su cariño y su apoyo, por siempre estar ahí cuando las necesito.

Quiero agradecer a mi director de tesis Alejandro Chacón y a mis asesores de tesis Randall Loaiza y Patricia Esquivel por todo su apoyo, sus sugerencias y cada uno de sus aportes, gracias por el compromiso con el proyecto por el seguimiento, revisiones y correcciones.

Gracias a Daniela Burgos por sus aportes en los estudios fenológicos de los helechos y muestras de leche provenientes de la zona de Coto Brus.

Gracias a Alexander Rojas Alvarado de la escuela de biología de la Universidad Nacional, por su colaboración en el muestreo e identificación de las variedades de los helechos.

Gracias al Centro Nacional de Alta Tecnología/Centro de Investigación de Innovaciones Biotecnológicas por su ayuda durante los análisis, por los equipos y reactivos facilitados, por el programa de Becas Cenat que ayudó a financiar gran parte del proyecto.

Gracias a la Estación Experimental de Ganado Alfredo Volio Mata de la Universidad de Costa Rica por el financiamiento y soporte dado para el desarrollo de la investigación.

Gracias al Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud (INCIENSA), por la licencia de estudio otorgada para realizar el desarrollo experimental de la tesis.

“Esta Tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencia de Alimentos de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar y título de Maestría Académica en Ciencia de Alimentos”.

M.Sc María Lourdes Pineda Castro
Representante del Decano
Sistema Estudios de Posgrado

M.Sc Alejandro Chacón Villalobos
Profesor guía

Ph.D Patricia Esquivel Rodríguez
Lectora

Ph.D Randall Loaiza Montoya
Lector

Ph.D Marianela Cortéz Muñoz
Representante de la Directora Programa
de Posgrados en Ciencia de Alimentos

Massiel Rodríguez Salazar
Sustentante

ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
HOJA DE APROBACIÓN.....	iii
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	v
RESUMEN.....	viii
ÍNDICE DE CUADROS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiv
CAPÍTULO 1: JUSTIFICACIÓN.....	1
CAPÍTULO 2: OBJETIVOS.....	4
2.1. Objetivo general.....	4
2.2. Objetivos específicos.....	4
CAPÍTULO 3: MARCO TEÓRICO.....	5
3.1. Naturaleza del <i>Pteridium spp</i>	5
3.2. Química del ptaquilósido (PTA).....	8
3.3. Estabilidad del ptaquilósido (PTA).....	10
3.4. Hematuria Enzoótica Bovina (HEB).....	11
3.5. Carcinogenicidad del ptaquilósido.....	12
3.5.1. Mecanismo de acción.....	12
3.5.2. Estudios clínicos.....	14
3.6. Residualidad del ptaquilósido en la leche.....	15
3.7. Leche cruda en Costa Rica.....	17
CAPÍTULO 4: Proyecto de investigación.....	19
4.1. Apoyo del proyecto de investigación.....	19
4.2. Localización.....	19
CAPITULO 5: Estandarización e implementación de un protocolo de extracción y cuantificación de ptaquilósido a partir del helecho (<i>Pteridium spp.</i>), en leche bovina y subproductos lácteos.....	20
5.1. Introducción.....	20

5.2.	Materiales y métodos.....	23
5.2.1.	Reactivos químicos y materiales.....	23
5.2.2.	Recolección y preparación de las muestras	23
5.2.3.	Extracción y purificación del ptaquilósido (PTA) a partir del helecho (<i>Pteridium spp</i>)	24
5.2.4.	Cuantificación de PTA en el extracto de <i>Pteridium spp</i>	25
5.2.5.	Cuantificación de PTA en el extracto muestras de lácteas	26
5.2.6.	Preparación de curva de calibración	27
5.2.7.	Análisis instrumental	28
5.2.8.	Validación del método de extracción y cuantificación de ptaquilósido en helecho y leche	28
5.2.9.	Análisis estadístico	31
5.3.	Resultados y discusión	31
5.4.	Conclusiones.....	40
5.5.	Agradecimientos.....	40
5.6.	Referencias	40
CAPÍTULO 6: Caracterización del contenido de la biotoxina (ptaquilósido y pterosina B) en dos variedades de helecho (<i>P. aquilinum caudatum var caudatum</i> y <i>P. esculentum var. arachnoideum</i>), y estimación de la excreción en muestras de leche bovina costarricense		44
6.1.	Introducción.....	44
6.2.	Materiales y métodos.....	48
6.2.1.	Reactivos químicos y materiales.....	48
6.2.2.	Recolección y preparación de las muestras	48
6.2.3.	Extracción del ptaquilósido (PTA) a partir del helecho (<i>Pteridium spp</i>)	50
6.2.4.	Cuantificación de biotóxina PTA en el extracto acuoso de helecho <i>Pteridium spp</i>	51
6.2.5.	Cuantificación de biotoxina PTA en muestras de leche fresca bovina.....	51
6.2.6.	Procedimiento de calibración para la cuantificación de PTA en helechos y leche..	52
6.2.7.	Instrumentación y condiciones cromatográficas	52
6.3.	Resultados y discusión	53
6.4.	Conclusiones.....	60
6.4.	Agradecimientos.....	59

6.5. Referencias	59
CAPÍTULO 7: Evaluación de la estabilidad de la biotoxina ptaquilósido durante el procesamiento de leche bovina y desarrollo de subproductos lácteos (queso tipo blando y yogurt azucarado)	64
7.1. Introducción.....	64
7.2. Materiales y métodos.....	67
7.2.1. Reactivos químicos y materiales.....	67
7.2.2. Recolección y preparación de las muestras	67
7.2.3. Preparación de extracto concentrado en ptaquilósido (PTA) a partir del helecho (<i>Pteridium spp</i>).....	68
7.2.4. Estabilidad y prevalencia de la biotoxina en leche y subproductos lácteos....	69
7.2.5. Preparación de curva de calibración	74
7.2.6. Análisis instrumental	74
7.3. Resultados y discusión	75
7.4. Conclusiones.....	84
7.5. Agradecimientos.....	85
7.6. Referencias	85
CAPÍTULO 8: DISCUSIÓN GENERAL	87
CAPÍTULO 9: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	89
CAPÍTULO 10: BIBLIOGRAFÍA ADICIONAL CITADA.....	91

RESUMEN

La alta incidencia de cáncer gástrico en Costa Rica, la prevalencia de *Pteridium aquilinum* en las zonas de pastoreo del ganado bovino y la alta ingesta de leche, que podría estar contaminada con la biotoxina ptaquilósido, ha alertado a investigadores por la relación que existe entre estos factores. Sin embargo, aún hay aspectos que no son claros y que no se han determinado, como la prevalencia y estabilidad del ptaquilósido en leche y subproductos lácteos.

La presente investigación busca encontrar respuestas a muchos de los vacíos que existen en relación con este tema. Inicialmente, fue necesario determinar el mejor método de extracción y cuantificación de ptaquilósido a partir del helecho y en matrices lácteas, para lo que se realizó un análisis químico del contenido de ptaquilósido (PTA) en dos variedades de helecho *P. aquilinum caudatum var caudatum* y *P. esculentum var. arachnoideum*, mediante la cuantificación en tallos, frondas y raquis. Se encontraron cantidades de (21 - 120) mg/kg de PTA, y se concluyó que los raquis poseen mayor cantidad de esta biotoxina. Por otro lado, fue necesaria la extracción y purificación de un extracto concentrado en PTA mediante cromatografía en columna y se realizó la validación del método analítico mediante cromatografía líquida de alta definición con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD), a partir de matrices lácteas como yogurt y leche, así como a partir del helecho. Todos los parámetros evaluados se determinaron como satisfactorios, garantizando la validez de los resultados.

Paralelamente, se determinó la presencia de PTA mediante HPLC-MS en leche bovina costarricense proveniente de tres fincas ubicadas en la zona de Coto Brus y en el cantón de Zarcero. De acuerdo con los resultados, se encontró una concentración de (4 ± 1) µg/L de PTA en una de las fincas de Coto Brus y (10 ± 1) µg/L de PTA en la finca de Zarcero, mientras que en otras de las fincas de Coto Brus no se detectó. Se llevó a cabo la contaminación de leche con extracto concentrado de PTA y se evaluó el efecto del procesamiento, como la pasteurización y preparación del yogurt. Se determinó que la pasteurización degrada todo el PTA a pterosina B (PTB), y que la cantidad de PTB presente en la leche pasteurizada se degrada hasta la segunda semana de almacenamiento en refrigeración a 8 °C, cuando su consumo ya no es óptimo. En cuanto a la preparación de yogurt, éste no altera la estabilidad y prevalencia del PTA que se encuentra originalmente en la leche contaminada, por lo que, un cambio en el pH del medio, cercano

a 4, no degrada el PTA presente; además el PTA se convierte totalmente a PTB después de la primera semana de almacenamiento en refrigeración a 8 °C. Finalmente, los estudios realizados en quesos tipo blando mostraron que la cantidad de biotoxina en el queso disminuyó con el tiempo de almacenamiento; sin embargo, la concentración de biotoxina no se ve afectada por la fuerza iónica según los niveles evaluados, por lo que es necesario realizar más estudios para estimar la degradación del PTA a PTB durante la preparación y almacenamiento de los quesos. Por otro lado, los sueros de los quesos con menor contenido de sal presentaron mayor contenido de biotoxina, lo que podría implicar una menor prevalencia de la biotoxina en la red proteica del queso.

Los estudios muestran, en general, que el PTA se ha detectado en cantidades pequeñas en leche bovina costarricense y que el consumo de subproductos, como yogurt y quesos elaborados artesanalmente a partir de leche que pudiera estar contaminada con PTA sin proceso de pasteurización, podría ser un riesgo para la salud humana, debido a una mayor estabilidad de la biotoxina en el medio.

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Matriz de Youden Steiner para análisis de robustez empleada en la conversión de PTA a PTB en el extracto acuso obtenido a partir de los helechos.	30
Cuadro 2. Matriz de Youden Steiner para análisis de robustez empleada para la recuperación de PTB en el extracto de leche.....	30
Cuadro 3. Resumen de resultados de validación del método de cuantificación y extracción de PTA en forma de PTB para matriz de helecho y matrices lácteas.....	36
Cuadro 4. Concentración de biotoxina en leche (ug/L) proveniente de tres fincas costarricenses por HPLC-MS	58
Cuadro 5. Efecto del procesamiento de productos lácteos sobre la biotoxina (mg/kg) en tres niveles de contaminación de PTA, analizada mediante HPLC-DAD 260 nm.	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Resumen gráfico del estudio realizado	4
Figura 2. Resumen taxonómico actual de <i>Pteridium spp</i> y la distribución geográfica aproximada (Marrs & Watt, 2006).	6
Figura 3. Compuestos químicos identificados en <i>Pteridium spp</i>	8
Figura 4. Estructura química del ptaquilósido.....	9
Figura 5. Hidrólisis del ptaquilósido, modificada de (Yamada & Kigoshi, 2007).....	9
Figura 6. Mecanismo de acción de la APT.....	13
Figura 7. Vías de exposición del ptaquilósido (PTA) a los seres humano	21
Figura 8. Diagrama de flujo para la metodología de extracción y purificación del PTA a partir del helecho	25
Figura 9. Diagrama de flujo para la metodología de extracción de PTA y conversión a PTB a partir de leche o yogurt.....	27
Figura 10. Identificación de la presencia de PTA en extractos de frondas de helecho <i>Pteridium spp</i> utilizando infusión directa por MS/MS.....	31
Figura 11. Identificación de la presencia de PTB en extractos de frondas de helecho <i>Pteridium spp</i> utilizando infusión directa por MS/MS.....	32
Figura 12. Cromatogramas de pterosina B por HPLC-DAD, 260 nm.	33
Figura 13. Fracciones obtenidas durante purificación de PTA, utilizando cromatografía de columna con resina poliamida y resina amberlite® de dos variedades de helecho <i>P. aquilinum caudatum var caudatum</i> y <i>P. esculentum var. arachnoideum</i>	34
Figura 14. Recuperación de ptaquilósido a una concentración de (0,23, 0,43; 0,77) m/L en leche entera y (0,10; 0,24; 0,35) mg/kg en yogurt azucarado.....	37
Figura 15. Análisis de robustez para la extracción y conversión de PTA a PTB en muestras lácteas y helechos, aplicando la matriz de Youden Steiner	38
Figura 16. Estructura molecular de a) Ptaquilósido (PTA), b) Pterosina B (PTB)	45
Figura 17. Composición fisiológica (frondas, raquis y tallos) y estados fenológicos (II-rebrote, III-joven, IV-adulto) del helecho <i>Pteridium</i>	47

Figura 18. Helecho <i>P. aquilinum caudatum</i> var <i>caudatum</i> en a) estado fresco, b) estado seco, Helecho <i>P. esculentum</i> var. <i>arachnoideum</i> en c) estado fresco, d) estado seco ...	48
Figura 19. Helecho <i>Pteridium caudatum</i> en diferentes estados fenológicos: a) IV- Adulto, b) III- joven y c) II- rebrote, provenientes del cantón de Coto Brus, Puntarenas, Costa Rica.....	49
Figura 20. Ubicación geográfica de los muestreos de helechos <i>Pteridium</i> spp. (<i>P. caudatum</i> y <i>P. arachinoideo</i>)	50
Figura 21. Concentración de PTA en frondas, raquis y tallos de dos especies de <i>Pteridium</i>	54
Figura 22. Análisis estadístico boxplot del contenido de PTA (mg/kg).....	55
Figura 23. Concentración de PTA inicial, PTB inicial y biotoxina total como PTB en mg/kg de muestras de helechos (<i>Pteridium caudatum</i>) en sus tres estados morfológicos provenientes de Cañas Gordas, Agua Buena, Coto Brus, Puntarenas, Costa Rica (Finca 1) y en Valle Hermoso, Sabalito, Coto Brus, Puntarenas, Costa Rica (Finca 2).....	57
Figura 24. Cadena alimentaria del helecho (<i>Pteridium</i>), y reactividad bajo condiciones fisiológicas del ptaquilósido	65
Figura 25. Diagrama de proceso para la elaboración de queso blando para la evaluación de la estabilidad y prevalencia del PTA.	71
Figura 26. Diagrama de proceso para la elaboración artesanal de yogurt para la evaluación de la estabilidad y prevalencia del PTA.	73
Figura 27. Concentración de biotoxina en leche bovina pasteurizada (mg/kg) en tres niveles de contaminación y dos semanas de almacenamiento en refrigeración a 8 °C, analizada mediante HPLC-DAD 260 nm.	77
Figura 28. Análisis estadístico bivariado del contenido de PTA (mg/kg) con el tiempo de almacenamiento a 8 °C y cambio en la concentración de sal para el queso tipo blando.	79
Figura 29. Concentración de biotoxina en yogurt azucarado (mg/kg) en tres niveles de contaminación y dos semanas de almacenamiento en refrigeración a 8 °C, analizada mediante HPLC-DAD 260 nm.	80
Figura 30. Concentración de biotoxina en queso tipo blando (mg/kg) con tres niveles de contaminación de PTA y concentración de sal (0 %, 1 % y 2 %) y dos semanas de almacenamiento en refrigeración a 8 °C, analizada mediante HPLC-DAD 260 nm.	81

Figura 31. Concentración de biotoxina en el suero del queso tipo blando (mg/kg) con tres niveles de contaminación de PTA (baja (SCB), media (SCM) y alta (SCA) y concentración de sal (0 %, 1 % y 2 %) y al mes de almacenamiento en refrigeración a 8 °C, analizada mediante HPLC-DAD 260 nm..... 83

LISTA DE ABREVIATURAS

PTA	Ptaquilósido
PTB	Pterosina
HEB	Hematuria Enzoótica Bovina
ENIGMA	Epidemiological Investigation of Gastric Malignancies
FUNIN	Fundación Inciensa
CENIBiot	Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas
CENAT	Centro Nacional de Alta Tecnología
UCR	Universidad de Costa Rica
ETA	Enfermedades de transmisión alimentaria
IARC	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
DAD	Detector de arreglo de diodos
MS	Detector de masas
OMS	Organización Mundial de la Salud
APT	Illudano-dienona, ptaquilodienona
ADN	Ácido desoxirribonucleico
LDD	Límite de detección
LDC	Límite de cuantificación
RSD	Desviación estándar relativa
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
SCB	Suero concentración baja
SCM	Suero concentración media
SCA	Suero concentración alta



UNIVERSIDAD DE
COSTA RICA

SEP Sistema de
Estudios de Posgrado

Autorización para digitalización y comunicación pública de Trabajos Finales de Graduación del Sistema de Estudios de Posgrado en el Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica.

Yo, Massiel Rodríguez Salazar, con cédula de identidad 206740846, en mi condición de autor del TFG titulado ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD Y PREVALENCIA DE LA BIOTOXINA PTAQUILÓSIDO EN LECHE BOVINA Y SUBPRODUCTOS LÁCTEOS

Autorizo a la Universidad de Costa Rica para digitalizar y hacer divulgación pública de forma gratuita de dicho TFG a través del Repositorio Institucional u otro medio electrónico, para ser puesto a disposición del público según lo que establezca el Sistema de Estudios de Posgrado. SI ☒ NO * ☐

*En caso de la negativa favor indicar el tiempo de restricción: año (s).

Este Trabajo Final de Graduación será publicado en formato PDF, o en el formato que en el momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre, con el fin de permitir la consulta e impresión, pero no su modificación.

Manifiesto que mi Trabajo Final de Graduación fue debidamente subido al sistema digital Kervá y su contenido corresponde al documento original que sirvió para la obtención de mi título, y que su información no infringe ni violenta ningún derecho a terceros. El TFG además cuenta con el visto bueno de mi Director (a) de Tesis o Tutor (a) y cumplió con lo establecido en la revisión del Formato por parte del Sistema de Estudios de Posgrado.

FIRMA ESTUDIANTE

Nota: El presente documento constituye una declaración jurada, cuyos alcances aseguran a la Universidad, que su contenido sea tomado como cierto. Su importancia radica en que permite abreviar procedimientos administrativos, y al mismo tiempo genera una responsabilidad legal para que quien declare contrario a la verdad de lo que manifiesta, puede como consecuencia, enfrentar un proceso penal por delito de perjurio, tipificado en el artículo 318 de nuestro Código Penal. Lo anterior implica que el estudiante se vea forzado a realizar su mayor esfuerzo para que no sólo incluya información veraz en la Licencia de Publicación, sino que también realice diligentemente la gestión de subir el documento correcto en la plataforma digital Kervá.

CAPÍTULO 1: JUSTIFICACIÓN

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. Estimaciones realizadas en el 2018 por la Organización Mundial de la Salud (OMS) revelan que el cáncer causa más muertes que todas las cardiopatías coronarias y cerebrovasculares. Además, los cambios demográficos y epidemiológicos globales señalan un incremento de casos en las próximas décadas, principalmente en países de ingresos bajos y medios, debido a distintos hábitos de consumo de la población y a cambios climáticos (Ferlay et al., 2015). Se ha reportado casi un millón de casos de cáncer gástrico y más de 700.000 muertes por año en todo el mundo, lo cual lo clasifica como la tercera causa de muerte relacionada con el cáncer a nivel mundial (Ferlay et al., 2015).

En Costa Rica el cáncer gástrico está entre los principales padecimientos de los costarricenses. Los hombres son los más afectados y los pacientes mayores de 85 años son identificados como el grupo etario de mayor incidencia. Además, el riesgo de padecer cáncer gástrico en Costa Rica está determinado primeramente por el lugar de nacimiento, seguido por el lugar de residencia (Vargas-Chaves, 2016).

Se sabe que el cáncer es multifactorial, pero en Costa Rica, desde 1987 se ha encontrado una importante relación con la ingesta de leche contaminada con el helecho *Pteridium aquilinum*. Costa Rica es uno de los países con presencia del helecho, lo que aumenta el riesgo a la exposición a leche contaminada (Villalobos-Salazar et al., 1989). En la revisión realizada por Villalobos (1989), se atribuye esta relación al elevado contenido de la biotoxina ptaquilósido (PTA), la cual se presenta en la leche de ganado que ha ingerido el helecho. Este mismo estudio describe que el consumo de leche, que podría estar contaminada, durante la infancia y la edad adulta, se asocia con un mayor riesgo de padecer cáncer gástrico. Otros estudios realizados en Japón demuestran también una importante relación del helecho con el cáncer humano, ya que se estableció la asociación entre el aumento del riesgo de cáncer de esófago con el consumo directo del helecho (Kamon et al., 1975; Hirayama., 1979; Gil da Costa et al., 2012). Además, la abundancia de malezas como este helecho, presentes en los potreros, coincide con la prevalencia de la enfermedad de hematuria enzootica bovina (HEB), a la cual también se le atribuye una importante relación con el consumo de leche que podría estar contaminada con la biotoxina (Villalobos, 1987).

Pteridium spp es una planta que se ha extendido por todo el mundo; la erosión y la deforestación facilitan su propagación y propician el creciente contacto de malezas con los seres humanos y los animales. Sin embargo, se ha estimado que la cría moderna de animales y el aumento de leche procesada reducen el riesgo potencial de cáncer gástrico asociado a la presencia de ptaquilósido en la leche (Sánchez & Secaira, 2014).

En otro estudio realizado por Villalobos-Salazar et al. (1989) se determinó que la biotoxina está presente en la leche de vaca luego de 54 h después de la ingesta del helecho, alcanzando el pico de mayor concentración a las 78 h y disminuyendo en un 50 % a las 115 h. En este estudio también se estima que procesamientos como la pasteurización y la cocción podrían disminuir los niveles de ptaquilósido en la leche en un 47 % y un 74 %, respectivamente. No obstante, aún no hay estudios que confirmen estos datos, ya que hay aspectos que no son claros y que no se han determinado con respecto a la estabilidad del ptaquilósido en la leche bovina y sus subproductos (Marrero & Calderón, 2012; Francesco et al., 2011) .

No solo en Costa Rica se ha encontrado relación entre la presencia de *Pteridium spp* en zonas ganaderas y la incidencia de cáncer gástrico. Alonso-Amelot & Avendaño (2001) realizaron estudios en Venezuela, donde encontraron una mayor concentración del metabolito ptaquilósido (PTA) del helecho *Pteridium spp* en la leche de vacas provenientes de zonas con pastos invadidos. Específicamente, encontraron una mayor abundancia de helechos en tres regiones de alta incidencia de cáncer gástrico en comparación con otras tres regiones de baja incidencia, que corresponden a zonas de baja altitud del país. Según otro estudio realizado en Ecuador, se encontró residualidad de la biotoxina en la leche bovina proveniente de ganado con y sin signos aparentes de Hematuria Enzoótica Bovina en todas las fincas evaluadas y a distintas altitudes (Calderón et al., 2014).

Casi dos décadas después de las primeras investigaciones realizadas en Costa Rica, el cáncer gástrico sigue siendo una enfermedad de alta incidencia (Vargas-Chaves, 2016). Por esta razón, es necesario realizar estudios que permitan determinar aspectos como la prevalencia y estabilidad del ptaquilósido en leche y subproductos lácteos, evaluar el efecto del procesamiento, elaboración y almacenamiento sobre esta biotoxina y determinar si el consumo de subproductos elaborados con leche que pudiera estar contaminada con ptaquilósido, es también un riesgo para la salud humana, con el fin de actuar y minimizar el impacto que esto pueda ocasionar. En general, se deben tomar precauciones sobre las graves implicaciones que el ptaquilósido causa a la salud, tanto las

que representa para la producción pecuaria como las que repercuten sobre la cadena alimentaria del ser humano. El control de la inocuidad alimentaria constituye actualmente una de las más importantes acciones a realizar, principalmente en las poblaciones más vulnerables. Igualmente, se debe controlar la acumulación de sustancias dañinas en los alimentos de mayor consumo como la leche y sus derivados, que puedan tener implicaciones sanitarias en la salud pública.

CAPÍTULO 2: OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

- 2.1.1. Evaluar la estabilidad y prevalencia de la biotoxina ptaquilósido en leche bovina y subproductos lácteos.

2.2. Objetivos específicos

- 2.2.1. Determinar el mejor método de extracción y cuantificación de ptaquilósido a partir del helecho (*Pteridium spp.*), en la leche bovina y subproductos lácteos.
- 2.2.2. Estudiar el efecto del procesamiento sobre la estabilidad y prevalencia del ptaquilósido en leche bovina contaminada y subproductos lácteos.
- 2.2.3. Establecer la cinética de degradación de ptaquilósido en leche bovina y subproductos lácteos almacenados.

A continuación, se muestra un esquema gráfico del desarrollo de la investigación.

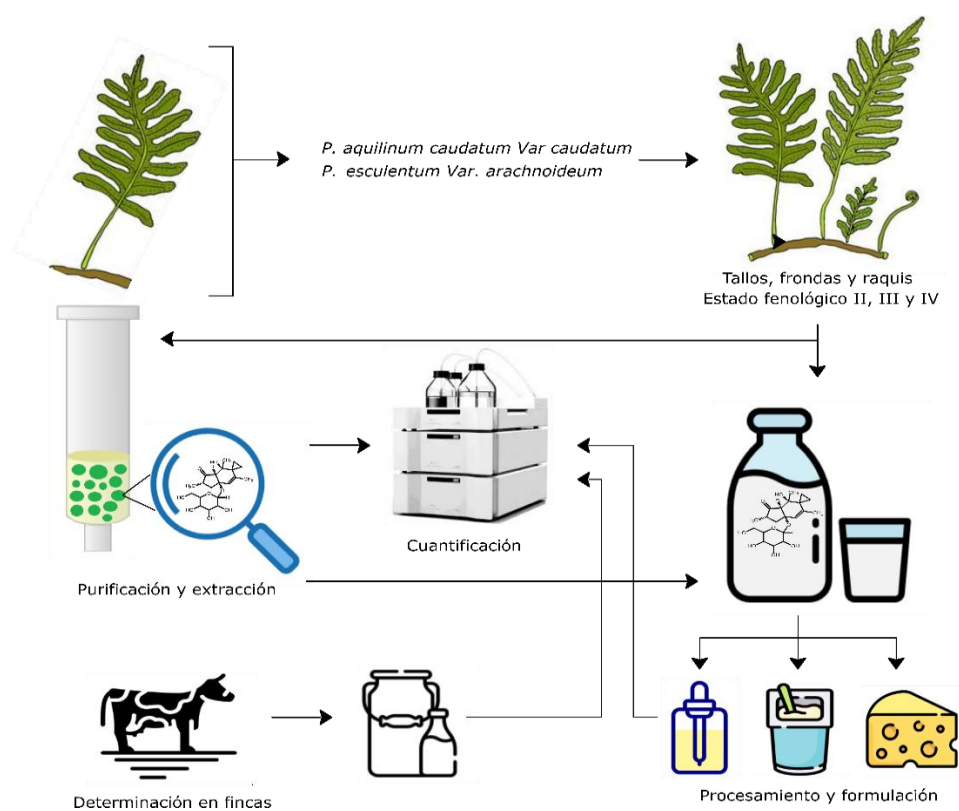


Figura 1. Resumen gráfico del estudio realizado

CAPÍTULO 3: MARCO TEÓRICO

3.1. Naturaleza del *Pteridium spp*

Pteridium spp es un helecho perteneciente a la familia *Pteridaceae*, que se encuentra distribuido alrededor de todo el mundo (Figura 2) y se clasifica como una de las cinco plantas más comunes a nivel mundial (Yamada & Kigoshi, 2007; Marrero & Calderón, 2012). Ha alcanzado una alta capacidad de supervivencia, ya que, una vez que coloniza un potrero o área agrícola, es muy difícil de erradicar (El Machich Sociedad de Producción Rural, 2000). Sin embargo, abandonar el área no siempre es la mejor opción; alternativamente, los helechos pueden ser erradicados a partir de control químico, como el uso de herbicidas. La adición de cal ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), como enmienda agrícola para corregir los problemas de acidez de los suelos es fundamental, ya que, al aumentar el pH del suelo con la adición de cal agrícola, se dificulta la sobrevivencia del helecho, a lo que también contribuyen el control manual o mecánico mediante corte y destroce del helecho (Solano, 2008).

El primer intento por estudiar el helecho fue realizado por Tryon (1941), quien lo definió con una serie de caracteres morfológicos que incluyen pelo de rizoma, vellosidades del raquis y superficie inferior de la fronda, entre otras características; además, catalogó al *Pteridium* como una especie única (*P. aquilinum*), con dos subespecies (spp. *Aquilinum* y *Caudatum*), que contiene 12 variedades. Desde entonces se han descrito nuevas especies y subespecies, los nuevos reportes han coincidido con las conclusiones de Tryon (1941), pero se han estandarizado más objetivamente las subespecies y variedades, así como ordenado su nomenclatura (Marrs & Watt, 2006). En la Figura 2 se muestra la clasificación actual de *Pteridium* y su distribución geográfica; la variedad potencial no confirmada refleja especímenes que aparecen muy cerca de la subespecie, pero que requieren más investigación.

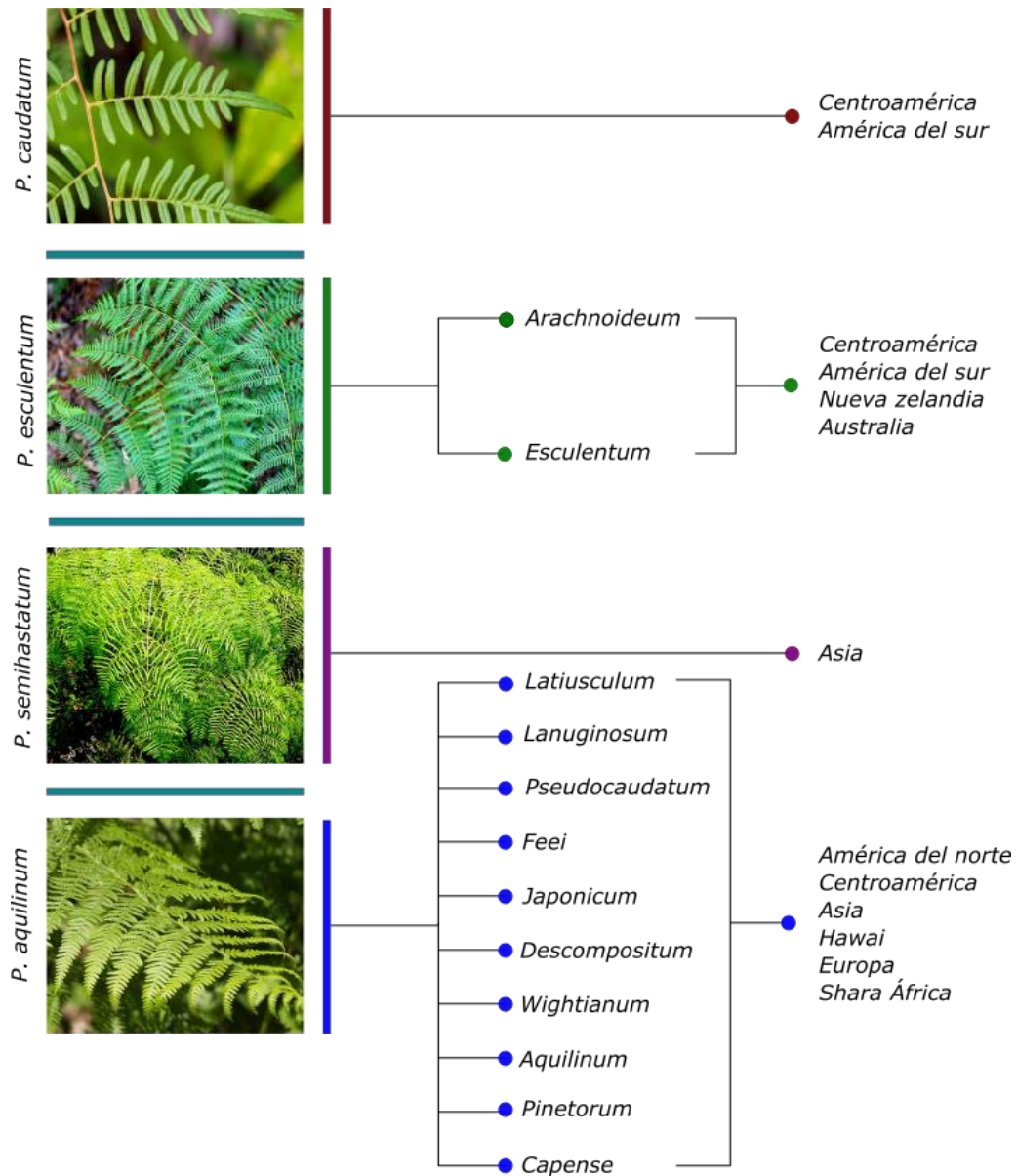


Figura 2. Resumen taxonómico actual de *Pteridium* spp y su distribución geográfica aproximada (Marrs & Watt, 2006).

Desde finales del siglo XIX se han reportado los efectos tóxicos del helecho en el ganado. Los bovinos que ingieren la planta pueden manifestar un síndrome conocido como “Envenenamiento por helecho de ganado” y mueren unas pocas semanas o meses después de mostrar los primeros síntomas (Yamada & Kigoshi, 2007). Durante los estudios realizados al ganado bovino, se descubrió la carcinogenicidad de los helechos; los primeros hallazgos de esta posible carcinogenicidad, fueron reportados por Rosenberger & Heeschen (1960), quienes describieron los cambios en la naturaleza pólipo-tumoral en la mucosa de la vejiga urinaria, junto con hematuria en el ganado que

ingirió el helecho durante un largo período (Rosenberger & Heeschen, 1960; Yamada & Kigoshi, 2007).

Otro dato relevante sobre el helecho es su alta digestibilidad para el ganado. El 53,1 % de la materia seca en el ganado bovino es digerido, por lo que se aumenta el riesgo de excreción en leche de la biotoxina, así como el padecimiento de HEB (Borges et al., 2013).

El *Pteridium* puede persistir en una amplia gama de condiciones ambientales y posee muchas de las cualidades de una planta competitiva, entre estas: la capacidad de almacenar grandes recursos en rizomas, la alta tasa de crecimiento y el desarrollo de una capa densa de hojarasca, que generalmente no se ve afectada por el pastoreo ni la abundancia de insectos y organismos patógenos (Marrs & Watt, 2006). Así mismo, se ha estimado que el contenido de ptaquilósido suele ser más alto al principio de la temporada de crecimiento del helecho y está determinado por el patrimonio genético de los factores externos durante su crecimiento, el clima y las condiciones del suelo (Rasmussen et al., 2005).

En Japón, *Pteridium* se consume como la fronda en desarrollo; en esta etapa la cantidad de toxinas es sumamente alta; por esta razón, en este país se ha identificado la mayor incidencia de tumores gástricos en el mundo posiblemente relacionados con el *Pteridium*. También se han determinado niveles altos de cáncer gástrico en otras áreas donde hay grandes infestaciones de *Pteridium*, como en Costa Rica y Gales del Norte. Igualmente, se ha determinado que algunos de los efectos pueden transmitirse por medio de la leche o por agua contaminada (Marrs & Watt, 2006).

En cuanto a su composición, *Pteridium* puede contener una amplia gama de compuestos vegetales secundarios (Figura 3), entre estos: sesquiterpenoides, glucósidos cianogénicos, taninos y ácidos fenólicos, los cuales le dan ventaja en cuanto al aumento de su resistencia. Por otro lado, también se han identificado compuestos como ptaquilósido, pterosinas, potelósidos y pterianosidos, entre otros (Marrs & Watt, 2006).

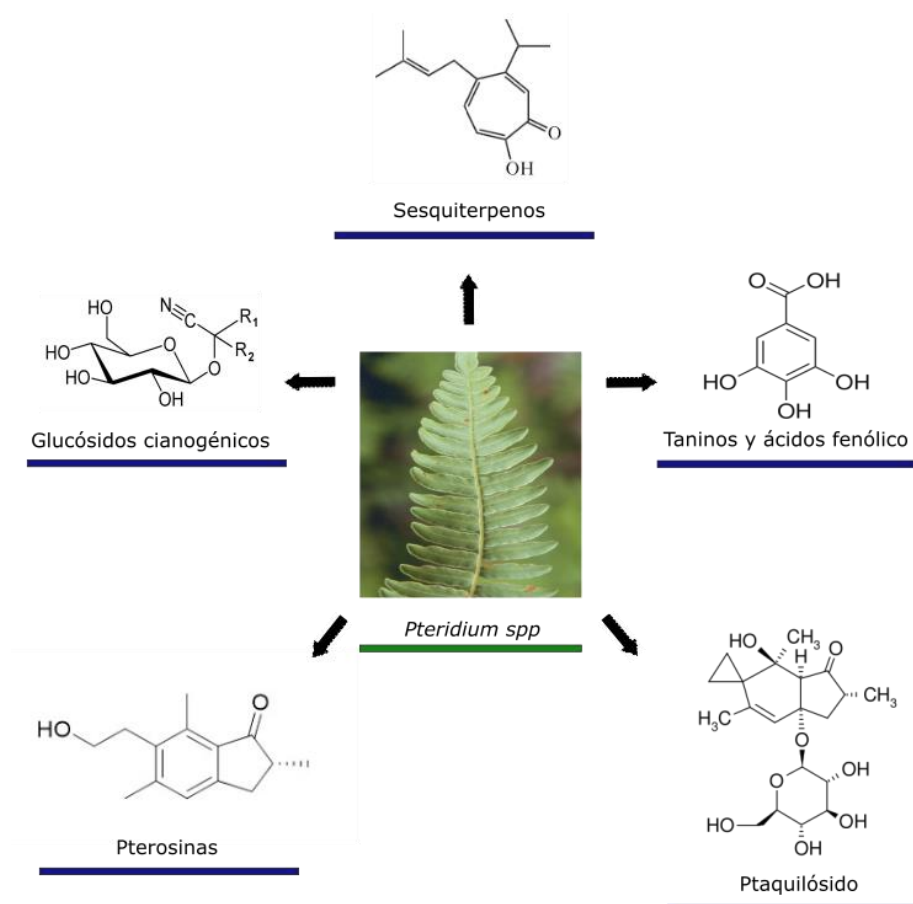


Figura 3. Compuestos químicos identificados en *Pteridium spp*

3.2. Química del ptaquilósido (PTA)

El ptaquilósido es un glucósido norsesquiterpénico del tipo illudano, que puede alcanzar altos niveles en la planta *Pteridium*. En la década de 1970, se aisló una serie de sesquiterpenos de tipo indanón, entre ellos la pterosina B, como los constituyentes característicos del helecho (Marrs & Watt, 2006; Yamada & Kigoshi, 2007).

Un estudio realizado en Australia por Yamada & Kigoshi (2007) determinó que, en 91 muestras de helechos (*Pteridium spp.*), la cantidad de ptaquilósido fue de 20 µg/g a 12945 µg/g de peso seco, mientras que muestras de 25 países variaron de 0 µg/g a 9976 µg/g de peso seco; en promedio, la planta posee aproximadamente 1 % de ptaquilósido en peso seco. Aunque se observó una amplia gama de concentraciones de ptaquilósido a partir de los resultados de la encuesta australiana y mundial, casi la mitad de todas las muestras mostraban concentraciones de ptaquilósido de más de 1000 µg/g de peso seco.

El ptaquilósido es fácilmente soluble en agua y bastante soluble en acetato de etilo, y su relación de separación entre agua y acetato de etilo es de aproximadamente 6:1. El PTA posee una molécula de glucosa unida a su estructura (Figura 4), que incrementa su polaridad y favorece su solubilidad en agua; además, la unión se descompone en soluciones acuosas a temperatura ambiente, a una velocidad que depende del pH de la solución (Marrs & Watt, 2006). La eliminación fácil de la D-glucosa que presenta el ptaquilósido se puede dar mediante condiciones alcalinas, considerando racionalmente la estereoestructura (Yamada & Kigoshi, 2007).

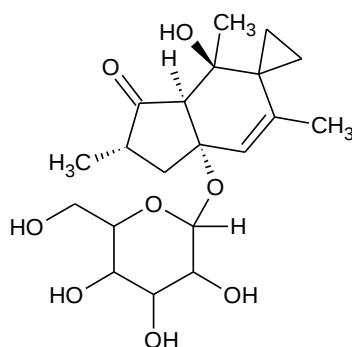


Figura 4. Estructura química del ptaquilósido

Diversos estudios indican que el ptaquilósido en su forma activa actúa como un potente agente alquilante hacia varios nucleófilos para proporcionar compuestos aromáticos tales como la pterosina B (Figura 5) (Yamada & Kigoshi, 2007).

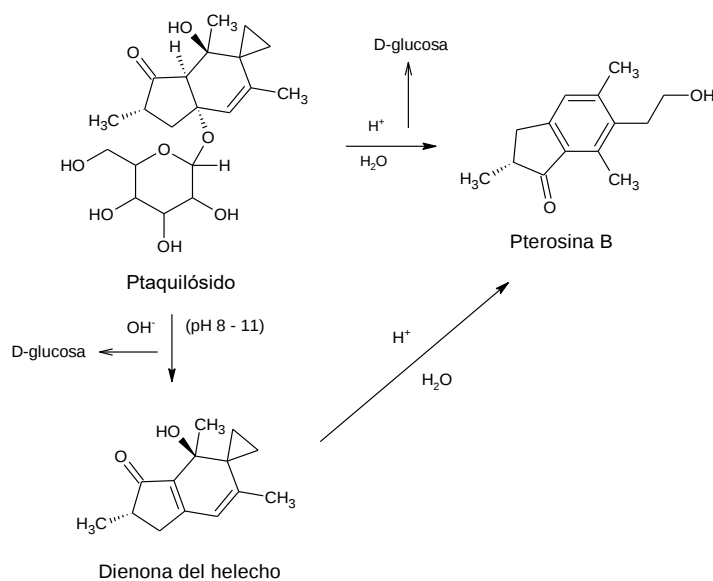


Figura 5. Hidrólisis del ptaquilósido, modificada de (Yamada & Kigoshi, 2007)

3.3. Estabilidad del ptaquilósido (PTA)

El PTA es estable en soluciones acuosas en el intervalo de pH de 4-7, durante un periodo de al menos 24 h; sin embargo, se hidroliza rápidamente a un pH por debajo de 4. Un estudio realizado por Rasmussen et al. (2005) evaluó la estabilidad de extractos de PTA durante las primeras 24 h; en este estudio, el pH inicial era de 6,1, luego se redujo a 5 y se aumentó a 7,5 en los extractos almacenados a 25 °C. Se concluyó que la variación del pH de los extractos se debió a la fermentación, ya que la producción de diferentes ácidos carboxílicos disminuye el pH, a lo que le sigue un aumento en el pH resultante de la liberación de proteínas de los compuestos del helechito en descomposición. Sin embargo, los extractos que fueron almacenados a 4 °C no presentaron las mismas variaciones, ya que esta degradación fue mucho más lenta que a 25 °C y no se produjo hasta las primeras 260 h.

En condiciones de temperatura ambiente, el PTA parece ser estable durante 192 h; no obstante, luego empieza la degradación. A partir de entonces, se ha estimado que la concentración de PTA disminuye a una tasa aproximada de 5,25 % por día, por lo que el PTA sigue estando presente con una estabilidad significativa en extractos acuosos del helechito (Rasmussen et al., 2005).

Aunque aún no existen datos sobre la estabilidad del PTA en leche y subproductos lácteos, se cree que tiene una alta resistencia y estabilidad, por lo que puede representar un riesgo mayor de exposición a esta biotoxina.

Se ha identificado el gran riesgo de la absorción y degradación del PTA, ya que puede filtrarse desde el helechito e ingresar a mantos acuíferos y a otros receptores como arroyos, ríos y lagos. Sin embargo, como ya se ha mencionado, en áreas en donde el consumo de leche depende de las vacas que podrían consumir el helechito, es probable que la leche sea un vector importante de riesgo. Aun así, la contaminación por parte del agua no deja de ser importante, más aún en zonas no destinadas al ganado lechero. Éste puede ser el caso en áreas con muchos pozos de superficie o acuíferos poco profundos situados debajo de suelos de arcilla ligeramente ácidos. Sin embargo, el contenido de PTA en las aguas para consumo aún necesita ser medido (Rasmussen et al., 2005).

Un estudio preliminar realizado por Rasmussen et al. (2005) determinó que el contenido de PTA en 15 muestras de suelo, muestreadas a profundidad de 90 cm en una zona con presencia del helechito, fue de (0 – 7) µg/L. Por otro lado, dos muestras de agua proveniente de pozos donde la superficie estaba rodeada por helechitos mostraron

contenidos de PTA de (30 – 45) µg/L. La transferencia de PTA del helecho al suelo aún no se comprende por completo, por lo que necesita examinarse detenidamente la lixiviación de helechos vivos y muertos (Rasmussen et al., 2003 & Rasmussen et al., 2005).

Se estima que el principal producto de degradación del PTA es pterosina B, ya que en muchos estudios se determina el contenido inicial de ptaquilósido como la suma de pterosina B más el contenido de ptaquilósido en la muestra. Sin embargo, se debe enfatizar que la pterosina B puede originarse a partir de compuestos distintos del ptaquilósido como, por ejemplo, iso-ptaquilósido, que es igualmente cancerígeno. Por esta razón, se considera relevante la determinación de pterosina B como una evaluación del potencial carcinogénico del helecho, ya que la presencia puede indicar la existencia previa del ptaquilósido. Por otro lado, se ha reportado que la cantidad de pterosina B en las frondas de helechos puede alcanzar cantidades de hasta 2100 µg/L (Holm, Schmidt, & Sheffield, 2013).

Rasmussen (2005) no solo realizó los estudios mencionados anteriormente, sino que también evaluó el contenido de PTA en las esporas del helecho, con lo que descubrió que, si toda la pterosina B se origina a partir de ptaquilósido, entonces el contenido original de ptaquilósido de las esporas varía de 7,5 µg/L a 28,5 µg/L. Igualmente, se estimó que el contenido de ptaquilósido pudo haber sido mayor en las esporas frescas que en la maduras, ya que algunas pueden degradarse durante el almacenamiento. Este hallazgo puede explicar la toxicidad de las esporas de helecho en ratones de laboratorio y líneas celulares humanas (Holm et al., 2013).

3.4. Hematuria Enzoótica Bovina (HEB)

Estudios coinciden en que la ingesta de *Pteridium spp* por parte de los animales de granja puede provocar Hematuria Enzoótica Bovina (HEB), la cual se ha identificado como una enfermedad mortal y crónica, que produce neoplasias malignas en la vejiga urinaria (Miesner, M. D. 2009; Latorre et al., 2009; Fletcher et al, 2011; Marrero & Calderón, 2012). De igual forma, se han identificado casos de HEB en varios países del mundo, siendo afectados varios países de Latinoamérica que abarcan regiones ganaderas con geografía montañosa, por lo que la HEB se asocia frecuentemente a selvas tropicales de América del Sur y Centroamérica (Alonso-Amelot et al, 2002; Riet-Correa et al, 2009).

La HEB es la forma más leve de la toxicosis del helecho, ya que la ingestión de grandes cantidades del helecho resulta en toxicosis aguda que se presenta como una hemorragia sistémica aguda, fiebre, pancitopenia por coagulopatía trombocitopénica y supresión de médula ósea. Una vez que el animal está infectado, se puede diagnosticar a partir de examen rectal y ecografía, los cuales pueden revelar una pared de la vejiga engrosada y/o masas intratumorales que sobresalen en la luz. La intoxicación crónica y HEB puede manifestarse en forma intermitente como signo clínico, o puede resultar en animales asintomáticos al inicio de la intoxicación. Por esta razón, se han buscado alternativas para la detección temprana, como la determinación de sangre oculta en la orina (Miesner, 2009).

En Venezuela, Bolivia y Costa Rica se han presentado muchos casos de esta enfermedad. En Venezuela se señala que la incidencia de HEB disminuye drásticamente en las fincas de los llanos y planicies, ya que la presencia del helecho es mayor en las zonas montañosas productoras de ganado (Marrero et al., 2012).

En la región de Bolivia se presentaron coincidentemente dos formas clínicas: Hematuria Enzoótica Bovina y Carcinoma de las porciones superiores del tracto digestivo, lo que reafirmó la gravedad del caso (Latorre et al., 2009). Además, las encuestas toxicoepidemiológicas realizadas a los ganaderos en Bolivia muestran una tasa de incidencia entre 7,8 % y 10,6 % (Marrero et al., 2012).

En Costa Rica se ha identificado una alta incidencia de HEB, por medio de investigaciones que han logrado visualizar la relación existente entre las zonas de pastos invadidas por el helecho, la existencia de HEB y la distribución de cáncer gástrico en humanos (Marrero et al., 2012).

3.5. Carcinogenicidad del ptaquilósido

3.5.1. Mecanismo de acción

De acuerdo con Virgilio et al. (2015), los estudios epidemiológicos revelaron que el consumo de helechos está positivamente correlacionado con el cáncer de esófago en muchas áreas geográficas del mundo y con el cáncer gástrico en la población de agricultores que viven en algunas regiones rurales de Gales y Costa Rica.

Tal como se indicó en el apartado anterior, la reactividad del ptaquilósido es alta, ya que su capacidad de acción como agente alquilante de nucleófilos le permite reaccionar con aminoácidos, nucleótidos y nucleósidos, generando alteraciones en el ADN que llevan a mutaciones, genotoxicidad y carcinogenicidad (Yamada & Kigoshi, 2007).

Se ha propuesto que la activación de ptaquilósido en condiciones alcalinas posee alto poder mutagénico (Figura 6). En estas condiciones, el ptaquilósido experimenta una transformación que implica a la glucosa de la molécula para formar ptaquilosina y luego una separación de un grupo hidroxilo para formar un compuesto de illudano-dienona (APT). APT tiene una mayor capacidad para alquilar ADN que el ptaquilósido, debido a su capacidad electrofílica (Alonso-Amelot & Avendaño, 2002). Aunque APT es estable en condiciones ligeramente alcalinas, se convierte inmediatamente en pterósina B bajo condiciones ligeramente ácidas (Ramwell et al., 2010).

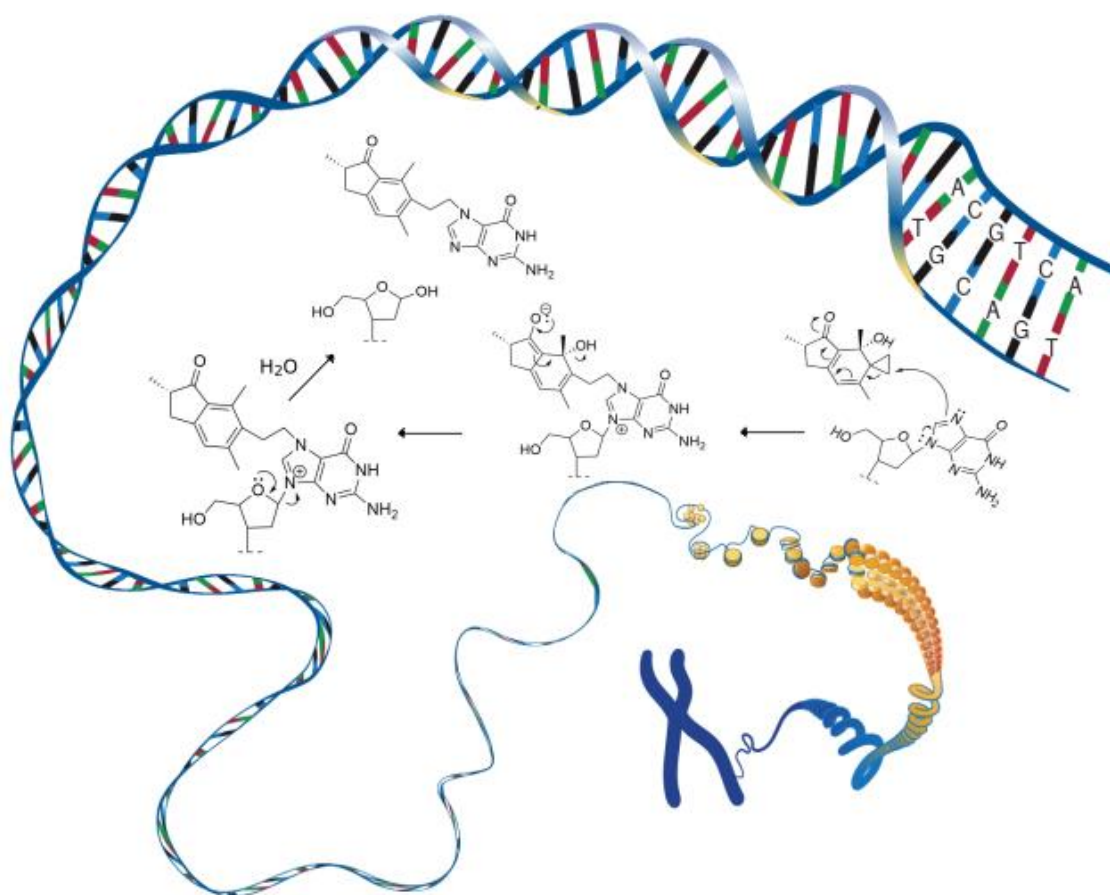


Figura 6. Mecanismo de acción de la APT sobre el ADN

3.5.2. Estudios clínicos

El cáncer gástrico se ha relacionado con la presencia de *Helicobacter pylori*, una bacteria que coloniza el estómago, induciendo una respuesta genotóxica en las células gástricas (Fukase et al., 2008; Gomes, 2012; Laks et al., 2016). A partir del estudio realizado por Gomes (2012), se buscó caracterizar la implicación biológica y molecular de *Pteridium spp* y su toxina ptaquilósido en el proceso de carcinogénesis gástrica, así como evaluar el potencial efecto sinérgico de la infección por *H. pylori*.

Se observó que el tratamiento con extractos de *Pteridium spp* y la toxina ptaquilósido disminuyó la viabilidad celular y promovió la apoptosis en las células epiteliales gástricas. Además, se observó un efecto genotóxico con inducción de roturas de la cadena de ADN, que se exacerbó en presencia de infección por *H. pylori*. Por otro lado, también se demostró que en las células tratadas se produce una acumulación del gen p53, que es una proteína supresora de tumores. Esta proteína se encontró aumentada en presencia de una cepa virulenta de *H. pylori*. La contribución del ptaquilósido a esta actividad genotóxica fue apoyada por la desregulación de otros genes implicados en la regulación del ciclo celular y la reparación del ADN (Gomes, 2012).

Además, utilizando un modelo de ratones expuestos a *Pteridium aquilinum*, se detectaron alteraciones histomorfológicas con el aumento de la proliferación celular y la inducción de mutaciones en el gen p53. Sin embargo, un tratamiento crónico concomitante con *Pteridium aquilinum* e infección por *H. pylori*, no produjo diferencias significativas en la expresión del gen p53. Por otro lado, se indujo un patrón glicofenotípico alterado en la mucosa gástrica de ratones mediante un tratamiento con *Pteridium aquilinum* en presencia de infección por *H. pylori*, y se encontró que varias glicosiltransferasas involucradas en la biosíntesis de antígenos simples de las mucinas y antígenos, presentaron una expresión alterada en la ausencia o presencia de *H. pylori*, respectivamente (Gomes, 2012).

Otro estudio muestra que el ptaquilósido muestra efectos genotóxicos hacia las células humanas de forma dependiente de la dosis. Los resultados muestran un daño considerable en el ADN, que se alcanza en un máximo de 30 min; este daño luego disminuyó progresivamente a los 40 min y 50 min, pero no disminuyó al nivel de control dentro del intervalo de tiempo estudiado. Teniendo en cuenta que el ptaquilósido causa aductos de ADN, este retraso puede deberse a las rupturas producidas durante la

reparación de la escisión de nucleótidos, un proceso que toma más tiempo en las células en reposo. A partir de este estudio se concluye que el ptaquilósido no es sólo un agente de alquilación de ADN, sino que expresa su genotoxicidad a través de múltiples mecanismos, incluyendo la clastogénesis, la aneuploidia y el mecanismo subyacente a la inducción del análisis del intercambio de cromátidas hermanas, que aún continúa en estudio (Gil et al., 2012).

En un ensayo de mutagenicidad en cepas de *Salmonella typhimurium*, se encontró que ptaquilósido extraído del helecho con metanol era mutagénico para ambas cepas, en ausencia de un sistema externo de activación metabólica (Gil et al., 2012). La actividad mutagénica del ptaquilósido sólo se detectó después de la incubación del extracto de metanol en condiciones alcalinas ($> \text{pH } 7$), y se reportó que representó más del 50 % de la actividad mutagénica observada en helechos. Igualmente, se observó una mayor mutagenicidad a niveles de pH más altos y se encontró que la activación del ptaquilósido en un compuesto mutagénico de acción directa se producía muy rápidamente a pH 12; sin embargo, también se produjo a una velocidad más lenta a un pH fisiológico de 7,4 (Ramwell et al., 2010).

Diversos estudios coinciden con los datos de estudios epidemiológicos y de estudios en animales *in vivo*, apoyando además la hipótesis de que el ptaquilósido puede representar una amenaza significativa para la salud humana como potencial carcinógeno, debido a sus compuestos derivados.

3.6. Residualidad del ptaquilósido en la leche

La leche y los productos lácteos se consumen en cantidades significativas en varias regiones del mundo. La subpoblación de lactantes y niños pequeños consumen mayores cantidades de leche que los adultos, por lo que la leche y los productos lácteos pueden representar la fuente más importante de nutrientes en la dieta de ciertas partes de la población. Por esta razón, la inocuidad de este alimento debe tener un control estricto, ya que cualquier contaminante puede representar un riesgo para la salud humana (Fischer et al., 2011).

El ptaquilósido se ha identificado en la leche producida por vacas que han consumido helechos, lo cual se relaciona con infestación por helechos en zonas productoras de leche y con la incidencia de cáncer gástrico, principalmente en poblaciones dedicadas a la ganadería en Costa Rica y otros países (Sánchez & Secaira,

2014). El ptaquilósido se deposita en la leche en forma de una dienona intermedia formada a partir de la pérdida de la glucosa y formación de un anillo ciclopropilo en estado alcalino (Calderón et al., 2014). Los residuos de ptaquilósido en la leche pueden representar una vía de exposición del ser humano a la biotoxina, especialmente en las poblaciones que consumen leche directamente de vacas que han consumido helechos, por lo que resulta de gran importancia realizar investigaciones que permitan evaluar el riesgo potencial sobre la salud humana (Calderón et al., 2014).

El ptaquilósido se ha detectado también en leche de cabras; asimismo, se puede asumir que cuanto mayor sea la altura del terreno donde los animales están pastoreando, se puede encontrar mayor residualidad de PTA en la leche (Virgilio et al., 2015). Además, se han detectado dosis más elevadas en la leche de cabra que en leche de oveja de las mismas manadas mixtas y en el mismo período estacional. Muy probablemente, esto es porque las cabras, más que las ovejas, tienden a consumir las hojas jóvenes y mordisquear los brotes, y en estas se encuentran mayores cantidades de ptaquilósido (Virgilio et al., 2015).

Se ha establecido que el ptaquilósido se deposita en la leche de manera variable; se han reportado tasas de deposición entre el 1 % y el 11 % del ptaquilósido ingerido, que corresponden a aproximadamente a 0,1 mg/L y 22,0 mg/L, respectivamente (Fischer et al., 2011). Lo anterior coincide con lo reportado en la revisión de Yamada & Kigoshi (2007), en la cual, a partir de un método analítico para la determinación del contenido de ptaquilósido en leche, se obtuvieron cantidades mínimas de 0,11 mg/L de PTA en la leche. Así como también se reporta que el ptaquilósido se deposita en la leche a una concentración de $(8,6 \pm 1,2)$ % de la cantidad de helecho ingerida por la vaca, que fue linealmente dependiente de la dosis (Yamada & Kigoshi, 2007).

Con base en los datos anteriores, y suponiendo que una persona ingiere aproximadamente 0,5 L de leche diariamente, se podría estimar que una persona ingeriría aproximadamente 10 mg de ptaquilósido por día, la cual es una cantidad bastante alta cuando se habla de una biotoxina (Alonso-Amelot, Perez-Mena, Calcagno, & Jaimes-Espinoza, 1992; Yamada & Kigoshi, 2007).

Alonso-Amelot & Avendaño (2001) detallan en su publicación datos importantes sobre estimaciones de consumo del helecho y la cantidad de ptaquilósido que el ganado puede ingerir. Se supone que, en zonas donde existe gran cantidad de este helecho, durante cuatro días a la semana, un 10 % del forraje total consumido (2,4 kg/día) por el ganado bovino, corresponde a estos helechos; además, se parte del hecho de que 1 kg de

frondas frescas de helechos podría contener 130 mg de ptaquilósido. Esto resulta en que, durante los 4 días de consumo estimado, el animal podría haber consumido 1250 mg de ptaquilósido, del cual aproximadamente el 8 % (100 mg) se habría excretado en la leche. Aunado a esto, si se asume que el ganado podría producir 42 L por semana durante la temporada lluviosa y, considerándose una reducción en la producción del 30 %, la cantidad de ptaquilósido excretada en la leche sería de 2,4 mg por litro de leche (Alonso-Amelot & Avendaño, 2001).

A través de diversos estudios se ha encontrado gran variabilidad en la cantidad de ptaquilósido en las frondas de helecho, hasta 2500 mg de ptaquilósido por kilogramo de helecho, lo que significaría un máximo de 45 mg de esta biotoxina por litro de leche. La porción de este material que se descompondrá en pterosina B por las condiciones ácidas que prevalecen en el estómago humano no se conoce, pero se presume que una fracción significativa se convertirá primero en ptaquilósido activado e inducirá lesiones en el ADN, que se podrían manifestar como cáncer del tracto digestivo superior (Alonso-Amelot & Avendaño, 2001). También se han reportado datos en los rizomas subterráneos de helechos, donde el PTA se encuentra entre 5 µg/g y 7050 µg/g, exhibiendo concentraciones pico en el otoño, mientras que el contenido de PTA en las raíces se encuentra en un rango de (5 - 230) µg/g (Rasmussen et al., 2005).

3.7. Leche cruda en Costa Rica

La leche es uno de los alimentos de mayor importancia a nivel mundial por su gran aporte nutricional; por lo tanto, requiere de un estricto control de calidad. Igualmente, por la gran demanda global de este alimento, es relevante conservar su calidad e inocuidad con el fin de mantener la salud pública (Reyes et al., 2011; FAO 2015).

Además de la leche que se comercializa y procesa formalmente, existe un sector artesanal o informal y un sector de autoconsumo. En el sector informal se comercializa leche cruda, que se produce y vende sin control sanitario, sin supervisión estatal y casi sin control por falta de organización (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2007).

Procesos como la pasteurización han disminuido los riesgos de consumo de leche contaminada; sin embargo, aún existe una parte importante de la población que consume leche sin pasteurizar y los subproductos de ésta, como quesos, natilla y cuajada. Dentro de la población que mayoritariamente consume leche cruda se ha identificado a los

misimos productores de leche y habitantes de zonas rurales, que disfrutan de la venta de leche y subproductos en ferias o que les son vendidos a domicilio (Zumbado-Gutiérrez & Romero-Zuñiga, 2015).

Se considera que sólo en la sección occidental del país, un 40 % de la leche aún se comercializa en el mercado informal, que corresponde aproximadamente a 404 fincas, y casi todo se comercializa en forma de quesos no pasteurizados (un 32,5 %) o con un bajo nivel tecnológico de procesamiento (Ministerio de Agricultura y Ganadería , 2007). En cuanto a la venta de leche cruda, se estima que representa el 5 % del total y se comercializa entre vecinos de forma local; por otro lado, solo el 2,5 % de la natilla producida se vende informalmente (Ministerio de Agricultura y Ganadería , 2007).

Así mismo, se estima que el sector de autoconsumo representa al menos el 10 % de la producción de leche fresca que no ingresa a los canales de comercialización, sino que se consume en las mismas fincas, muchas veces de forma poco tecnificada y con bajo control sanitario (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2006).

Es importante recordar que, además del riesgo de contaminación por microorganismos, la leche puede ser contaminada por cualquier sustancia química o biológica que, al ser consumida por el animal, pueda depositarse o metabolizarse en la leche y en la carne, con efectos nocivos para el consumidor (FAO 2012).

También es importante asumir mayor control sobre estos sectores de comercialización y procesamiento de la leche, ya que el riesgo de sufrir alguna enfermedad de transmisión alimentaria (ETA) se ha incrementado notablemente durante los últimos 30 años. Igualmente, el microbiota de la población ha ido cambiando; por ejemplo, el sector ganadero ha ido creciendo y aún existe un deficiente control sobre las buenas prácticas para la manipulación de alimentos (Zumbado-Gutiérrez & Romero-Zuñiga, 2015). Actualmente, casi un cuarto de la población tiene un alto riesgo de padecer alguna enfermedad por esta causa, consecuentemente, la prevención de enfermedades de transmisión alimentaria sigue siendo un importante problema de salud pública (Zumbado-Gutiérrez & Romero-Zuñiga, 2015).

CAPÍTULO 4: PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

4.1. Apoyo del proyecto de investigación

El origen de este estudio surgió a partir del proyecto “Epidemiological investigation of Gastric Malignancies” (ENIGMA), que tiene como fin contribuir a dilucidar las razones de la variación geográfica en cáncer gástrico y predecir la carga futura de la enfermedad según la prevalencia de *Helicobacter pylori*. Este proyecto también busca proporcionar información sobre los cofactores de cáncer gástrico necesarios para llevar a cabo el control de casos y estudios con el fin de confirmar su papel en la carcinogénesis gástrica. En Costa Rica, la Fundación Inciensa (FUNIN), entidad privada sin fines de lucro, promueve y desarrolla la investigación en salud pública de clase mundial, y enfatizará en investigaciones a nivel poblacional, estadística y censos en dos zonas de alta y baja incidencia de cáncer gástrico y establecerá la vinculación con la presencia del helecho.

A raíz de las investigaciones anteriores, se busca establecer otras ramas de estudio también vinculadas al tema. La presente investigación fue inscrita como proyecto en la Universidad de Costa Rica por la Estación Experimental de Ganado Lechero Alfredo Volio Mata de la Facultad de Ciencias Agroalimentarias de la Universidad de Costa Rica (UCR), y contó con el apoyo del Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas (CENIBiot), perteneciente al Centro Nacional de Alta Tecnología, por medio de Becas CeNAT que buscan apoyar a los estudiantes y responder a la necesidad que tienen las universidades públicas de brindar acceso a los alumnos a instalaciones de alta tecnología, como laboratorios y equipos especializados.

4.2. Localización

La recolección del helecho *Pteridium spp.* se realizó en zonas de Cartago y Zona de los Santos, y la recolección y acondicionamiento de las muestras de leche fue efectuada en la Estación Experimental de Ganado Lechero Alfredo Volio Mata de la Facultad de Ciencias Agroalimentarias de la UCR, ubicada en Ochomogo, Cartago. Igualmente, la elaboración de subproductos lácteos (yogurt y queso) y extracción del ptaquilósido fue efectuada el Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas (CENIBiot), ubicado en Pavas, San José.

CAPITULO 5: ESTANDARIZACIÓN E IMPLEMENTACIÓN DE UN PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PTAQUILÓSIDO A PARTIR DEL HELECHO (*PTERIDIUM SPP.*), EN LECHE BOVINA Y SUBPRODUCTOS LÁCTEOS

RESUMEN: En diferentes regiones alrededor del mundo, se ha reportado la presencia de helechos del género *Pteridium spp*, que tiene un alto contenido de norsesquiterpeno ptaquilósido, compuesto que se ha identificado a través de diversos estudios como altamente tóxico. Esto ha afectado negativamente la crianza animal vacuna y supone un riesgo potencial para el humano, por los residuos de este componente tóxico de la planta en la carne y la leche. El presente estudio busca estandarizar, validar e implementar una metodología de extracción y cuantificación de la biotoxina ptaquilósido (PTA) en helechos y lácteos de manera rápida y precisa mediante HPLC-DAD, de forma que permita realizar más estudios sobre la diversidad de variedades de *Pteridium spp*, así como sobre la excreción de la biotoxina en leche bovina y su estabilidad en productos lácteos. Se identificó la presencia de ptaquilósido (PTA) y pterosina B (PTB) en muestras de *Pteridium spp*, mediante MS/MS, se identificó la presencia de los picos 398 m/z y 218 m/z [M – Glu] + de PTA, 219 m/z [M + H] + y del fragmento ión dominante de PTB, que se observó a 201 m/z. La extracción en agua y posterior purificación en poliamida y amberlite® resulta ser una metodología adecuada para la obtención de un extracto concentrado de PTA con concentraciones de hasta 4,69 mg/g. La validación del método reportó LDD y LDC como 0,03 mg/L y 0,09 mg/L respectivamente, y se estimó una adecuada linealidad. El método se evaluó como repetible y presentó buena recuperación para muestras de leche y yogurt, y se evaluó la robustez del método tanto en helechos como en leche. En los lácteos, los parámetros para realizar la conversión de PTA a PTB, fueron los más sensibles.

Palabras clave: *Pteridium spp*, ptaquilósido, validación, HPLC-DAD

5.1.Introducción

El helecho (*Pteridium aquilinum*) es conocido por ser altamente invasivo en todo el mundo, pero también se ha destacado su gran toxicidad debida a su composición química, principalmente relacionada con la presencia de norsesquiterpenos glucosidados, de los cuales el ptaquilósido (PTA) ha sido el más estudiado (Aranha et al., 2014).

El PTA es un compuesto inestable en condiciones acuosas, alcalinas, ácidas y a temperatura ambiente, ya que se produce aromatización con desglucosilación de d -(+) - glucosa para producir compuestos como la pterosina B (PTB) (Rasmussen et al., 2003; Virgilio et al., 2015; Fletcher et al., 2011 & Alonso-Amelot et al., 1998). Durante este proceso de degradación o transformación, el PTA puede transformarse en una dienona conjugada inestable si las condiciones iniciales son alcalinas. Esta dienona es conocida como ptaquilodienona, y se ha demostrado que puede reaccionar con el ADN gracias a

su fuerte propiedad alquilante (Rasmussen et al., 2005). Debido a esta característica de la dienona, el PTA se ha caracterizado, a través de diversos estudios, como una vía para la citotoxicidad, genotoxicidad y el desarrollo de tumores en el tracto urinario y gastrointestinal, tanto en animales que han ingerido el hehecho, como en humanos (Gomes et al., 2012).

Se han identificado al menos cuatro vías de exposición de la biotoxina en seres humanos (Figura 7), tales como el consumo de leche y carne contaminada, inhalación de esporas del hehecho o a partir de la ingesta de agua contaminada (Bonadies et al., 2011; Fletcher et al., 2011; Jensen et al., 2008). Por otro lado, existe evidencia de que el ptaquilósido se ha encontrado en la leche, y que la infestación de hehechos podría estar relacionada con la incidencia de cáncer gástrico en poblaciones de agricultores que habitan en áreas de distribución de ganado en Costa Rica y otros países (Calderón et al., 2014).

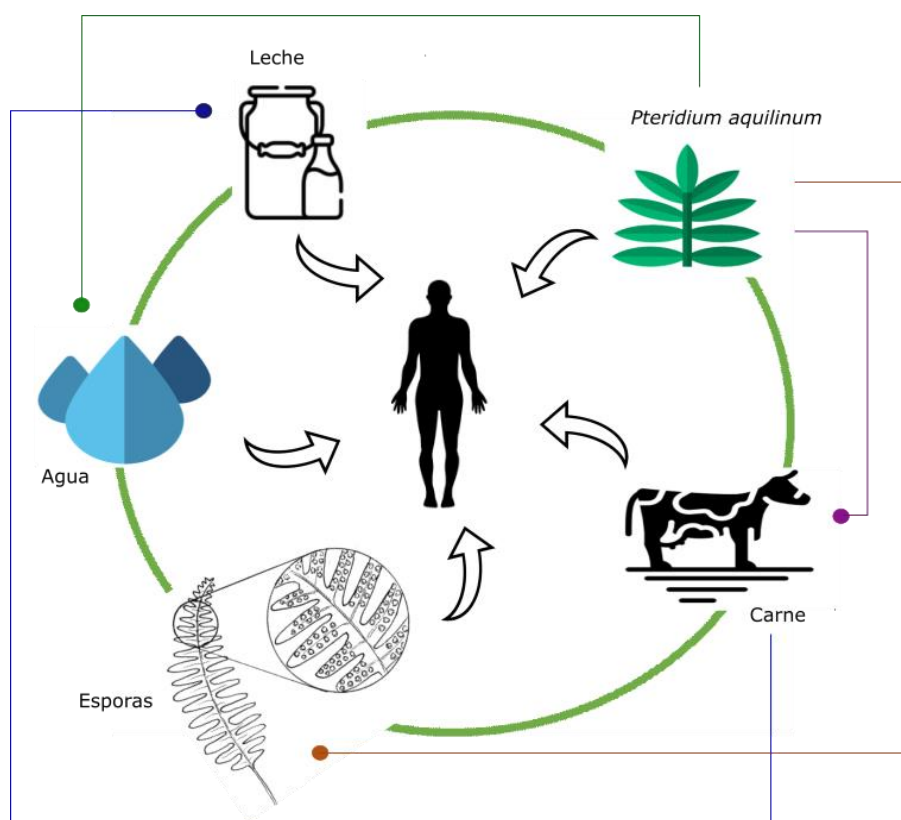


Figura 7. Vías de exposición del ptaquilósido (PTA) a los seres humano

El ptaquilósido puede ser extraído y cuantificado directamente a 220 nm o 214 nm, sin embargo, es comúnmente cuantificado de forma indirecta, mediante la conversión a pterosina B por tratamiento ácido-base y calentamiento. Esto se da porque la pterosina B

aumenta la respuesta UV, lo que disminuye el límite de detección, además de que es mucho más estable que el ptaquilósido (Jensen et al., 2008). La determinación del contenido de ptaquilósido mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) permite realizar el análisis de muestras en tiempos cortos, con alta sensibilidad y selectividad (Wren et al., 2006; Rodríguez-Aller et al., 2013). Adicionalmente a la técnica de cuantificación, la implementación y validación de una metodología de extracción que permita realizar estudios del contenido de PTA en leche y subproductos lácteos es de suma importancia, ya que existen países con un alto grado de afectación que no cuentan con la implementación de una metodología que permita realizar los estudios necesarios para identificar el riesgo de exposición a la biotoxina.

Está claro que la estabilidad del PTA amerita más investigaciones, ya que no se puede asumir que la biotoxina todavía esté presente en la leche después de la pasteurización o esterilización, ni después del procesamiento para elaboración de los subproductos lácteos (Bonadies et al., 2011). Es importante recordar que además del riesgo de contaminación por microorganismos, la leche puede contaminarse por medio de cualquier sustancia química o biológica que, al ser consumida por el animal, pueda ser depositada o metabolizada y acumulada en la leche y en la carne, y producir efectos nocivos en el consumidor (FAO, 2012). Es importante asumir mayor control, ya que el riesgo de sufrir enfermedades de transmisión alimentaria (ETA) se ha incrementado de forma notable durante los últimos 30 años. En la actualidad, casi un cuarto de la población corre un riesgo de padecer alguna enfermedad por esta causa, lo cual sigue siendo un importante problema de salud pública (Zumbado-Gutiérrez & Romero-Zuñiga, 2015).

El objetivo de este trabajo es implementar y validar un método por HPLC-DAD rápido, preciso y robusto, para la cuantificación de PTA y PTB en muestras de helechos y en muestras lácteas, mediante curva de calibración. Igualmente, busca proporcionar un método rápido y confiable para estudiar más diversas variedades de *Pteridium spp*, así como la excreción de la biotoxina en leche bovina y su posterior estabilidad en subproductos lácteos procesados y sin procesar, lo que permitirá tener un mayor control de la inocuidad alimentaria, con mayor énfasis en las poblaciones más vulnerables. Por último, busca controlar la acumulación de sustancias dañinas en los alimentos de mayor consumo, como la leche, que puedan causar implicaciones sanitarias en la salud pública.

5.2. Materiales y métodos

5.2.1. Reactivos químicos y materiales

Estándar pterosina B 98 % fue adquirido de Aobious (U.S.A, Gloucester). Metanol grado HPLC, etanol absoluto grado ACS y ácido clorhídrico grado analítico fueron adquiridos de Sigma–Aldrich® (Milwaukee, WI, U.S.A). Hidróxido de sodio pellets para análisis y Acetonitrilo Lichrosolv® fueron adquiridos de Merck (Darmstadt, Alemania). Diclorometano grado ACS obtenido de J.T. Baker® (U.S.A). Agua desionizada obtenida a partir de un sistema de purificación MilliQ Plus (Miliford, MA, U.S.A). Ácido orto-fosfórico 85 % (H₃PO₄) obtenido de Fermont® (U.S.A). Acetato de etilo grado ACS obtenido de JT.Baker (México). Resina Poliamida 6 (tamaño de partícula (50-160) µm de Sigma-Aldrich® (Alemania) y resina amberlite ® XAD HP 20-60 mesh Sigma-Aldrich® (Francia).

5.2.2. Recolección y preparación de las muestras

La recolección del helecho *Pteridium spp.* se realizó en el Cerro de la Muerte, también llamado Cerro Buenavista, un macizo de 3491 metros de altitud que forma parte de la Cordillera de Talamanca en el eje montañoso central de Costa Rica, en las provincias de Cartago y San José (9°34'00"N 83°45'00"O). Las muestras de helecho correspondieron a las especies de *P. aquilinum caudatum var. caudatum* y *P. esculentum var. arachnoideum*, que se muestrearon de forma aleatoria. La identificación de las especies fue realizada por el Dr. Alexander Rojas Alvarado, taxónomo de la Universidad Nacional de Costa Rica.

La muestra estuvo compuesta tanto de helechos tiernos como maduros. Los helechos se cortaron desde la raíz y se almacenaron en bolsas o sacos a temperatura ambiente, protegidos de la luz, y en menos de 48 h, se prepararon para el proceso de liofilización. Una vez liofilizados, se molieron hasta obtener un polvo fino y se almacenaron en un lugar oscuro y fresco a una temperatura de 10 °C en bolsas o frascos protegidos de la humedad, el calor y la luz.

La recolección y acondicionamiento de las muestras de leche fue efectuada en la Estación Experimental de Ganado Lechero Alfredo Volio Mata de la Facultad de Ciencias

Agroalimentarias de la UCR, ubicada en Ochomogo, Cartago. Se tomaron muestras de leche de vaca (*Bos taurus*) procedente de animales de raza Jersey; los animales estaban sanos y libres de hematuria enzoótica bovina (HEB) durante el periodo de investigación. Igualmente, la alimentación se mantuvo constante y estuvo compuesta mayoritariamente por pasto estrella africana (*Cynodon dactylon*) y concentrado. La leche utilizada estaba exenta de la presencia de la biotoxina, ya que la estación ganadera se encuentra libre del helecho y la muestra fue obtenida durante el ordeño de la mañana (6:00 am), actividad que se ejecutó con buenas prácticas de ordeño, que forman parte del protocolo usual de la Estación Experimental Alfredo Volio Mata. Las muestras de leche se almacenaron a 4 °C por un periodo no mayor a 36 h y fueron transportadas al Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas manteniendo la cadena de frío por medio de hieleras asépticamente sanitizadas.

5.2.3. Extracción y purificación del ptaquilósido (PTA) a partir del helecho (*Pteridium spp*)

Se siguió la metodología sugerida por Rasmussen et al, (2005); Aranha et al, (2014) y Clauson-kaas et al, (2016), con modificaciones (Figura 8). El PTA se aisló y se purificó a partir de polvo de helecho; del total del material molido, se pesaron 100 g, se les adicionó 500 mL de agua destilada y se mantuvieron en agitación durante 60 min. Una vez transcurrido el tiempo, el extracto se filtró y se concentró en un rotavapor para eliminar la mayor cantidad de agua. El extracto filtrado y rotavaporado se pasó a través de una jeringa de 100 mL, acoplada a una cámara de vacío y empacada con 10 g de resina de poliamida 6 (tamaño de partícula (50-160) µm, Sigma-Aldrich); seguidamente, se pasó una cantidad aproximada de 100 mL de agua desionizada a la jeringa. La muestra se eluye a gravedad; sin embargo, en algunos casos, para favorecer una elución más rápida, se aplicó presión desde una bomba de vacío, seguidamente se recolectó el eluato y los compuestos retenidos en la columna se eluyeron con etanol; este extracto fue concentrado en rotavapor, y se almacenó para su posterior análisis.

El extracto obtenido con agua se pasó por una segunda columna de vidrio con tamaño aproximado de 2,5 cm de diámetro por 33 cm de largo y se empacó en húmedo con 100 g de resina Amberlite XAD2 (Supelco). La columna fue previamente activada con metanol y enjugada con agua; primeramente, se le adicionó el eluato y se lavó con 150 mL de agua desionizada y 50 mL de etanol, luego se eluyó el extracto con 150 mL

de etanol y, finalmente, el extracto colectado se concentró en un rotavapor hasta sequedad a una temperatura no mayor a 42 °C.

Adicionalmente, se realizó una segunda extracción, en la que se tomaron 50 g de muestra pulverizada de frondas de helecho y se le adicionó 250 mL de una mezcla de agua y acetato de etilo en una proporción de 50:50. Esta mezcla se mantuvo en agitación en baño ultrasónico durante 1 h; seguidamente, el extracto se decantó y se filtró, y luego se concentró en un rotavapor a una temperatura no mayor a 42 °C, sin llevar a sequedad. Por último, el extracto se congeló y se liofilizó, y posteriormente se realizó su conversión de PTA a PTB por triplicado y se cuantificó.

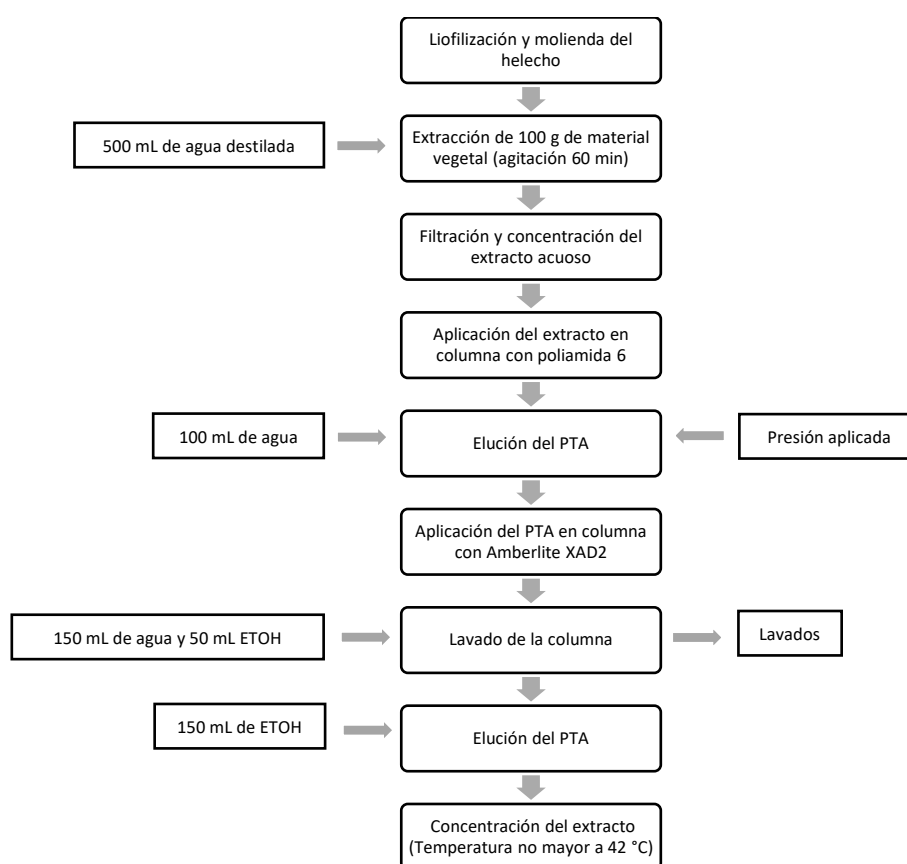


Figura 8. Diagrama de flujo para la metodología de extracción y purificación del PTA a partir del helecho.

5.2.4. Cuantificación de PTA en el extracto de *Pteridium spp*

Para la cuantificación de PTA fue necesaria la conversión de PTA a PTB, por tratamiento ácido, básico y con calor, ya que, el PTB es la forma más estable de la biotoxina (Aranha et al., 2014). Para la conversión de PTA a PTB, se adicionó 150 µL de

NaOH 1 mol/L (hasta pH 11) a 2 mL del extracto acuoso de PTA y se incubó a 45 °C, durante 60 min. Después, se dejó enfriar y se le adicionó 150 µL de HCl 5 mol/L (hasta pH < 2) para finalizar la conversión de PTA a PTB; el extracto fue extraído con 3 porciones de 1 mL de diclorometano cada una. Finalmente, los extractos se colectaron y se rotavaporaron a una temperatura no mayor a 42°C, el residuo se reconstituyó con 2 mL de una mezcla metanol: agua al 50:50, se pasó a través de un filtro de 0,45 µm y se depositó en un vial para HPLC de vidrio color ámbar, para su posterior cuantificación mediante HPLC-DAD; los resultados obtenidos se expresaron en mg/kg.

5.2.5. Cuantificación de PTA en el extracto muestras de lácteas

Se preparó una disolución madre de PTA a una concentración entre (4 – 6) mg/L en agua desionizada, la cual se analizó mediante conversión de PTA a PTB para conocer la concentración exacta de PTA. Seguidamente, se tomaron las alícuotas correspondientes para la contaminación de las leches a las concentraciones de 0,23 mg/L, 0,43 mg/L y 0,77 mg/L y 0,10 mg/L, 0,24 mg/L y 0,35 mg/L, para las muestras de yogurt.

A partir de leche fresca cruda bovina contaminada y muestras de yogurt azucarado contaminado con el extracto de PTA, se estandarizó el proceso de extracción y conversión de la biotoxina en lácteos (Figura 9). Para la precipitación de proteínas, la muestra de leche bovina fresca y las muestras de yogurt se trataron con un aproximado de 3 mL de metanol, agitándolas en baño ultrasónico por 15 min; se utilizó un aproximado de 2 mL de leche y 2 g para yogurt. Las muestras se trataron por triplicado. Seguidamente, las muestras se centrifugaron a 3000 rpm por 5 min y se filtraron. El sobrenadante se trató con 3 mL de acetonitrilo, para la precipitación de lípidos y se agitó en baño ultrasónico por 15 min más.

Al líquido sobrenadante se le realizó la conversión de PTA a PTB, con las mismas cantidades de NaOH y HCl utilizado en las muestras de helecho, y se incubaron a 45 °C durante 60 min. Posteriormente, las muestras se diluyeron a 30 mL con agua destilada, se congelaron y se liofilizaron; finalmente el extracto seco se reconstituyó con 2 mL de una disolución metanol:agua (50:50). El extracto obtenido se pasó a través de un filtro de 0,45 µm y se depositó en un vial para HPLC de vidrio color ámbar, para su posterior cuantificación mediante HPLC-DAD. En el caso de la leche, los resultados son expresados como mg/L y en yogurt como mg/kg debido a la naturaleza física de las muestras.

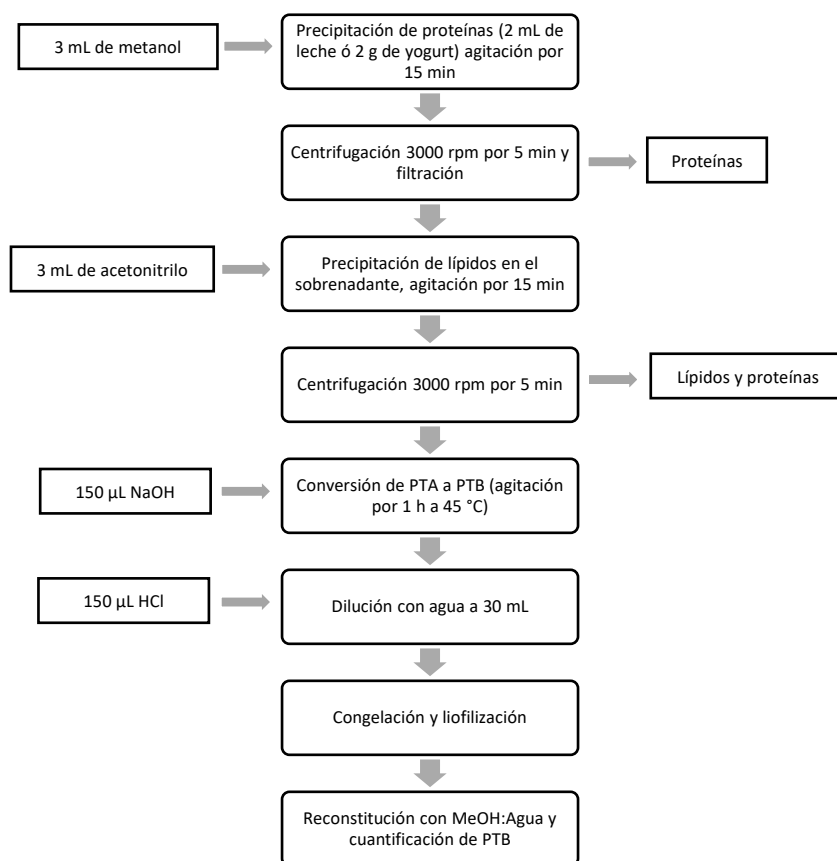


Figura 9. Diagrama de flujo para la metodología de extracción PTA y conversión a PTB a partir de leche o yogurt.

5.2.6. Preparación de curva de calibración

El PTB se cuantificó mediante una curva de calibración realizada a partir de un estándar de alta pureza, en un rango de valores de (0,30 - 3,00) mg/L (Calderón et al., 2014; Sánchez & Secaira, 2014). En el extracto acuoso de PTA puede existir alguna pequeña cantidad de PTB, por lo que en este caso se restó la cantidad cuantificada antes de la conversión de PTA a PTB, a la cantidad obtenida de PTB posterior a la conversión de PTB, con el fin de obtener la cantidad equivalente de PTA presente en el extracto inicial u otras formas tóxicas del sesquiterpeno.

Para la preparación de la curva de calibración se pesaron 0,001 g de estándar, se disolvieron en metanol y se aforaron hasta 100 mL, para obtener una concentración final de 10 mg/L de esta disolución, se prepararon estándares de 0,3 mg/L, 0,5 mg/L, 1,0 mg/L, 1,5 mg/L, 2,0 mg/L y 3,0 mg/L. Todos se aforaron con metanol grado HPLC, se filtraron porciones a través de un filtro de 0,45 µm y se guardaron en viales para HPLC de vidrio color ámbar.

5.2.7. Análisis instrumental

La identificación se llevó a cabo en un espectrómetro AB SCIEX sistema 4000QTrap® triple cuadrupolo/ QqQLIT equipado con una interfase TurboIon-Spray™ y Analyst 1.6.2 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Se optimizaron los diferentes parámetros de ionización así como de fragmentación, para identificar la presencia de PTA y PTB en el extracto acuoso obtenido a partir de las frondas de helecho de *Pteridium spp.* Se realizó la inyección del extracto directamente en la fuente de iones del espectrómetro de masas a un caudal de 10 µL/min, usando una bomba de jeringa. La fuente de iones ESI se operó en modo positivo con los siguientes parámetros: Gas cortina (CUR 21 psi); Ion Spray (IS -5500 V); Temperatura de gas turbo (TEM 150 °C); Gas de nebulización (GS1 25 psi); Gas turbo (25 psi), Unidad de resolución /Unidad, DP 20, CE 25, CXP 10 para PTA y DP 50, CE 26, CXP 10 para PTB. La identificación de los compuestos individuales se basó en datos espectrales de MS/MS, que coincidían con los datos reportados en la literatura existente y el patrón de fragmentación del estándar.

Para la cuantificación se utilizó un sistema HPLC Agilent 1200 (constituido de una bomba de vacío degasificadora, un automuestrador, una bomba binaria y un compartimento para columna termoestable, marca Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA), se inyectaron 90 µL a una columna analítica phenomenex (Luna® 5 µm C18 (2) 100 Å, LC Column 250 x 4.6 mm, Ea) con precolumna (Zorbax plus C18, 5 µm particle size, 4.6 x 12.5 mm), a una temperatura de 25 °C. La fase móvil consistió en agua con H₃PO₄ 0,1 % (eluyente A) y metanol (eluyente B), y el gradiente de elución fue isocrático 50 % de B y 50 % de A, a una velocidad de flujo de 1 mL/min durante 13,5 min a una longitud de onda de 260 nm.

5.2.8. Validación del método de extracción y cuantificación de ptaquilósido en helecho y leche

Una vez determinadas las mejores condiciones de extracción del ptaquilósido a partir del helecho, leche y subproductos lácteos, se procedió a realizar las pruebas de validación con el fin de darle mayor validez a los resultados y evaluar si los procedimientos de extracción y cuantificación son aptos para la aplicación en matrices como helechos y lácteos. La cuantificación se realizó por la técnica de HPLC-DAD. El rango lineal del método se determinó mediante inyecciones por triplicado de seis

estándares de pterosina B, en un rango de concentraciones de 0,30 mg/L – 3,00 mg/L, y los resultados se evaluaron mediante una prueba estadística de Snedecor-Fischer. Para la determinación del límite de detección (LDD) y límite de cuantificación (LDC), se realizó la estimación de la curva de calibración a partir de la pendiente y residuos, y los resultados se compararon entre sí (Barwick., et al, 2016; Chairman et al., 2014).

La repetibilidad para la matriz de extracto acuoso, obtenido a partir del helechito, se realizó mediante un análisis de conversión de PTA a PTB y cuantificación en HPLC-DAD, al menos por sextuplicado. La repetibilidad en las muestras se evaluó a partir de una muestra que se contaminó a una concentración de 0,25 mg/kg y 0,43 mg/kg de PTA, para yogurt y leche, respectivamente. Cada una se extrajo por septuplicado, a todas se les realizó la conversión de PTA a PTB, se les determinó la desviación estándar relativa y se evaluaron según la relación de HorRat. Por otra parte, la recuperación se evaluó en tres niveles de concentración de PTA en la matriz: (0,23 – 0,43 – 0,77) mg/L para leche entera y (0,10 – 0,24 – 0,35) mg/L para yogurt, y los resultados se evaluaron según los criterios establecidos por la AOAC (AOAC, 2016).

Para evaluar el rendimiento de la conversión de PTA a PTB, se realizó un estudio de variación en las condiciones de reacción, para lo que se utilizó una matriz de Youden Steiner (Cuadro 1) (Youden et al., 1997) para 7 variables y 8 experimentos. Además, se utilizó un valor mayor y uno menor a los definidos por el método, con el fin de verificar la mayor sensibilidad. Por esta razón, se evaluó el volumen de extracto acuoso de PTA utilizado 4 mL y 1 mL, a 35 °C y 55 °C de incubación, por 30 min y 90 min de incubación, cantidad de NaOH y HCl de 300 µL y 75 µL, cantidad de diclorometano para extracción 2 mL y 4 mL y finalmente, volumen de reconstitución de metanol 1 mL y 3 mL. Cada uno de los 8 experimentos se realizó por duplicado (Duffau et al., 2010).

Cuadro 1. Matriz de Youden Steiner para análisis de robustez empleada en la conversión de PTA a PTB en el extracto acuso obtenido a partir de los helechos.

Condiciones de reacción (variables)	N° de experimento							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Volumen de extracto (mL)	4	4	4	4	1	1	1	1
Temperatura de reacción (°C)	55	55	35	35	55	55	35	35
Tiempo de reacción (min)	90	30	90	30	90	30	90	30
Cantidad de NaOH (µL)	300	300	75	75	75	75	300	300
Cantidad de HCl (µL)	300	75	300	75	75	300	75	300
Cantidad de diclorometano para extracción (mL)	4	2	2	4	4	2	2	4
Vol. de metanol para reconstitución (mL)	3	1	1	3	1	3	3	1

La matriz de Youden Steiner fue también empleada para determinar la robustez del método de extracción de PTA y cuantificación de PTB en las muestras de leche contaminadas en tres niveles de concentración (Cuadro 2). La evaluación se realizó para el nivel de menor y de mayor concentración de biotoxina adicionada a las leches, utilizando una temperatura de reacción de 55 °C y 30 °C, un tiempo de reacción de 90 min y 60 min, cantidad de NaOH y HCl de 300 µL y 75 µL, volumen de acetonitrilo de 4 mL y 2 mL y volumen de metanol para reconstitución de 1 mL y 3 mL.

Cuadro 2. Matriz de Youden Steiner para análisis de robustez empleada para la recuperación de PTB en el extracto de leche.

Condiciones de reacción (variables)	N° de experimento							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Concentración de PTA en leche (ng/mL)	750	750	750	750	250	250	250	250
Temperatura de reacción (°C)	55	55	35	35	55	55	35	35
Tiempo de reacción (min)	90	30	90	30	90	30	90	30
Cantidad de NaOH (µL)	300	300	75	75	75	75	300	300
Cantidad de HCl (µL)	300	75	300	75	75	300	75	300
Volumen de metanol y CH ₃ CN (mL)	4	2	2	4	4	2	2	4
Vol. de metanol para reconstitución (mL)	3	1	1	3	1	3	3	1

5.2.9. Análisis estadístico

El análisis de los datos como regresiones lineales y estadística descriptiva fue realizado en Excel 2016, Minitab 18 y JMP 8. Los datos fueron analizados mediante Prueba F de *Snedecor- Fisher* y análisis de varianza ANOVA, con un 95 % de confianza.

5.3.Resultados y discusión

La presencia de ptaquilósido (PTA) y pterosina B (PTB) en las muestras de extractos de frondas de helecho *Pteridium spp*, fue identificada mediante el espectro de masas (Figura 10 y Figura 11).

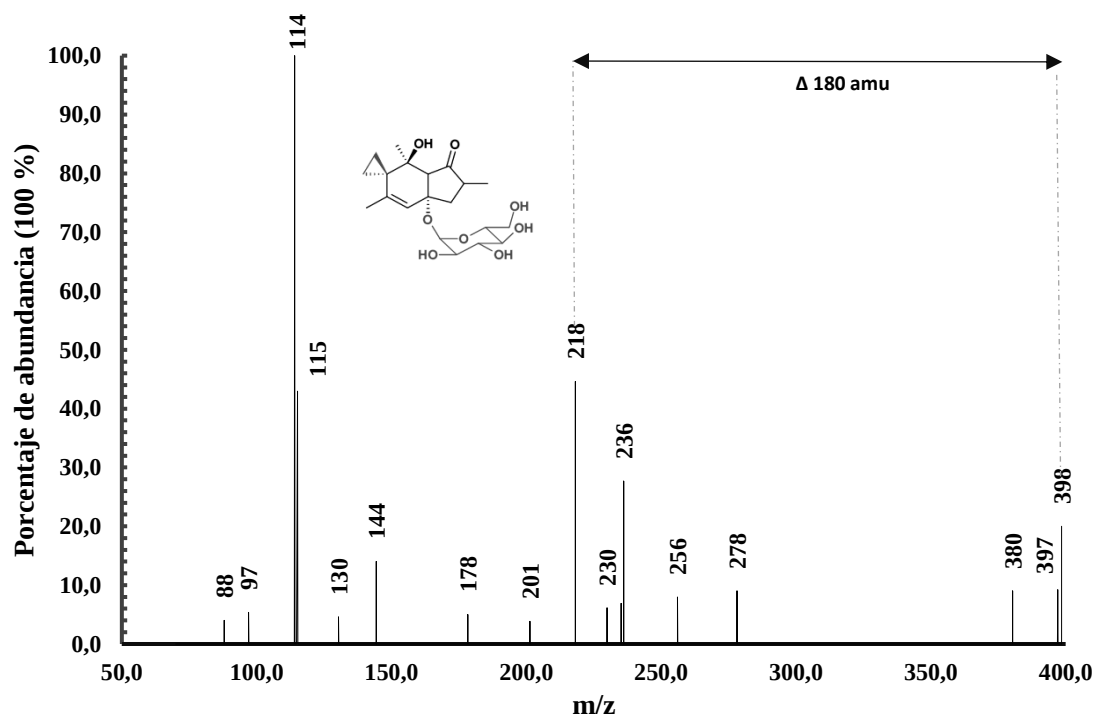


Figura 10. Identificación de la presencia de PTA en extractos de frondas de helecho *Pteridium spp* utilizando infusión directa por MS/MS.

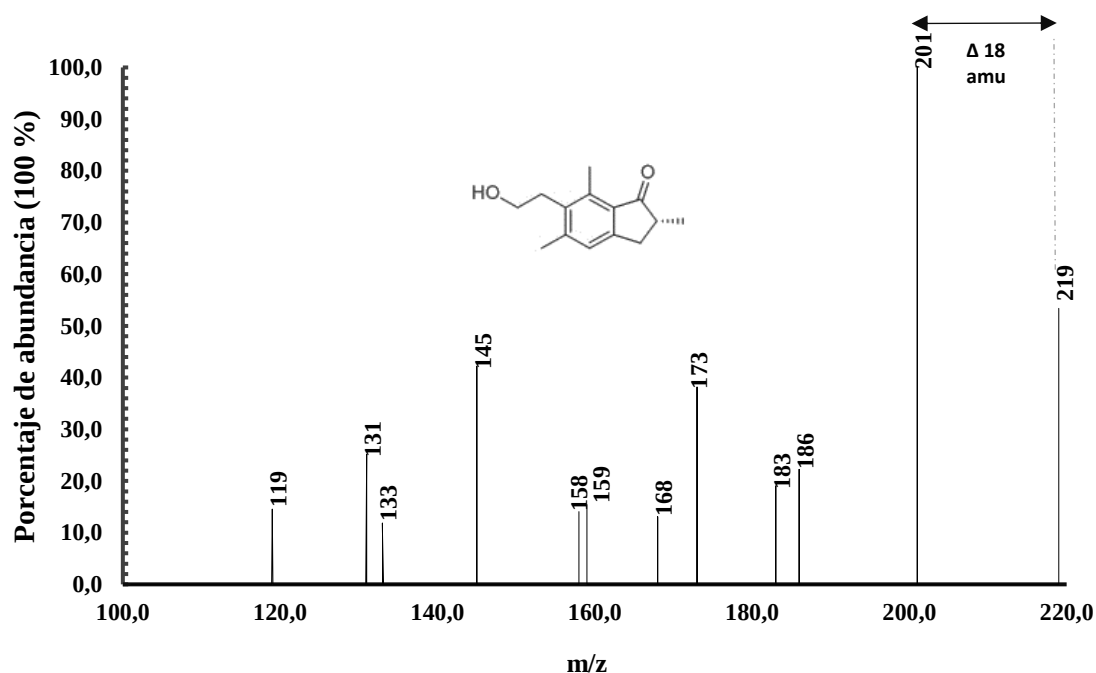


Figura 11. Identificación de la presencia de PTB en extractos de frondas de helecho *Pteridium spp* utilizando infusión directa por MS/MS.

La identificación de ptaquilósido se basó en la correspondiente pérdida de la glucosa -180 m/z, donde se identificaron los fragmentos con masa 398 m/z y 218 m/z $[M - \text{Glu}]^+$. Por otra parte, la identificación de pterosina B se basó en la identificación del pico 219 m/z $[M + H]^+$ y el fragmento ion dominante se observó a 201 m/z proveniente de la pérdida de $-\text{OH}$, lo que coincide con lo reportado en otros estudios (Jensen et al., 2008). Con una abundancia relativa de aproximadamente 40 % o mayor, ambos compuestos mostraron una adecuada ionización, lo cual permitió una buena identificación mediante espectrometría de masas. Es importante tomar en cuenta que cualquier diferencia o variación en la matriz puede suprimir o mejorar la señal y afectar la sensibilidad de detección y precisión (Nguyen et al., 2011; Aranha et al., 2014). A pesar de que el procedimiento de preparación de la muestra elimina una parte sustancial de los componentes de la matriz, la ionización de PTA y PTB todavía es influenciada por la matriz (Aranha et al., 2014).

La identificación anterior permitió asegurar que los metabolitos estaban presentes y no se degradaron por factores abióticos o enzimáticos en el helecho, por lo que las muestras podrían ser utilizadas para realizar pruebas de extracción y cuantificación, así como para la obtención de extractos concentrados de la biotoxina.

Los cromatogramas obtenidos para el estándar de PTB a 2 mg/L, el extracto obtenido a partir de las frondas de helecho 6,37 mg/L de una mezcla de *P. aquilinum caudatum var caudatum* y *P. esculentum var. arachnoideum*, la muestra de leche contaminada con PTA 0,42 mg/L y la muestra de yogurt azucarado contaminada con 0,35 mg/kg de PTA, son mostrados en la Figura 12. Se pudo observar que el PTA presenta su máxima absorción en la región ultravioleta a una longitud de onda de 260 nm, con un tiempo de retención de (7,8 - 8,3) min, y que no existen interferencias provenientes de la matriz ni del método de extracción y purificación. Se concluye que no existe efecto matriz que interfiera en la cuantificación de PTB mediante HPLC-DAD, a pesar de que se puede observar claramente que existe gran variedad de picos debido a la complejidad de las matrices evaluadas; por otro lado existe una adecuada especificidad del método.

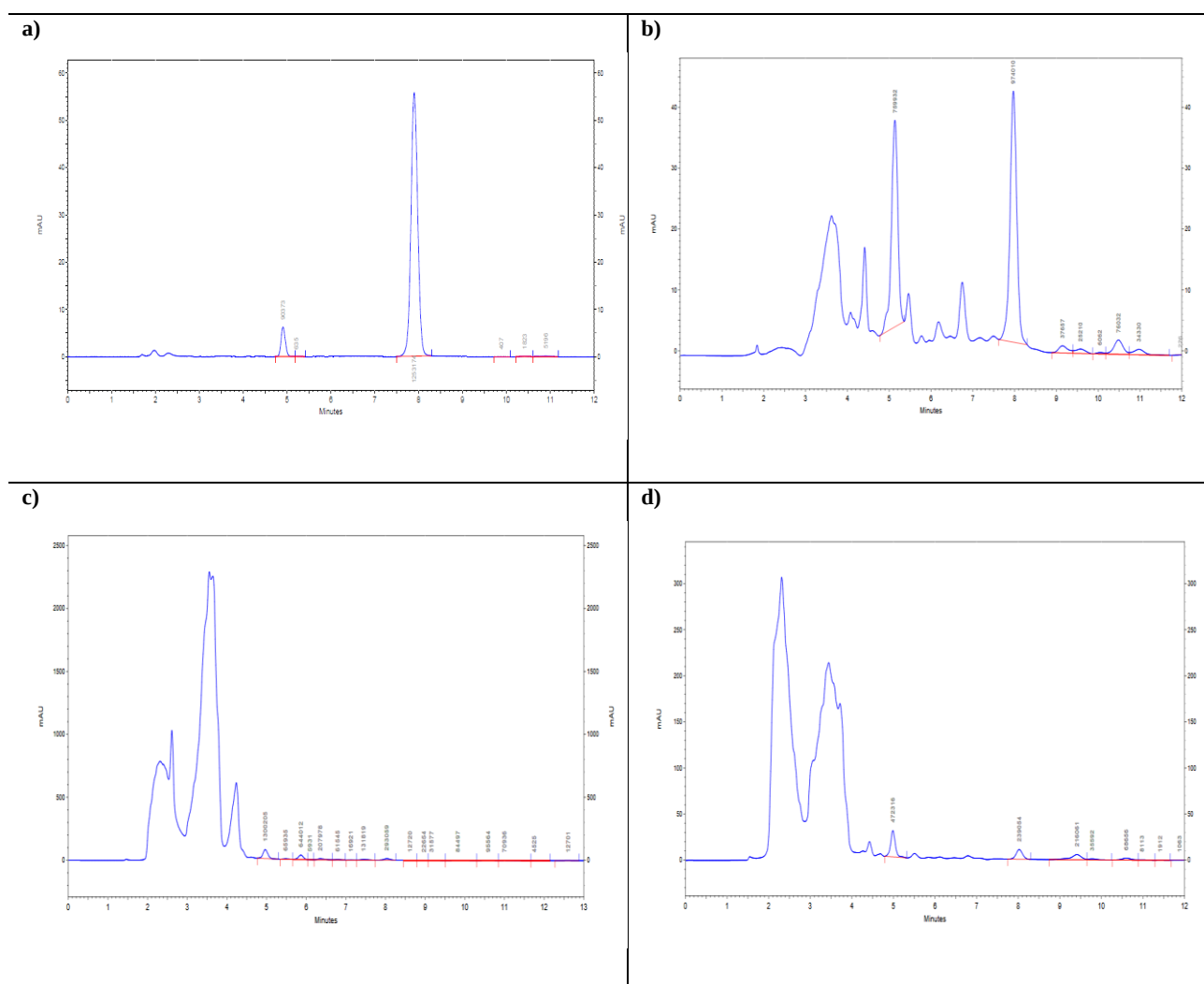


Figura 12. Cromatogramas de pterosina B por HPLC-DAD, 260 nm. a) Estándar de pterosina B 2 mg/L. b) extracto concentrado de mezcla de frondas 6,37 mg/L PTB provenientes de dos variedades de helecho *Pteridium* spp. (*P. aquilinum caudatum var caudatum* y *P. esculentum var. arachnoideum*). c) extracto de PTB 0,42 mg/L en matriz de leche entera. d) Extracto de PTB 0,35 mg/kg en matriz de yogurt azucarado.

A partir de los extractos evaluados durante la etapa de purificación (Figura 13) se observa que la cromatografía con resina poliamida permitió eliminar el PTB que se encontraba originalmente en la planta, así como otros compuestos interferentes como las clorofilas. Se determinó que la cantidad de PTA en este extracto fue de 0,73 mg/g y 0,83 mg/g para *P. aquilinum caudatum var caudatum* y *P. esculentum var. Arachnoideum*, respectivamente, lo que puede identificarse como pérdidas durante la cromatografía de columna. Por otro lado, es de esperar que los extractos eluidos con etanol en la resina amberlite®, fueran los más ricos en ptaquilósido, con resultados de 3,53 mg/g para *P. aquilinum caudatum var caudatum* y 4,69 mg/g para *P. esculentum var. arachnoideum*, y que el extracto eluido con agua pudiera eliminar otras interferencias como los azúcares. Es por esto por lo que las pérdidas de PTA en el extracto fueron mínimas, de 0,03 mg/g y 0,01 mg/g para *P. aquilinum caudatum var caudatum* y *P. esculentum var. Arachnoideum*, respectivamente. De esta forma, se pudo obtener un extracto concentrado en PTA al que se le pudo eliminar la biotoxina que estaba originalmente en forma de PTB, azúcares y clorofilas, entre otros.

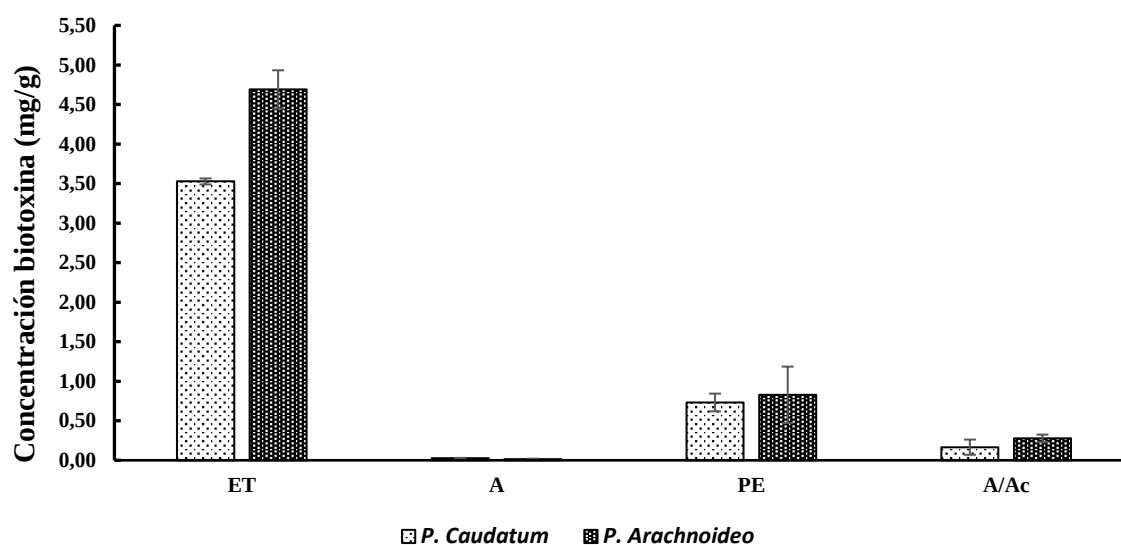


Figura 13. Fracciones obtenidas durante purificación de biotoxina PTB, utilizando cromatografía de columna con resina poliamida y resina amberlite® de dos variedades de helecho *P. aquilinum caudatum var caudatum* y *P. esculentum var. arachnoideum*. Donde: ET (Extracto etanólico por amberlite®), A (Extracto acuoso por amberlite®), PE (Extracto etanólico por poliamida) y A/Ac (Extracto extraído con agua/acetato de etilo sin columna).

A pesar de la buena solubilidad del PTA en agua y acetato de etilo, una mezcla de estos compuestos no resulta adecuada para obtener un extracto altamente concentrado en la biotoxina. Los extractos presentaron una concentración de 0,17 mg/g para *P. aquilinum caudatum var caudatum* y 0,28 mg/g y *P. esculentum var. Arachnoideum*, obteniéndose

rendimientos muy bajos. Por lo tanto, la extracción en agua y posterior purificación en poliamida y amberlite®, resulta ser una metodología adecuada para la obtención de un extracto concentrado de PTA, que permite realizar estudios como la estabilidad y prevalencia en muestras lácteas.

Los resultados de repetibilidad del método, el límite de detección (LDD), el límite de cuantificación (LDC), ámbito de trabajo, linealidad, recuperación y robustez, evaluados para la matriz de helecho y de productos lácteos (leche y yogurt), se muestran en la Cuadro 3. Para la evaluación de la repetibilidad se estableció el valor de HorRat, que se determina por la relación de la desviación estándar relativa (RSD) calculada a partir de los datos del laboratorio y el RSD predicho a partir de la ecuación de Horwitz, según la cual, bajo condiciones de repetibilidad, los valores aceptados deben estar entre 0,3 y 1,3 (Association of Official Analytical Chemists, 2016). Por lo tanto, los resultados indicados en la Cuadro 3, mostraron buena repetibilidad para todas las matrices evaluadas.

Cuadro 3. Resumen de resultados de validación del método de cuantificación y extracción de PTA en forma de PTB para matriz de helecho y matrices lácteas.

Parámetro	Resultado obtenido	Criterio de aceptación
Repetibilidad	HELECHO VARIEDAD 1. Horrat _r = 0,316; (n = 6)	0,3 > Horrat _r > 1,3 (AOAC)
	HELECHO VARIEDAD 2. Horrat _r = 0,904; (n = 6)	
	LECHE: Horrat _r = 0,476; (n = 7) YOGURT: Horrat _r = 0,723; (n = 7)	
LDD	LDD = 0,03 mg/L	No aplica
LDC	LDC = 0,09 mg/L	No aplica
Ámbito de trabajo	(0,09 - 3,00) mg/L	$F < F_{crit}$ (Prueba F de Snedecor- Fisher)
Linealidad	$R^2 = 0,9999$	($R^2 \geq 0,995$) $F > F_{crit}$ (Análisis de varianza)
Recuperación	LECHE	(60 – 115) % (AOAC)
	Nivel 1. 0,23 mg/L; (91 ± 9) %	
	Nivel 2. 0,43 mg/L; (102 ± 9) %	
	Nivel 3. 0,77 mg/L; (91 ± 14) %	
	YOGURT	
	Nivel 1. 0,10 mg/kg; (61 ± 9) %	
	Nivel 2. 0,24 mg/kg; (80 ± 12) %	
	Nivel 3. 0,35 mg/kg; (75 ± 4) %	
Robustez	HELECHOS: VARIABLE SENSIBLE volumen de dilución (ml), temperatura de reacción (°C), volumen de extracciones CH ₂ Cl ₂ (mL), volumen de MeOH (mL) de reconstitución.	$\Delta < \sqrt{2} \cdot DS = NO$ SENSIBLE (matriz de Youden Steiner) DS= desviación estándar de la repetibilidad del método = DS = 1,04 (Lácteos) $\sqrt{2} \cdot DS = 1,47$ DS = 0,04 (Helechos) $\sqrt{2} \cdot DS = 0,06$
	LÁCTEOS: VARIABLE SENSIBLE temperatura de reacción (°C), cantidad NaOH (µg), cantidad HCl (µg), volumen de extracción de MeOH y CH ₃ CN (mL), volumen de reconstitución de MeOH (ml).	

LDD: Límite de detección

LDC: Límite de cuantificación

La linealidad se evaluó mediante una curva de calibración. Se estimó que el coeficiente de regresión (R^2) fue superior a 0,99, mostrando una excelente linealidad. De manera simultánea, se determinó el ámbito de trabajo, que correspondió a un rango de concentración (0,11 - 3,00) mg/L. Éste se estimó a partir del límite de cuantificación (0,11 mg/L) y el estándar de mayor concentración (3,00 mg/L) y se realizó una prueba estadística (prueba Snedecor F) para comparar los valores obtenidos, la cual determinó que el ámbito de trabajo estaba bien ajustado. El LDD y el LDC se estimaron gráficamente de acuerdo con la Guía de Validación Eurochem (Chairman et al., 2014), y se estimó un promedio de diez curvas de calibración realizadas en un rango de (0,025 –

3,000) mg/L. Tanto el límite de cuantificación como el límite de detección fueron aceptables para el rango de concentraciones a evaluar.

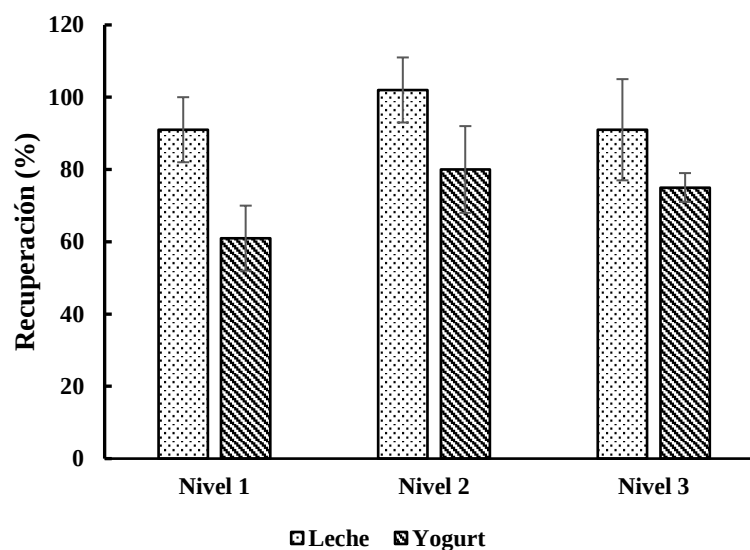


Figura 14. Recuperación de ptaquilósido a una concentración de (0,23; 0,43; 0,77) mg/L en leche entera y (0,10; 0,24; 0,35) mg/kg en yogurt azucarado.

Como se muestra en la Figura 14, la recuperación se realizó para las muestras lácteas de leche y yogurt de acuerdo con adición estándar a tres concentraciones diferentes de ptaquilósido: (0,23; 0,43; 0,77) mg/L para leche entera y (0,10; 0,24; 0,35) mg/L para yogurt, que correspondieron a valores de recuperación de (91; 102; 91) % y (61; 80; 75) %, respectivamente, según las cantidades declaradas. Las recuperaciones promedio de todas las muestras y niveles analizados se ubicaron entre los criterios mínimos y máximos establecidos por AOAC (60 - 115) % (AOAC, 2016). El experimento de recuperación demuestra que el método es lo suficientemente preciso y que no hay interacción significativa entre los analitos y las matrices evaluadas, obteniéndose recuperaciones dentro del rango de aceptación evaluado por la AOAC.

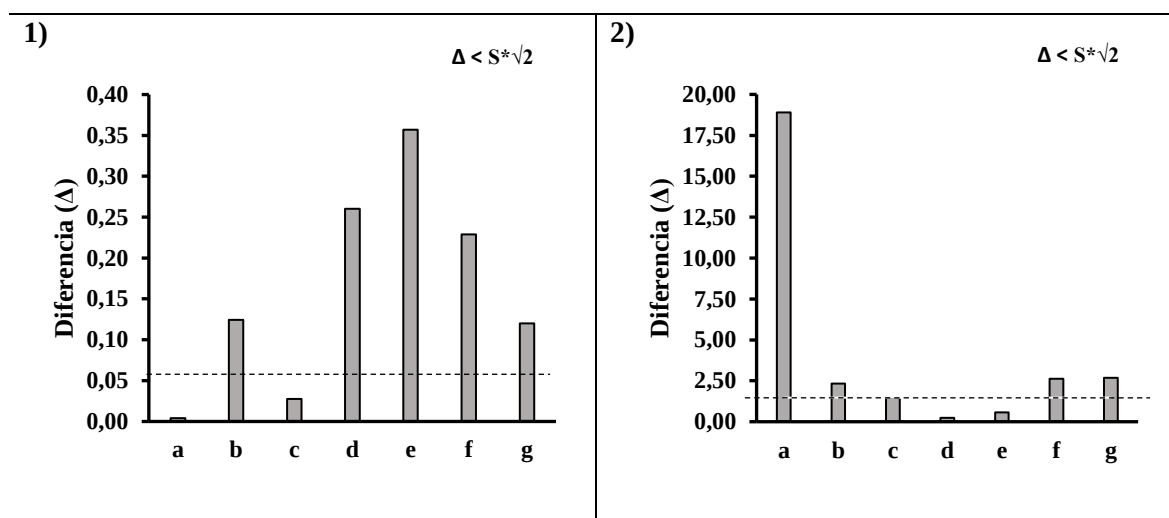


Figura 15. Análisis de robustez para la extracción y conversión de PTA a PTB en muestras lácteas y helechos, aplicando la matriz de Youden Steiner. Para el gráfico 1) Lácteos: a) Concentración de PTA (mg/L), b) Temperatura de reacción (°C), c) Tiempo de reacción (min), d) Cantidad de NaOH (μL), e) Cantidad de HCl (μL), f) Volumen de MeOH y de CH₃CN (mL), g) Volumen de reconstitución con MeOH. Para el gráfico 2) Helechos: a) Volumen de extracto (mL), b) Temperatura de reacción (°C), c) Tiempo de reacción (min), d) Cantidad de NaOH (μL), e) Cantidad de HCl (μL), f) Volumen de extracciones CH₂Cl₂ (mL), g) Volumen de reconstitución con MeOH. Donde: Δ es la diferencia entre el parámetro mayor y el menor, $S \cdot \sqrt{2}$, S = desviación estándar de la precisión del método.

Los datos de robustez se obtuvieron al aplicar la matriz de Youden-Steiner (Youden et al., 1997). Cada uno de los parámetros se evaluó con valores más altos y bajos que los valores establecidos para el método, debido a que los parámetros no son sensibles cuando el producto ($S \cdot \sqrt{2}$) es mayor o igual a la diferencia entre los parámetros alto y bajo de cada variable evaluada, donde “S” es la desviación estándar de la precisión del método, la cual corresponde a 1,04 mg/kg para los helechos y 0,04 mg/kg para matriz láctea.

Los resultados se muestran en la Figura 15. En el caso de los helechos, las variables sensibles identificadas fueron el volumen de dilución de extracto, la temperatura de reacción, el volumen de extracción con diclorometano luego de la conversión de PTA a PTB y el volumen de metanol para reconstitución; en el caso de los lácteos, las variables sensibles fueron similares, con excepción de que en los lácteos los parámetros para realizar la conversión de PTA a PTB fueron más sensibles. En consecuencia, cambios leves en las variables pueden significar una disminución del rendimiento de la reacción, lo que implicaría errores en la cuantificación, por lo que la temperatura de reacción, la cantidad de NaOH y HCl fueron sensibles en este caso.

Adicionalmente, en los lácteos el volumen de reactivos para la precipitación de proteínas y el volumen de metanol para la reconstitución también fueron parámetros sensibles, lo que concuerda con lo esperado. Este último parámetro, tanto en lácteos como

en helechos, puede afectar la concentración final que se determina mediante la cuantificación por HPLC-DAD, ya que pequeñas variaciones pueden dar altas o pequeñas concentraciones de PTB.

La importancia de determinar la robustez del método, principalmente durante la reacción, permite establecer las condiciones óptimas para que la reacción sea lo más completa posible. Adicionar cantidades mayores o menores de NaOH y HCl, otorgar tiempos de reacción cortos o largos, así como temperatura de reacción baja o alta pueden evitar que la reacción sea de alto rendimiento. Se ha demostrado que el ptaquilósido se descompone rápidamente a valores de pH inferiores a 4, por lo que, si el pH no es lo suficientemente ácido o se encuentra neutro, la reacción de PTA a PTB no se daría; lo mismo sucedería si el medio no se encuentra lo suficientemente alcalino (Rasmussen et al., 2015). Asimismo, aumentar la temperatura puede acelerar la reacción de hidrólisis de la molécula de PTA bajo estas condiciones, lo que disminuye la vida media del compuesto y favorece que se dé la conversión a pterosina B.

Para evitar estas variaciones, tanto en helechos como en lácteos, los parámetros identificados como sensibles fueron controlados utilizando pipetas calibradas para la adición de volúmenes y monitoreando las temperaturas y tiempos de reacción exactas (Ayala et al., 2006). Los resultados muestran que el método de extracción optimizado en este estudio es robusto para la mayoría de los parámetros evaluados, es válido y puede emplearse para la cuantificación de ptaquilósido en muestras de helechos y leche, siempre y cuando se controlen las variables sensibles para evitar variaciones.

Todos los resultados de validación muestran que el método es apropiado para la determinación del contenido de ptaquilósido en muestras de helecho y en muestras lácteas, mediante cuantificación y usando RP-HPLC-DAD. Esto permite dar validez a los resultados y generar importantes aportes a estudios de toxicología del PTA en muestras de helechos y lácteos. Además, el bajo LDC del método permitirá realizar estudios completos sobre la absorción, distribución y excreción de PTA en muestras de leche bovina.

5.4.Conclusiones

La obtención de un extracto concentrado de PTA a partir de *Pteridium*, con una concentración de hasta 4,69 mg/g, fue posible mediante la purificación de un extracto

acuoso del helecho por cromatografía de columna con resinas de poliamida y amberlite®. El método de extracción, purificación y cuantificación resulta adecuado para la determinación del contenido de la biotoxina en el helecho y, adicionalmente, en leche y subproductos lácteos, como yogurt, que podrían estar contaminados, incluso a concentraciones de 0,09 mg/L. La conversión de la biotoxina PTA a PTB representó una metodología adecuada, no sólo porque se obtuvo una buena respuesta cromatográfica, sino porque presentó una mayor seguridad al manipular muestras que contienen un compuesto carcinogénico. Igualmente, la metodología presentó una buena linealidad, repetibilidad, recuperación y robustez, garantizando la validez de los resultados.

La identificación por MS/MS y cuantificación por HPLC-DAD permitieron determinar la presencia de PTA y PTB en las variedades de *P. aquilinum caudatum* var *caudatum* y *P. esculentum* var. *Arachnoideum*

5.5. Agradecimientos

Se reconoce el financiamiento y soporte dado por parte de la Estación Experimental de Ganado Alfredo Volio Mata, el Centro Nacional de Alta Tecnología (CeNAT) y el Centro Nacional de Innovaciones biotecnológicas (CENIBiot) de Costa Rica.

5.6. Referencias

- Alonso-Amelot, M.E., Castillo, U., Smith, B.L., Lauren, D.R. (1998). Excretion, through milk, of ptaquiloside in bracken-fed cows. *A quantitative assessment. Lait*, 78 (4), 413–23.
- Aranha, P. C. R., Hansen, H. C. B., Rasmussen, L. H., Strobel, B. W., & Friis, C. (2014). Determination of ptaquiloside and pterodin B derived from bracken (*Pteridium aquilinum*) in cattle plasma, urine and milk. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 951–952 (1), 44–51.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (2016). Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements, 1-18.

- Ayala-Luis, K. B., Hansen, H. C. B., Rasmussen, L. H., Hansen, H. C. B. (2006). Kinetics of ptaquiloside hydrolysis in aqueous solution. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25, 2623–2629.
- Barwick, V., Morillas Bravo, P., Ellison, S., Engman, J., Gjengedal, E., & Oxenbøll Lund, U. (2016). La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos: Una Guía de Laboratorio para Validación de Métodos y Temas Relacionados. España: Guía Eurachem.
- Bonadies F., Berardi G., Nicoletti R., Romolo F.S., de Giovanni F., Marabelli R., Santoro A., Raso C., Tagarelli A., Roperto F., Russo V. & Roperto, S. (2011). A new, very sensitive method of assessment of ptaquiloside, the major bracken carcinogen in the milk of farm animals. *Food Chemistry*, 124, 660-665.
- Calderón, A., Sánchez, L.M., Mancebo, B., Marrero, E., Chiriboga, X., Silva, J. (2014). Residualidad del ptaquilósido en la leche procedente de granjas bovinas en tres cantones de la provincia Bolívar, Ecuador. *Revista Salud Animal*, 36 (1), 19–27.
- Chairman, W., et al. (2014). Eurachem Guide: Quantifying uncertainty in analytical measurements. (3), 4-126.
- Clauson-kaas, F., Christian, H., Hansen, B., & Strobel, B. W. (2016). UPLC-MS/MS determination of ptaquiloside and pterostatin B in preserved natural water. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 7981–7990.
- Duffau, B., Rojas, F., Guerrero, I., Roa, L., Rodríguez, L., Soto, M., Sandoval, S. (2010). Validación de métodos y determinación de incertidumbre de la medición: Aspectos generales sobre la validación de métodos. Santiago, Chile: Instituto de Salud Pública de Chile.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) y Federación Internacional de la Leche (FIL). (2012). Guía de buenas prácticas en explotaciones lecheras. Directrices FAO: Producción y Sanidad Animal No. 8, Roma.
- Fletcher, M.T., Reichmann, K.G., Brock, I.J., McKenzie, R.A., Blaney, B.J. (2011). Residue potential of norsesquiterpene glycosides in tissues of cattle fed Austral

- bracken (*Pteridium esculentum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 (15), 8518-8523.
- Gomes, J., Magalhaes, A., Amado, F., Aranha, P., Ovesen, R. G., & Hansen, H. C. B. (2012). *Pteridium aquilinum* and Its Ptaquiloside Toxin Induce DNA Damage Response in Gastric Epithelial Cells, a Link with Gastric Carcinogenesis. *Toxicological Sciences*, 126 (1), 60–71.
- Jensen, P.H., Jacobsen, O.S., Hansen, H.C., & Juhler, R.K. (2008). Quantification of Ptaquiloside and Pterosin B in Soil and Groundwater Using Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry (LC - MS/MS). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 9848–9854.
- Nguyen, H.P., Li, L., Nethrapalli, I.S., Guo, N., Toran-Allerand, C.D., Harrison, D.E., Astle, C.M., Schug, K.A. (2011). Evaluation of matrix effects in analysis of estrogen using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, 34, 1781-1787.
- Rasmussen, L.H., Kroghsbo, S., Frisvad, J.C., Hansen, H.C.B. (2003). Occurrence of the carcinogenic Bracken constituent ptaquiloside in fronds, topsoils and organic soil layers in Denmark. *Chemosphere*, 51 (2), 117–27.
- Rasmussen, L.H., Hansen, H.C.B., Lauren, D. (2005). Sorption, degradation and mobility of ptaquiloside, a carcinogenic Bracken (*Pteridium spp.*) constituent, in the soil environment. *Chemosphere*, 58, 823-835.
- Rodriguez-Aller, M., Gurny, R., Veuthey, J.L., Guilleme, D. (2013). Coupling ultra-high-pressure liquid chromatography with mass spectrometry: constraints and possible applications. *Journal of Chromatography A*, 1292, 2–18.
- Sánchez, A. J., & Secaira, G. (2014). Risk by Human Health for Invasion of *Pteridium arachnoideum*, in Bolívar, Ecuador Ptaquiloside's Content in Fronds and in Milk. *International Journal of Applied Science and Technology*, 4 (6), 84–94.
- Virgilio, A., Sinisi, A., Russo, V., Salvatore, G., Santoro, A., Galeone, A., et al. (2015). Ptaquiloside, the major carcinogen of bracken fern, in the pooled raw milk of healthy sheep and goats: an underestimated, global concern of food safety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63 (15), 4886–92.

- Wren, S.A., Tchelitcheff, P. (2006). Use of ultra-performance liquid chromatography in pharmaceutical development. *Journal of Chromatography A*. 1119 (1), 140–6.
- Youden, W.J., Steiner, E.H. (1997). Statistical Manual of the Association of Official Analytical Chemists. *AOAC International*. Maryland USA. 8.
- Zumbado-Gutiérrez, L., & Romero-Zuñiga, J. (2015). Conceptos sobre inocuidad en la producción primaria de la leche. *Revista Ciencias Veterinarias*, (33), 51-66.

CAPÍTULO 6: CARACTERIZACIÓN DEL CONTENIDO DE LA BIOTOXINA (PTAQUILÓSIDO Y PTEROSINA B) EN DOS VARIEDADES DE HELECHO (*P. AQUILINUM CAUDATUM* VAR *CAUDATUM* Y *P. ESCULENTUM* VAR. *ARACHNOIDEUM*) Y ESTIMACIÓN DE LA EXCRECIÓN EN MUESTRAS DE LECHE BOVINA COSTARRICENSE

RESUMEN: Ptaquilósido (PTA) es un norsesquiterpeno glucosidado que se encuentra en abundantes cantidades en el helecho (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn), al cual se le han atribuido efectos carcinogénicos por su contenido de la biotoxina PTA. Debido al mayor riesgo de cáncer de esófago y gástrico en humanos que residen en áreas ricas en helechos y a la contaminación por PTA, la necesidad de evitar la distribución de la biotoxina en la cadena alimentaria se ha convertido en un tema crucial en las investigaciones de seguridad alimentaria. El presente estudio determina el contenido de biotoxina en helechos de dos de las variedades del helecho más abundantes en la región de América Latina: *P. aquilinum caudatum* var *caudatum* y *P. esculentum* var. *arachnoideum*. Se determinó el contenido en diferentes partes de la planta (frondas, raquis y tallos) y tres estados fenológicos de helechos provenientes de distintas zonas de Costa Rica, para lo que se utilizó cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) con detector de arreglo de diodos (DAD). Se encontraron cantidades de PTA de (21-120) mg/kg, y se concluyó que los raquis poseen mayor cantidad de PTA; igualmente, la especie *P. arachnoideo* contiene una mayor cantidad en comparación con la especie *P. caudatum*. El contenido de PTA en diferentes estados fenológicos para la especie *P. aquilinum caudatum* var. *caudatum*, concluyó que los helechos más jóvenes poseen hasta un 50 % más de PTA en comparación con los helechos de mayor desarrollo. Paralelamente, se determinó la presencia de PTA mediante HPLC-MS en leche bovina costarricense proveniente de tres fincas ubicadas en la zona de Coto Brus y en el cantón de Zarcero; de acuerdo con los resultados, se encontró una concentración de (4 ± 1) µg/L PTA en una de las fincas de Coto Brus y (10 ± 1) µg/L PTA en la finca de Zarcero, mientras que en la otra finca de Coto Brus no se detectó. El estudio muestra, en general, que el PTA se ha detectado en cantidades pequeñas en leche bovina proveniente de dos fincas costarricenses. Palabras clave: *P. aquilinum*, frondas, fenológicos, leche, HPLC.

6.1.Introducción

La composición química de las plantas es muy compleja y variable. Muchos de sus compuestos corresponden a sustancias naturales que forman parte de la interacción química con otras especies (Rasmussen et al., 2005) y que pueden ser tóxicas para los animales, el ser humano o ambos (Panter et al., 2007). Tal es el caso del helecho (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn), una de las especies de plantas más comunes en la Tierra, que posee una extensa variabilidad. La taxonomía del helecho incluye dos subespecies (*P. aquilinum aquilinum* y *P. aquilinum caudatum*) y variedades: ocho variedades para la subespecie *P. aquilinum aquilinum* (var. *Aquilinum*, var *revolutum*,

var. pubescens, *var. feei*, *var. Descompositum*, *var. latiusculum*, *var. pseudocaudatum*, y *var. africanum*) y cuatro para la subespecie *P. aquilinum caudatum* (*var. esculentum*, *var. caudatum*, *var. arachnoideum* y *var. varrabense*) (Gil da Costa et al., 2012).

Pteridium spp también ha tomado gran importancia alrededor del mundo por las intoxicaciones que produce en varias regiones ganaderas del orbe, en particular las ocasionadas por su potencial carcinogénico, tanto en animales como en el ser humano (Villalobos-Salazar et al., 2000; Vetter et al., 2009; Fletcher et al., 2011; Gomes et al., 2012). Este efecto carcinogénico se ha atribuido principalmente al alto contenido de la biotoxina ptaquilósido (PTA) (Figura 16a), glucósido de norsesquiterpeno, que comprende una estructura de iludano, con un grupo hidroxilo terciario alílico unido a la d-(+)-glucosa (Aranha et al., 2014; Gomes et al., 2012).

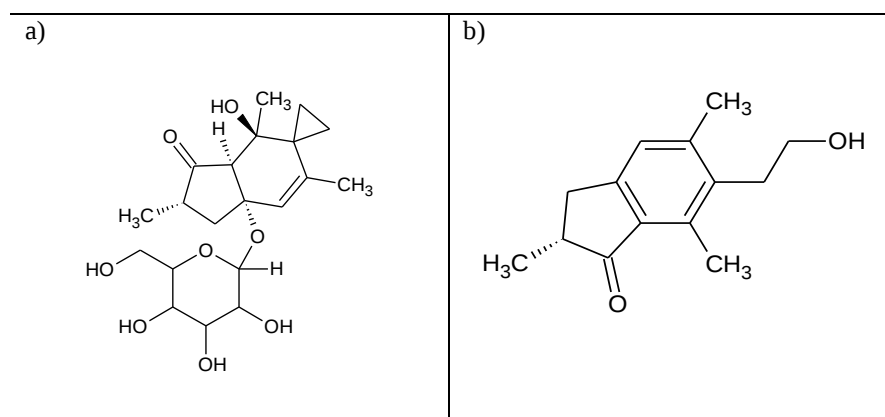


Figura 16. Estructura molecular. a) Ptaquilósido (PTA), b) Pterosina B (PTB).

Desde los primeros hallazgos de la carcinogenicidad del helecho, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) clasificó el helecho *Pteridium spp* como cancerígeno en animales y posiblemente cancerígeno en humanos (grupo 2B) y consideró que el ptaquilósido no era clasificable en cuanto a su carcinogenicidad (grupo 3) (IARC., 1986). Sin embargo, un tiempo después, el gobierno Holandés declaró que el ptaquilósido debía considerarse como un carcinógeno humano (DECOS, 1995), lo que ha promovido diversas investigaciones en relación con la biotoxina y su entorno.

Varios estudios han encontrado una relación importante entre el riesgo de padecer cáncer gástrico y la exposición al helecho, más frecuentemente en las áreas de baja altitud; además, demuestran una importante correlación con la incidencia de hematuria enzoótica bovina (Villalobos-Salazar et al., 1989; Alonso-Amelot et al., 2001).

El contenido de PTA en la planta puede variar de manera significativa. Diversos estudios concuerdan en que la cantidad máxima de la biotoxina se encuentra en los helechos más jóvenes (Panter et al., 2007), y que se producen grandes variaciones en la concentración de PTA, a lo largo del año, entre cepas de helecho e, incluso, entre diferentes rodales de helecho ubicados uno cerca del otro (Gil da Costa et al., 2012). Aunado a esto, el contenido de PTA puede variar durante el crecimiento y desarrollo del helecho, como lo determinó un estudio realizado en Colombia, en el cual los estados fenológicos más tempranos tendieron a presentar un contenido mayor de la biotoxina (Rincón et al., 2016). En general, el PTA se ha encontrado en todas las partes del helecho (Rasmussen et al., 2013) en concentraciones de hasta 37 mg/g (Engel et al., 2007; Calderón et al., 2014). Sin embargo, estas podrían variar por diversos factores que intervengan durante el desarrollo de la planta, como el ambiente y lugar de crecimiento.

Los alimentos de origen animal aportan gran cantidad de nutrientes al ser humano, lo que aumenta la demanda y, a la vez, aumenta la necesidad de asumir un mayor control en la inocuidad de estos. En cuanto al cuidado de los animales, es indispensable evitar el contacto con sustancias nocivas para su salud y, consecuentemente, para la salud humana (Marrero et al., 2012; Zumbado-Gutiérrez et al., 2015). La leche es un alimento con un alto control en cuanto a su inocuidad microbiológica; sin embargo, no existe tanto control con respecto a la contaminación de toxinas como el PTA. Incluso se sabe que el 9 % del contenido de PTA en las frondas que comen las vacas se excreta en la leche y que depende de la cantidad consumida (Alonso-Amelot et al., 1998; Gil da Costa et al., 2012).

A pesar de la alta inclinación del helecho por regiones dedicadas a la ganadería, en Costa Rica no se conoce si la leche producida en las zonas cercanas a la presencia del helecho podría estar contaminada con la biotoxina, debido a que no aún no se han realizado estudios de esta índole. No obstante, existe información con respecto a la distribución geográfica del helecho, a la incidencia de cáncer gástrico en humanos y a la incidencia de hematuria en el ganado bovino, que requiere mayores estudios de actualización (Villalobos-Salazar., 1987; Villalobos-Salazar et al., 1989; Sánchez et al., 2014).

A pesar de los importantes hallazgos, aún no existe información que permita entender mejor la alta afección de esta toxina en Costa Rica; sin embargo, aclaraciones como las realizadas por IARC, con respecto a la alta prioridad de realizar investigaciones en torno al *Pteridium aquilinum* por la carcinogenicidad de su biotoxina, aumentan la relevancia del tema, tanto para el desarrollo agropecuario, como para la salud pública del

país y el mundo (Bonadies et al., 2011; Virgilio et al., 2015). El presente estudio determina el contenido de biotoxina de dos de las variedades más abundantes en la región de América Latina, *P. aquilinum caudatum* var. *caudatum* y *P. esculentum* var. *arachnoideum*, en diferentes partes de la planta (frondas, raquis y tallos) y tres de los estados fenológicos del helecho (II-rebrote, III-joven, IV-adulto) para la variedad *P. aquilinum caudatum* var. *caudatum* (Figura 17).

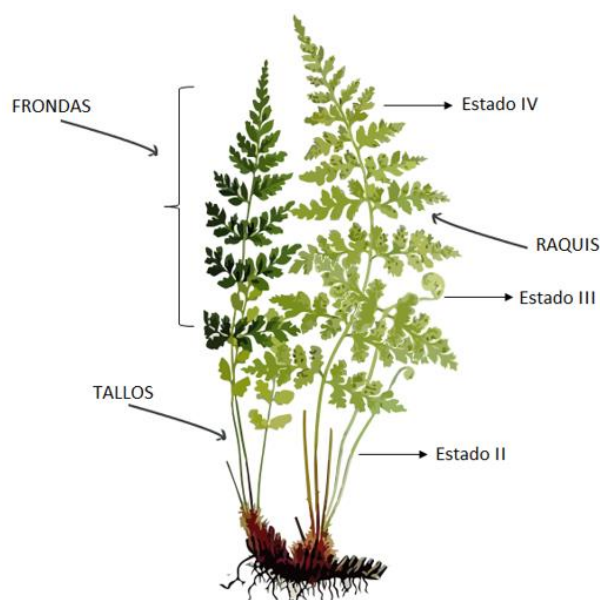


Figura 17. Composición fisiológica (frondas, raquis y tallos) y estados fenológicos (II-rebrote, III-joven, IV-adulto) del helecho *Pteridium*.

Debido al mayor riesgo de cáncer de esófago y gástrico en humanos que residen en áreas ricas en helechos y que se encuentran expuestos a alimentos contaminados por PTA, la necesidad de evitar la distribución de la biotoxina en la cadena alimentaria se ha convertido en un tema crucial en las investigaciones de seguridad alimentaria (Bonadies et al., 2011). Paralelamente, se realizó un estudio preliminar a la leche proveniente de fincas costarricenses para determinar la posible contaminación en leche de ganado bovino que podría haber ingerido helecho. Esto con el fin de realizar mayores investigaciones que contribuyan a ampliar el panorama y nivel de la problemática en el país, para enfocar los esfuerzos en disminuir y erradicar los riesgos eminentes generados por la exposición de la biotoxina.

6.2. Materiales y métodos

6.2.1. Reactivos químicos y materiales

Metanol grado HPLC, etanol absoluto grado ACS y ácido clorhídrico grado analítico adquiridos de Sigma–Aldrich® (Milwaukee, WI, U.S.A). Hidróxido de sodio pellets y Acetonitrilo Lichrosolv® fueron adquiridos de Merck (Darmstadt, Alemania). Diclorometano grado ACS fue obtenido de J.T. Baker® (U.S.A). Agua desionizada, obtenida a partir de un sistema de purificación MilliQ Plus (Miliford, MA, U.S.A). Ácido orto-fosfórico 85 % (H_3PO_4) obtenido de Fermont® (U.S.A). Estándar pterosina B 98 % que fue adquirido de Aobious (U.S.A, Gloucester).

6.2.2. Recolección y preparación de las muestras

Las muestras de helecho *Pteridium spp* correspondieron a dos subespecies de gran expansión, *P. aquilinum caudatum* var. *caudatum* y *P. esculentum* var. *arachnoideum* (Figura 18). El muestreo se llevó a cabo en dos zonas distintas de Costa Rica (Figura 19), el primero fue realizado en agosto – 2018, en el Cerro de la Muerte, ubicado en un macizo de 3491 metros de altitud que forma parte de la Cordillera de Talamanca, en el eje montañoso central de Costa Rica de las provincias de Cartago y San José, (9°34'00"N 83°45'00"O), y correspondió a las dos especies tanto de helechos tiernos como maduros, las cuales fueron muestreadas aleatoriamente.

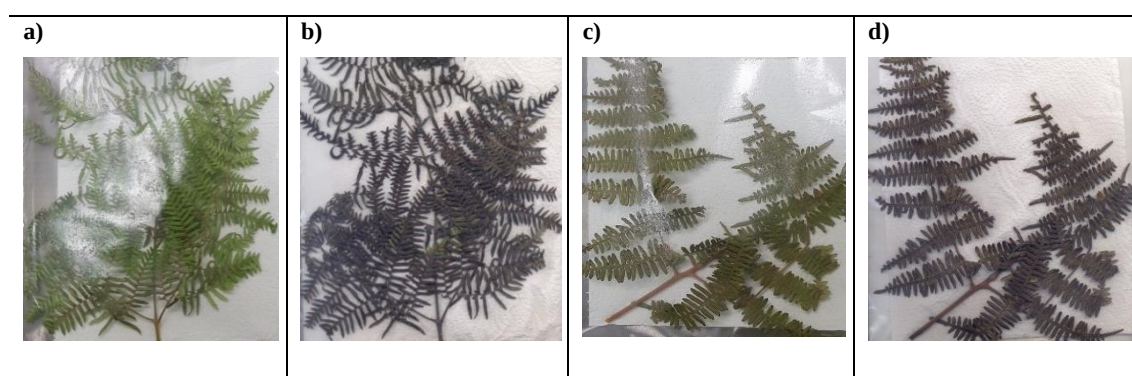


Figura 18. Helecho *P. aquilinum caudatum* var. *Caudatum*: a) estado fresco, b) estado seco. Helecho *P. esculentum* var. *arachnoideum*: c) estado fresco, d) estado seco.

El segundo muestreo correspondió únicamente a la especie *P. aquilinum caudatum* var. *caudatum*, que se muestreó en sus tres estados fenológicos más importantes en enero – 2019, en la cantón de Coto Brus, Puntarenas, Costa Rica (8°53'41"N 82°54'58"O) (Figura 20).



Figura 19. Helecho *Pteridium caudatum* en diferentes estados fenológicos: a) IV- Adulto, b) III- joven y c) II- rebrote, provenientes del cantón de Coto Brus, Puntarenas, Costa Rica.

Para ambos muestreos, los helechos se cortaron desde la raíz, se almacenaron en bolsas o sacos a temperatura ambiente y protegidos de la luz. En menos de 48 h se prepararon para el proceso de liofilización y en las muestras correspondientes al primer muestreo se separaron para cada variedad las frondas, raquis y tallos, y se liofilizaron por separado. Una vez liofilizados, se molieron hasta obtener un polvo fino y se almacenaron en un lugar oscuro y fresco a una temperatura de 10 °C, en bolsas o frascos protegidos de la humedad, el calor y la luz.

Las muestras de leche fueron recolectadas en tres fincas distintas, entre los meses de enero-junio de 2019. Se recolectaron en las zonas de La Brisa, Zarcero, Alajuela, Costa Rica, en Cañas Gordas, Agua Buena, Coto Brus, Puntarenas, Costa Rica y en Valle Hermoso, Sabalito, Coto Brus, Puntarenas, Costa Rica. Las fincas de la zona de Coto Brus correspondieron a fincas con poco ganado, la finca de Cañas Gordas cuenta con ganado multirracial con predominancia de cruces de raza Holstein, Jersey y Simbrah, se cuenta con 4 animales en ordeño, con un promedio de producción de leche de (9 -10) L diarios por animal, mientras que la finca de valle hermoso cuenta con 8 vacas en ordeño con alto patrón multirracial, cuya producción promedio de leche ronda los (10 - 12) L diarios por animal, los animales se alimentan con *Brachiaria brizantha* en pastoreo y se

suplementan con alimento balanceado y harina de coquito. Las muestras de leche correspondieron a muestras compuestas del total de leche recolectado diariamente. Para la finca de Zarcero con mayor número de ganado (> 20), la muestra de leche correspondió a una muestra compuesta, tomada en el primer ordeño del día. Las muestras de leche se almacenaron a 4 °C por un periodo no mayor a 36 h y fueron transportadas al lugar de los ensayos manteniendo la cadena de frío por medio de recipientes asépticamente sanitizados.

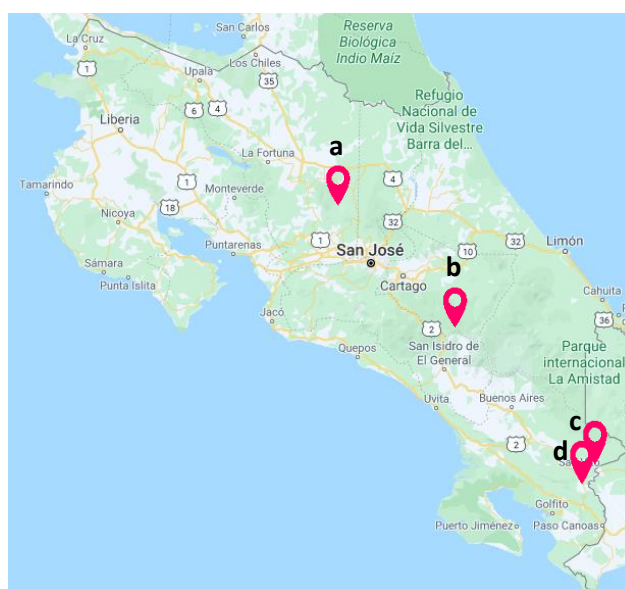


Figura 20. Ubicación geográfica de los muestreos de helechos *Pteridium spp.* (*P. caudatum* y *P. arachinoideo*), en las zonas de Cerro de la Muerte, Cartago, Costa Rica (b) y los distritos de Agua Buena (d) y Sabalito (c) de Coto Brus, Puntarenas, Costa Rica, y de leche bovina muestreada en La Brisa, Zarcero, Alajuela, Costa Rica (a) y los distritos de Agua Buena y Sabalito de Coto Brus, Puntarenas, Costa Rica.

6.2.3. Extracción del ptaquilósido (PTA) a partir del helecho (*Pteridium spp*)

El PTA se aisló a partir de polvo de helecho. del material molido se pesaron 2 g de cada especie por triplicado, cada parte de la planta y estado morfológico por separado. Seguidamente, se les adicionó 25 mL de agua destilada y se mantuvieron en agitación durante 60 min en baño ultrasónico. Luego, el extracto se filtró y el material restante se extrajo con 25 mL más en baño ultrasónico por 60 min. Posteriormente, los volúmenes sobrenadantes de ambas extracciones se unieron según cada especie y parte de la planta por separado y, a cada extracto acuoso se le realizó su cuantificación mediante conversión de PTA a PTB.

6.2.4. Cuantificación de biotóxina PTA en el extracto acuoso de helecho *Pteridium spp*

Para la cuantificación de PTA, fue necesaria la conversión de PTA a PTB, con el fin de obtener la forma más estable de la biotoxina, la pterosina B (Figura 16b) y para determinar la biotoxina total en las muestras (Aranha et al., 2014; Kisielius et al., 2020). Cada muestra se trató como un triplicado, por lo que a 2 mL de extracto acuoso se le adicionó 150 µL de NaOH 1 mol/L, buscando alcanzar un pH cercano a 11, y posteriormente se colocó en un baño con agua a 45 °C durante 60 min. Transcurrido este tiempo, al extracto se le adicionó 150 µL de HCl 5 mol/L, de modo que el pH fuera cercano a 2, con el fin de convertir toda la ptaquilodienona a pterosina B. Seguidamente, el PTB de la muestra fue extraído mediante una partición con tres porciones de 2 mL de diclorometano y, en caso de ser necesario, se centrifugaron para favorecer la separación.

Después de la extracción, todos los extractos se recolectaron en un tubo de ensayo para tener un único volumen y el diclorometano se evaporó a una temperatura no mayor a 42 °C, utilizando un rotavapor Heidolph™. Paralelamente, la partición con diclorometano se le realizó a un duplicado de cada muestra, sin realizar la conversión de PTA a PTB. Las muestras se llevaron a sequedad y el residuo se disolvió en un volumen exacto de 2 mL de una disolución MeOH: H₂O 50:50, luego se filtraron utilizando un microfiltro de 0,45 µm y se colocaron en un vial de 2 mL de vidrio color ámbar, para su cuantificación mediante HPLC-DAD. Una vez cuantificadas mediante una curva de calibración de PTB, el contenido de PTA se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$PTA_{mg/kg} = PTB_{total} - PTB_{inicial} \quad Ec (1)$$

Donde la concentración de PTB total corresponde a la obtenida por las muestras con conversión de PTA a PTB y el PTB inicial corresponde a las muestras a las que no se les realizó la conversión. Por lo tanto, la diferencia corresponde a la forma de biotoxina como ptaquilósido que se encuentra originalmente en la muestra antes de su conversión a PTB.

6.2.5. Cuantificación de biotoxina PTA en muestras de leche fresca bovina

Se tomaron 2 mL de cada muestra de leche fresca en un tubo de ensayo por triplicado, a cada una se le adicionaron 3 mL de metanol, luego se colocaron en un baño ultrasónico por 15 min y se centrifugaron a 3000 rpm por 5 min. El líquido sobrenadante

se recolectó y el residuo se descartó, al líquido sobrenadante se le adicionaron 3 mL de acetonitrilo, se agitó por 15 min más en baño ultrasónico y se centrifugó a 3000 rpm por 5 min. El líquido sobrenadante restante se mezcló con el líquido sobrenadante de la primera precipitación. Al volumen total se le realizó la conversión de PTA a PTB con las mismas cantidades de NaOH y HCl que en las muestras de hebrecho, con el mismo tiempo y temperatura de incubación. Posteriormente, cada muestra se trasvasó a un tubo plástico de 50 mL y se diluyó a 30 mL con agua destilada, luego se congelaron las muestras, se liofilizaron en un liofilizador Martin Christ Beta 1-8 LSCplus y, finalmente, el extracto seco se reconstituyó con 2 mL de una disolución MeOH:H₂O (50:50). El extracto obtenido se pasó a través de un filtro de 0,45 µm y se depositó en un vial de vidrio color ámbar para HPLC, para su posterior cuantificación mediante HPLC-DAD, utilizando el mismo rango de la curva de calibración utilizada para las muestras de hebrechos.

6.2.6. Procedimiento de calibración para la cuantificación de PTA en hebrechos y leche

El contenido de pterosina B en las muestras se cuantificó mediante una curva de calibración de seis puntos, utilizando un estándar de alta pureza. Se preparó una disolución de trabajo de 10 mg/L de PTB, para la cual se pesó una cantidad exacta de 0,001 g que se disolvió en metanol hasta un volumen de 100 mL; de esta disolución se prepararon estándares de PTB de 0,3 mg/L, 0,5 mg/L, 1,0 mg/L, 1,5 mg/L, 2,0 mg/L y 3,0 mg/L, que se aforaron con metanol grado HPLC. La curva de calibración se inyectó en HPLC-DAD siguiendo las mismas condiciones cromatográficas que las muestras, y se evaluó su linealidad de modo que $R^2 \geq 0,995$. Cada estándar se resguardó en viales color ámbar y se mantuvieron en congelación para que la curva de calibración se mantuviera estable.

6.2.7. Instrumentación y condiciones cromatográficas

Se utilizó un equipo HPLC Agilent Technologies 1200 (Santa Clara, CA, USA) constituido de una bomba de vacío desgasificadora, un automuestrador, una bomba binaria y un compartimento para columna termoestable. Se inyectaron 90 µL de cada muestra y estándares a una columna analítica phenomenex (Luna® 5 µm C18 (2) 100 Å, LC Column 250 x 4.6 mm, Ea) con precolumna (Zorbax plus C18, 5 µm particle size, 4,6 x 12,5 mm), a una temperatura de 25 °C. Los compuestos se separaron con una elución

de gradiente isocrático binario: (solución A: agua con H_3PO_4 0,1 % y solución B: metanol HPLC) con proporciones de 50 % de B y 50 % de A, a una velocidad de flujo de 1 mL/min durante 13,5 min.

El análisis de biotoxina en las muestras de leche se llevó a cabo en un sistema LC/MS 4000 QTrap® triple cuadrupolo/QqQLIT equipado con una interfase TurboIon-Spray™, Analyst 1.6.2 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), y un sistema HPLC 1200 Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA). La separación se desarrolló utilizando una columna analítica de fase reversa phenomenex (Luna® 5 μm C18 (2) 100 Å, LC Column 250 x 4,6 mm, Ea) con precolumna (Zorbax plus C18, 5 μm particle size, 4,6 x 12,5 mm); la fase móvil, el gradiente y el flujo fueron los mismos que se utilizaron para la cuantificación de la biotoxina en los helechos por HPLC-DAD. El flujo generado por el sistema cromatográfico se introdujo en la fuente de iones ESI operada en modo positivo con los siguientes parámetros: Gas cortina (CUR 21 psi); Ion Spray (IS -5500 V); Temperatura de gas turbo (TEM 150 °C); Gas de nebulización (GS1 25 psi); Gas turbo (25 psi), Unidad de resolución /Unidad, DP 20, CE 25, CXP 10 para PTA y DP 50, CE 26, CXP 10 para PTB.

6.2.8. Análisis estadístico

El análisis de los datos se realizó mediante pruebas de análisis de varianza ANOVA y comparación de medias por Tukey con un 95 % de confianza, y boxplot utilizando los software estadísticos de Minitab 18 y JMP 8.

6.3.Resultados y discusión

El contenido de PTA en el helecho puede ser muy variado, y puede estar determinado por el ambiente en el que se desarrolla la planta, otros estudios indican que puede variar incluso según su localización, al igual que varía según la parte de la planta que se estudia.

Para las dos subespecies de *Pteridium* que se estudiaron, se pudo determinar que la biotoxina se encuentra presente en los raquis, frondas y tallos con un contenido muy variable entre las distintas partes del helecho de cada especie. La variedad *P. arachnoideo* posee mayor contenido de PTA en comparación con la especie *P. caudatum*; sin embargo, esta diferencia es únicamente significativa para los raquis, con un 60 % más de biotoxina.

En el caso de los tallos, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las dos especies y, a la vez, estos no muestran diferencia significativa entre las frondas de las dos especies. Aunque la especie *P. arachnoideo* presenta un mayor contenido de PTA en los raquis, la especie *P. caudatum* posee hasta un 54 % más de la biotoxina como PTA en las frondas (Figura 21). Estas últimas diferencias pueden deberse a la variación natural en la cubierta de la fronda y a las condiciones hidrológicas en la capa de hojarasca (Rasmussen et al., 2003).

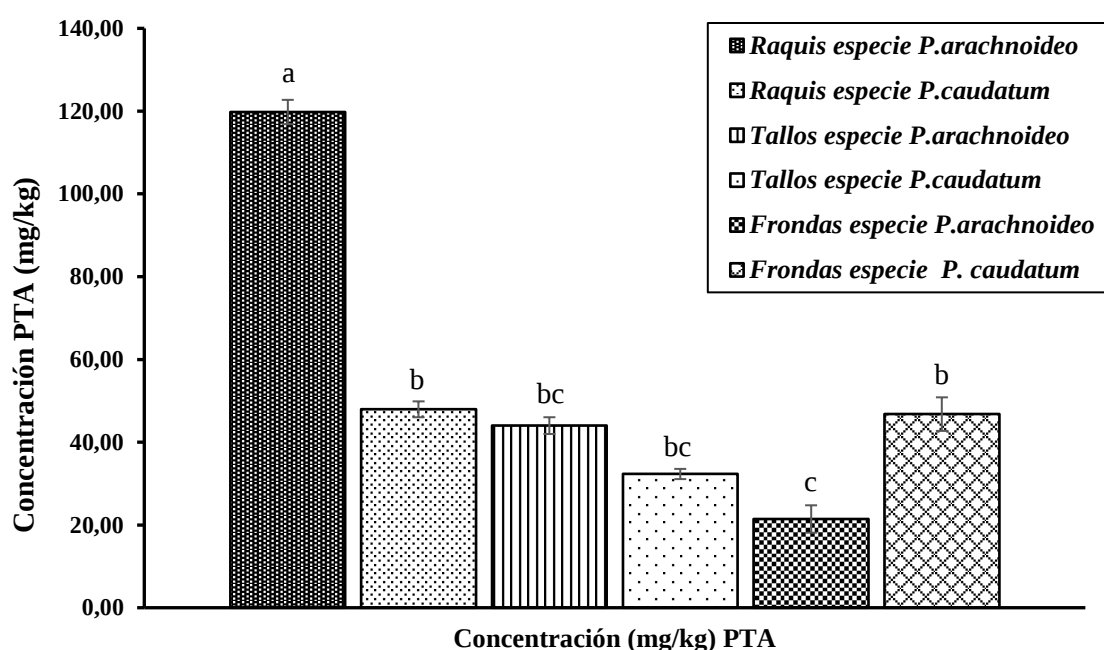


Figura 21. Concentración de PTA en frondas, raquis y tallos de dos especies de *Pteridium*.

En general, la media de contenido de PTA de las partes del helecho son similares entre las frondas y los tallos, pero el contenido de PTA de los raquis es más variable, como se observa en la Figura 22a. Esta variación entre los grupos también se observa al comparar los datos generales para cada especie, donde *P. arachnoideo* presenta mayor variación de la concentración de PTA que *P. caudatum*, además de que los contenidos de PTA entre las especies no son similares (Figura 22b). No obstante, se recomienda realizar una investigación más detallada de las especies para estimar las diferencias entre ambas y su respectiva distribución, así como la relación con el lugar de desarrollo y su comparación con otras especies de *Pteridium*.

Cabe destacar que las variedades de helechos se desarrollaron en el mismo ambiente y localización, por lo que las diferencias se pueden atribuir principalmente al tipo de

especie. Otros factores como la exposición a restos de material vegetal producido en la temporada de crecimiento anterior o la variación en el lixiviado de las frondas, pueden provocar diferencias entre las distintas partes de la planta y entre las especies (Rasmussen et al., 2003).

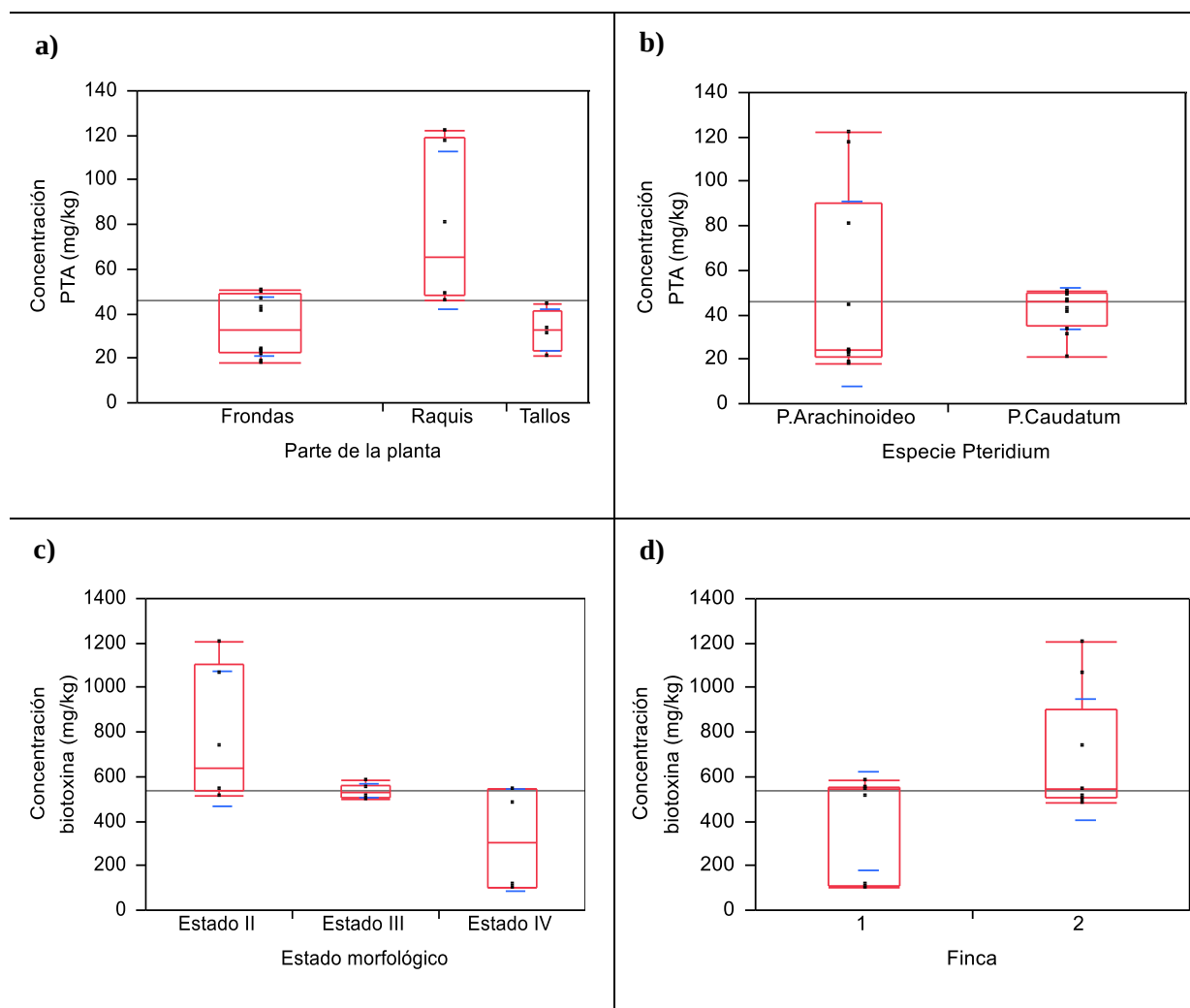


Figura 22. Análisis estadístico boxplot del contenido de la biotoxina PTA (mg/kg) en a) tres partes de la planta (raquis, tallos y frondas) b) dos variedades de *Pteridium*, c) estados morfológicos de la especie *P.caudatum* y d) fincas de ganado vacuno en Costa Rica (Finca 1 Agua Buena, Finca 2 Sabalito), utilizando el software estadístico JMP 8.

El contenido de PTA en distintos estados fenológicos se determinó para la especie *P. caudatum*, estudio que fue realizado en conjunto con la tesis de investigación de grado “Estudio del efecto de consumo de ptaquilósido del helecho macho *Pteridium caudatum* (L.) Maxon, en la calidad e inocuidad de la producción de leche, de hatos ubicados en dos fincas lecheras del cantón de Coto Brus, Puntarenas, Costa Rica” de la estudiante Daniela Burgos Álvarez (Burgos-Álvarez, D. 2020).

El contenido de PTA fue variable para los tres estados en estudio (II, III, y IV), y para las dos fincas ubicadas en el Cantón de Coto Brus, Puntarenas (Figura 23). Los helechos provenientes de la Finca 2 (Sabalito) poseen mayor contenido de biotoxina en forma de PTA, contrario a los helechos provenientes de la Finca I (Agua Buena) en estado fenológico II, III y IV, en los que la biotoxina se encuentra en forma de PTB mayoritaria o totalmente. Por esta razón, estos helechos se podrían clasificar como menos genotóxicos, ya que una vez que la biotoxina se convierte en PTB, la reacción no se puede revertir para dar lugar a la formación de ptaquilodienona (APT), molécula a la cual se le atribuye la genotoxicidad, caso contrario a la presencia de PTA, que sí puede dar origen a la APT (Marrs & Watt, 2006; Yamada & Kigoshi, 2007).

Cabe destacar que el contenido de biotoxina total (PTA + PTB) en los helechos de la finca 2 en estado III y IV, con 508 mg/kg y 562 mg/kg, respectivamente, no presentan diferencias estadísticamente significativas, ni presentan diferencias en comparación con lo reportado para el estado II (532 mg/kg) y III (562 mg/kg) de la Finca 1. En ambas fincas se observa que el estado de crecimiento II posee un mayor contenido de PTB y que conforme el helecho crece esta va disminuyendo. Estos resultados coinciden con lo reportado por Rincón et al., (2016).

Las medias del contenido de PTA de cada estado de crecimiento del helecho no son similares entre sí, mientras que los resultados de los grupos del estado II y IV presentan mayor variabilidad en comparación con el estado III. En cuanto a las fincas, ambas presentan una variabilidad similar entre los resultados, pero las medias de concentración de PTA son muy diferentes (Figura 22c y 22d).

Las diferencias entre los distintos estados fenológicos, así como la distinta localización de los helechos, pueden provocar variabilidad en el contenido de biotoxina y en la forma química en que esta se encuentra. Estas variaciones pueden atribuirse a diversos factores como el suelo y las condiciones climáticas a las que se expone la planta durante su desarrollo. Otros estudios han destacado que el contenido de minerales como fósforo, magnesio y hierro en el suelo pueden producir variabilidad en el contenido de la biotoxina (Zaccone et al., 2014). De igual forma, la exposición a la luz o sombra en que se encuentra el helecho puede variar su contenido, ya que se ha encontrado que los helechos que crecen en condiciones de sombra tienen un contenido medio de ptaquilósido, mientras que helechos en lugares claros tienen las concentraciones más bajas de éste. Todos estos factores influyen en el contenido de biotoxina en la planta; sin embargo, se ha encontrado coincidencia en que el contenido de ptaquilósido es mayor en los estados

fenológicos más prematuros o estados de crecimiento más tempranos de la planta (Rincón et al., 2016). Esto puede también relacionarse con el hecho de que el ganado prefiere consumir las hojas más tiernas que las maduras o con la rotación del pastoreo, que aumenta la probabilidad de que el ganado consuma primero los helechos en estados de crecimiento más tempranos antes de que alcancen su desarrollo completo. Si este factor se relaciona, entonces puede ser más probable que la leche proveniente del ganado que consumió el helecho, también contenga cantidades importantes de la biotoxina.

En Costa Rica no existen estudios en los que se haya reportado presencia de ptaquilósido en leche en condiciones no experimentales, sin embargo, se conoce la alta incidencia de la presencia del helecho en las zonas ganaderas del país. Por esta razón, se realizó un escaneo de tres fincas para determinar si la leche proveniente de fincas costarricenses podría contener cantidades importantes de la biotoxina, y para realizar la cuantificación del contenido de PTA en muestras de leche proveniente de ganado que pastorea en las fincas en las que se tomaron las muestras de helechos.

La cuantificación del ptaquilósido se llevó a cabo mediante HPLC/MS y la cuantificación de PTB se basó en PTB protonado $[M + H]^+ 219,1$ m/z como el único ion observado, y se utilizó la ecuación 1. A partir de la Cuadro 4 se puede observar que no fue posible detectar el contenido de PTA en las muestras de leche provenientes de la Finca 1, resultados que coinciden con los obtenidos a partir de los helechos que se muestrearon en la misma finca (Figura 23).

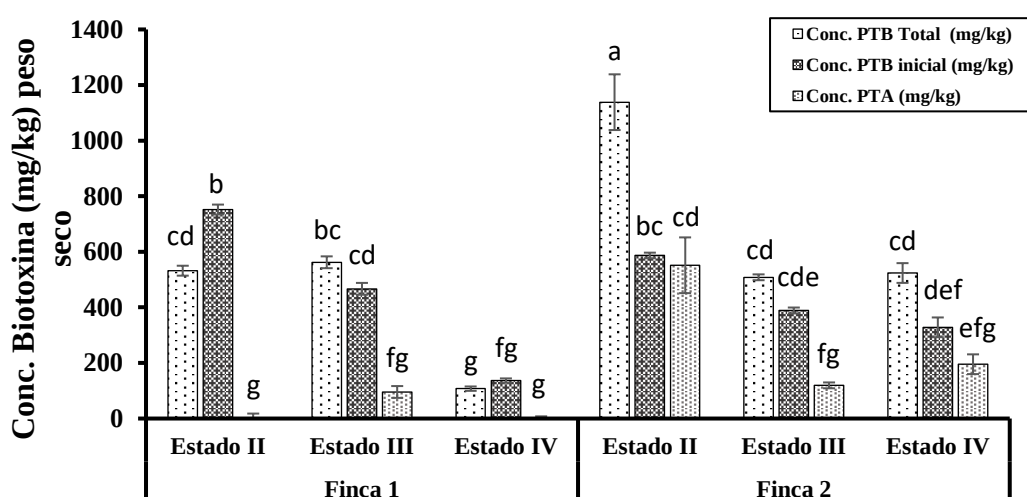


Figura 23. Concentración de PTA inicial, PTB inicial y biotoxina total como PTB (PTB + PTA) en mg/kg de muestras de helechos (*Pteridium caudatum*) en sus tres estados fenológicos provenientes de Cañas Gordas, Agua Buena, Coto Brus, Puntarenas, Costa Rica (Finca 1) y en Valle Hermoso, Sabalito, Coto Brus, Puntarenas, Costa Rica (Finca 2).

De acuerdo con los resultados obtenidos en la Finca 1, el contenido de PTA en la leche fue relativamente bajo, por lo que es de esperar que, en el caso de que el ganado ingiriera estos helechos, la cantidad de metabolito podría no haberse detectado en la leche. Detectable porque que no se excreta en la leche. En cuanto a la Finca 2, la cantidad de PTA en la leche correspondió a 3,78 µg/L, mientras que las muestras de leche provenientes de la Finca 3 reportaron hasta tres veces más la cantidad de PTA (9,71 µg/L) en comparación con la finca Finca 2. Aunque estos resultados son menores a los reportados por fincas en otros países, la exposición prolongada puede ser un factor importante por considerar (Burgos-Alvarez, D. 2020).

Los resultados pueden alertar sobre la excreción de la biotoxina en leche proveniente de fincas costarricenses, por lo que deben realizarse estudios más detallados, para implementar certeramente medidas que disminuyan la exposición a PTA y disminuir el riesgo que podría ocasionar sobre quienes se encuentran expuestos. Adicionalmente, en áreas donde la leche proviene de vacas que podrían haber consumido el helecho, la ingesta de leche podría ser un factor importante de exposición a la biotoxina. En áreas en las que el ganado no se encuentra expuesto al pastoreo, aunque el helecho se abundante, la vía de exposición podría deberse a otros factores como, por ejemplo, la contaminación del agua (Rasmussen et al., 2005).

El hecho de que la leche proveniente de fincas en donde se encuentra el helecho no contenga biotoxina, no implica que el riesgo de exposición sea menor o nulo (Zaccone., et al 2014). En general, se requiere realizar mayores estudios que involucren aspectos fisiológicos y bioquímicos con respecto a la producción de PTA en helechos y a su presencia en leche. Esto implicaría una ayuda para comprender mejor y predecir la aparición de este carcinógeno en el medio ambiente y el riesgo de su exposición a los seres humanos.

Cuadro 4. Concentración de biotoxina en leche (µg/L) proveniente de tres fincas costarricenses por HPLC-MS

Finca	Ubicación	Conc. Promedio PTA (µg/L)	Desv.std	RSD
1	Agua Buena, Coto Brus	ND	-	-
2	Valle Hermoso, Coto Brus	3,78	1,01	26,7
3	La Brisa, Zarcero	9,71	3,26	33,6

ND = No detectado

6.4. Conclusiones

Las variedades de helecho evaluadas presentaron una variación importante entre las frondas, raquis y tallos. *P. arachnoideo* presentó mayor variación de concentración de PTA que *P. caudatum*, mientras que la variedad del helecho *P. arachnoideo* presentó un 60 % más de biotoxina como PTA encontrada en los raquis en comparación con la especie *P. caudatum*. Por otro lado, *P. caudatum* posee hasta un 54 % más de PTA en las frondas que *P. arachnoideo*.

Se estimó que el estado fenológico II del helecho *Pteridium* posee un mayor contenido de biotoxina total y, conforme el helecho crece, la cantidad de biotoxina disminuye, por lo que el contenido de la biotoxina es mayor en los estados fenológicos de crecimiento más tempranos de la planta.

No obstante, se determinó la presencia de la biotoxina de hasta 10 µg/L de PTA en leche proveniente de dos fincas costarricenses, en Coto Brus y Zarcero, por lo que se considera importante realizar mayores estudios sobre la evaluación de la presencia y concentración de la biotoxina en leche proveniente de otras fincas ganaderas del país.

6.5. Agradecimientos

Se reconoce el financiamiento y soporte dado por parte de la Estación Experimental de Ganado Alfredo VolioMata, del Centro Nacional de Alta Tecnología (CeNAT) y del Centro Nacional de Innovaciones biotecnológicas (CENIBiot) de Costa Rica.

6.6. Referencias

- Alonso-Amelot, M.E., Castillo, U., Smith, B.L., Lauren, D.R. (1998). Excretion through milk, of ptaquiloside in bracken-fed cows. A quantitative assessment. *Lait*, 78, 413–423.
- Alonso-Amelot, M.E., Avendaño, M. (2001). Possible association between gastric cancer and bracken fern in Venezuela: an epidemiologic study. *The International Journal of Cancer*, 91, 252–259.

- Aranha, P. C. R., Hansen, H. C. B., Rasmussen, L. H., Strobel, B. W., & Friis, C. (2014). Determination of ptaquiloside and pterosin B derived from bracken (*Pteridium aquilinum*) in cattle plasma, urine and milk. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 951–952 (1), 44–51.
- Bonadies, F., Berardi, G., Nicoletti, R., Romolo, F.S., De Giovanni, F., et al. (2011). A new very sensitive method of assessment of ptaquiloside, the major bracken carcinogen in the milk of farm animals. *Food Chemistry*, 124: 660-665.
- Calderón, A., Sánchez, L.M., Mancebo, B., Marrero, E., Chiriboga, X., Silva, J. (2014). Residualidad del ptaquilósido en la leche procedente de granjas bovinas en tres cantones de la provincia Bolívar, Ecuador. *Revista Salud Animal*, 36 (1), 19–27.
- Burgos-Alvarez, D. (2020). Estudio del efecto de consumo de ptaquilósido del helecho macho *Pteridium caudatum* (L.) Maxon, en la calidad e inocuidad de la producción de leche, de hatos ubicados en dos fincas lecheras del cantón de Coto Brus, Puntarenas, Costa Rica. Universidad de Costa Rica, Facultad de Ciencias Agroalimentarias, Escuela de Zootecnia.
- DECOS–Dutch Expert Committee on Occupational Standards. (1995). Scientific documentation on the Dutch list of occupational carcinogens (II), in: Bracken Fern: Kaempferol, Ptaquiloside, Quercetin and Shikimic Acid, Ministry of Social Affairs and Employment, Den Haag, 14–23.
- Engel, P., Brandt, K.K., Rasmussen, L.H., Ovesen, R.G., Sørensen, J. (2007). Microbial degradation and impact of Bracken toxin ptaquiloside on microbial communities in soil. *Chemosphere*, 67, 202–9.
- Fletcher, M.T., Reichmann, K.G., Brock, I.J., McKenzie, R.A., Blaney, B.J. (2011). Residue potential of norsesquiterpene glycosides in tissues of cattle fed Austral bracken (*Pteridium esculentum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 8518–23.
- Gil da Costa, R. M., Bastos, M. M. S. M., Oliveira, P. A., & Lopes, C. (2012). Bracken-associated human and animal health hazards: Chemical, biological and pathological evidence. *Journal of Hazardous Materials*, 203-204, 1–12.

- Gomes, J., Magalhaes, A., Amado, F., Aranha, P., Ovesen, R. G., & Hansen, H. C. B. (2012). *Pteridium aquilinum* and Its Ptaquiloside Toxin Induce DNA Damage Response in Gastric Epithelial Cells, a Link with Gastric Carcinogenesis. *Toxicological Sciences*, 126 (1), 60–71.
- IARC – International Agency for Research on Cancer. (1986). Bracken fern (*Pteridium aquilinum*) and some of its constituents, Some Naturally Occurring and Synthetic food Components, Furocoumarins and Ultraviolet Radiation, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. *International Agency for Research on Cancer*, 40 (7), 135.
- Kisielius, V., Lindqvist, D.N., Thygesen, M.B., Rodamer, M, Hansen, H.C.B, Rasmussen, L.H. (2020). Fast LC-MS quantification of ptaquiloside, caudatoside, ptaquiloside and corresponding pterosins in bracken ferns. *Journal of chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1138, 121966.
- Marrs, R. H., & Watt, A. S. (2006). Biological Flora of the British Isles: *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn. *Journal of Ecology*, 94 (6), 1272–1321.
- Marrero, F.E., Calderón, T.A. (2012). Plantas tóxicas e inocuidad alimentaria: Hematuria Enzoótica Bovina por *Pteridium* ssp. un problema relevante de salud. *Revista Salud Animal*, 34 (3), 137-143.
- Panther, K.E., Gardner, D.R., Lee, S.T., Pfister, J.A., Ralphs, M.H., Stegelmeier, B.L., L.F. James, L.F. (2007). Important poisonous plants of the United States, in: R.C. Gupta (Ed.). *Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles*, Academic Press, New York.
- Rasmussen, L.H., Jensen, L.S. & Hansen, H.C.B. (2003). Distribution of the Carcinogenic Terpene Ptaquiloside in Bracken Fronds, Rhizomes (*Pteridium aquilinum*), and Litter in Denmark. *Journal of Chemical Ecology*, 29, 771–778.
- Rasmussen, L. H., Kroghsbo, S., Frisvad, J. C., & Hansen, H. C. B. (2003). Occurrence of the carcinogenic Bracken constituent ptaquiloside in fronds topsoils and organic soil layers in Denmark. *Chemosphere*, 51 (2), 117–127.

- Rasmussen, L.H., Hansen, H.C.B., Lauren, D. (2005). Sorption, degradation and mobility of ptaquiloside, a carcinogenic Bracken (*Pteridium spp.*) constituent, in the soil environment. *Chemosphere*, 58, 823-835.
- Rincón, D.F., Díaz, G.J., Gardner, D.R. (2016). Detection of Ptaquilosides in different phenologic stages of Bracken fern (*Pteridium aquilinum*) and analysis of milk samples in farms with hematuria in Tolima, Colombia. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 11 (1), 72-77.
- Sánchez, A. J., & Secaira, G. (2014). Risk by Human Health for Invasion of *Pteridium arachnoideum*, in Bolívar, Ecuador Ptaquiloside's Content in Fronds and in Milk. 4(6), 84–94.
- Vetter, J.A. (2009). Biological hazard of our age: bracken fern *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn- a review. *Acta Vet Hung.* 57 (1), 183-196.
- Virgilio, A., Sinisi, A., Russo, V., Salvatore, G., Santoro, A., Galeone, A., et al. (2015). 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.* 63 (15), 4886–92.
- Villalobos-Salazar, J. (1987). Carcinogenicidad del *Pteridium aquilinum* y alta incidencia del cáncer gástrico en Costa Rica. *Abstracts XXIII World Veterinary Congress*, 90.
- Villalobos-Salazar, J., Mora, J., Meneses, A., Rojas, J.L., Porras, A., Herrero, M.V. (1989). Bracken-derived carcinogens as affecting animal health and human health in Costa Rica, in: J.A. Taylor (Ed.), *Bracken Toxicity and Carcinogenicity as Related to Animal and Human Health*, International Bracken Group Occasional Publication, Aberystwyth, 40–51.
- Villalobos-Salazar, J., Hernandez, H., Meneses, A., Salazar, G. (2000). In *Bracken: Toxicity, Biology and Control*. Taylor, J.A., Smith, R.T. (eds.). International Bracken Group. Manchester, UK. 68.
- Yamada, K., & Kigoshi, H. (2007). Ptaquiloside, the major toxin of bracken, and related terpene glycosides : chemistry, biology and ecology, 798–813.

- Zaccone, C., Cavoski, I., Costi, R., Sarais, G., Caboni, P., Traversa, A., & Miano, T. M. (2014). Ptaquiloside in *Pteridium aquilinum* subsp. *aquilinum* and corresponding soils from the South of Italy: Influence of physical and chemical features of soils on its occurrence. *Science of The Total Environment*, 496, 365–372.
- Zumbado-Gutiérrez, L., & Romero-Zuñiga, J. (2015). Conceptos sobre inocuidad en la producción primaria de la leche. *Revista Ciencias Veterinarias*, (33), 51-66.

CAPÍTULO 7: EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE LA BIOTOXINA PTAQUILÓSIDO DURANTE EL PROCESAMIENTO DE LECHE BOVINA Y DESARROLLO DE SUBPRODUCTOS LÁCTEOS (QUESO TIPO BLANDO Y YOGURT AZUCARADO)

RESUMEN: Se llevó a cabo la contaminación de leche con extracto concentrado de ptaquilósido (PTA), y se evaluó el efecto del procesamiento (pasteurización y elaboración de queso blando y yogurt) sobre el contenido de PTB. Se determinó que la pasteurización degrada todo el PTA a pterosina B (PTB), mientras que la cantidad de PTB presente en la leche pasteurizada se degrada hasta la segunda semana de almacenamiento en refrigeración a 8 °C, cuando su consumo ya no es óptimo. En cuanto a la elaboración de yogurt, esta no altera la estabilidad y prevalencia del PTA que se encuentra originalmente en la leche contaminada, por lo que un pH del medio cercano a 4 no degrada el PTA presente; además, el PTA se convierte totalmente a PTB después de la primera semana de almacenamiento en refrigeración a 8 °C. Finalmente, los estudios realizados en quesos tipo blando mostraron que la cantidad de biotoxina en el queso disminuyó con el tiempo de almacenamiento y que la concentración de biotoxina no se ve afectada por la fuerza iónica según los niveles evaluados, por lo que es preciso mayores estudios para estimar la degradación del PTA a PTB durante la elaboración y almacenamiento. Sin embargo, los sueros de los quesos con menor contenido de sal presentaron mayor retención de biotoxina, lo que implicaría una menor prevalencia de la biotoxina en la red proteica del queso. A mayor contenido de sal, menor retención de biotoxina en el suero, y podría estimarse una mayor prevalencia en la matriz del queso.

Palabras clave: *pasteurización, PTA, PTB, leche, yogurt, queso*

7.1.Introducción

Ptaquilósido (PTA) es una toxina del helecho (*Pteridium spp.*) a la cual se le han asociado efectos genotóxicos. Es inestable en condiciones ácidas y alcalinas acuosas a temperatura ambiente, ya que sufre desglucosilación de d -(+)- glucosa y la hidrólisis conduce a compuestos como la indanona pterosina B (PTB). A un pH inferior a 4, la vida media en solución acuosa varía de horas a días, mientras que a un pH superior a 7, la vida media es de segundos a horas (Ayala et al., 2006). A temperatura ambiente y en condiciones acuosas alcalinas, el PTA se transforma en una dienona conjugada inestable que presenta un agente alquilante fuerte, capaz de reaccionar con el ADN y de provocar la rotura de la cadena. En condiciones acuosas ácidas se produce el mecanismo de protonación y la tautomerización de la molécula de PTA. El proceso continúa con el ataque nucleofílico del agua en el anillo de ciclopropano, que lleva a una sustitución SN2, y finalmente a un proceso de aromatización que conduce a la liberación de glucosa y a la formación de PTB (Figura 24) (Aranha et al., 2014).

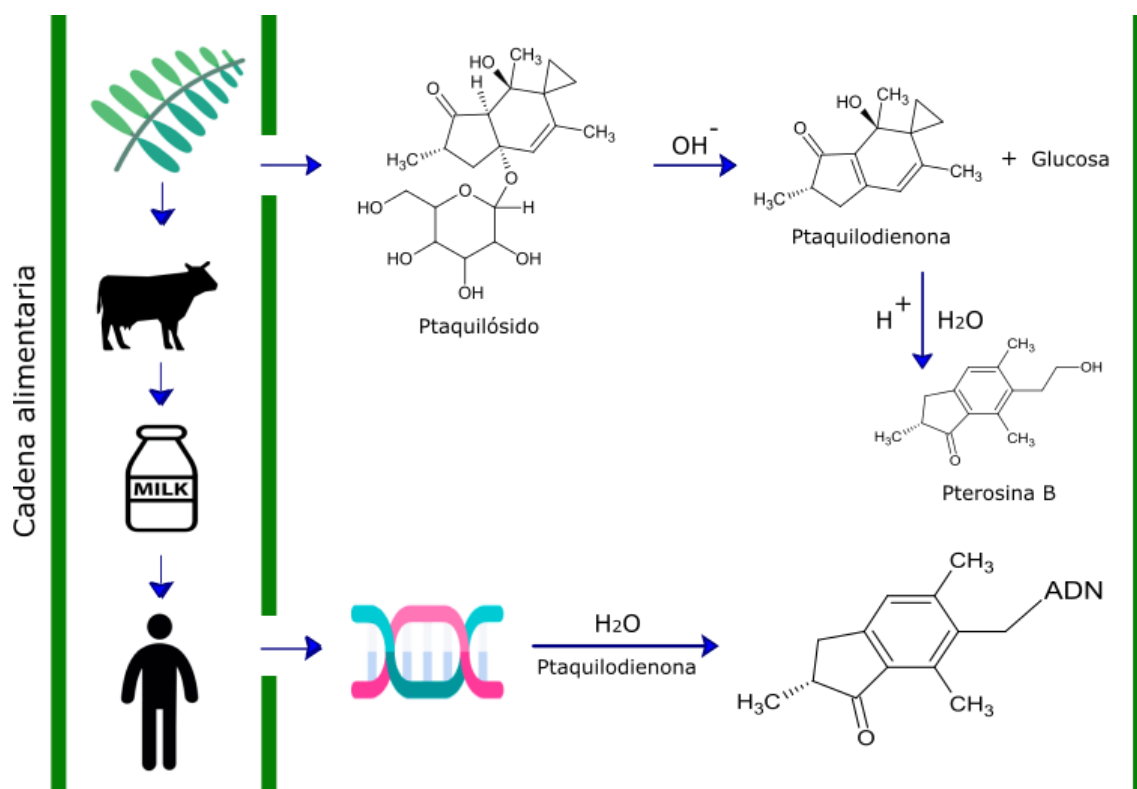


Figura 24. Cadena alimentaria del helecho (*Pteridium*) y reactividad bajo condiciones fisiológicas del ptaquilósido.

Actualmente existe un creciente interés por el estudio y conocimiento de biotoxinas que afecten la salud humana, causando cuadros clínicos de intoxicación que puedan manifestarse repentinamente o a largo plazo (Calderón et al., 2014). Se ha determinado que la leche de ganado que ingiere el helecho es uno de los vínculos por el cual el ser humano podría padecer cáncer gástrico, producido por el consumo de leche contaminada con PTA (Francesco et al., 2011; Villalobos-Salazar, 1987).

Estudios han determinado que en áreas montañosas, donde la presencia del helecho es más común, también es alta la prevalencia de hematuria enzoótica bovina provocada por el helecho, lo que aumenta el riesgo de contaminación al ser humano y su relación con el cáncer gástrico en los consumidores (Ramwell et al., 2010). Por otra parte, también se ha asociado la influencia de otros factores de riesgo como la dieta, el abuso de alcohol y la infección estomacal con *Helicobacter pylori* con la aparición de esta enfermedad; sin embargo, se consideran insuficientes para causar muerte por cáncer gástrico, por lo que otra causa asociada podría ser el consumo de leche contaminada con ptaquilósido (Alonso-Amelot & Avendaño, 2001).

A pesar de que se conoce mucho sobre los mecanismos de reacción y la carcinogenicidad del helecho, no existe suficiente información sobre la estabilidad del PTA. Muchos investigadores como Ovesen et al. (2008), Rasmussen et al. (2005), Skourti-Stathaki et al. (2016) y Zaccone et al. (2014), han realizado numerosos estudios sobre la degradación del PTA en suelos. Estas investigaciones han determinado que el PTA se degrada tanto en suelos arcillosos como arenosos y que la degradación está asociada con diferencias en la acidez, el contenido de arcilla, el contenido de carbono y, probablemente, también con la actividad microbiana. Adicionalmente, se concluyó que la degradación se retrasa por las bajas temperaturas y el bajo contenido de materia orgánica, mientras que es más rápida en suelos arenosos ácidos ($\text{pH} < 4$), aunque disminuye con un menor contenido de materia orgánica. La materia orgánica juega un papel importante para la unión del ptaquilósido al suelo y, aunque el ptaquilósido tiene una sorción relativamente baja, la unión limitada reduce la movilidad del compuesto y aumenta la posibilidad de que el químico se degrade antes de llegar a las fuentes de agua (Rasmussen et al., 2003a; Rasmussen et al., 2003b; Rasmussen et al., 2005; Ovesen et al., 2008; Zaccone et al., 2014; Skourti-Stathaki et al., 2016). Estos aportes han sido sumamente importantes y relevantes, ya que han permitido tomar precauciones sobre la presencia y el manejo de suelos que podrían estar contaminados con la biotoxina.

Aún existen vacíos importantes de conocimiento con respecto a la estabilidad de la biotoxina en leche y subproductos lácteos. Se espera que poblaciones que consumen leche procesada industrialmente y procedente de animales alimentados con dietas controladas, deberían tener un menor riesgo de consumir indirectamente PTA, ya que la leche que ingrese a la industria debería diluirse en una mayor cantidad de leche proveniente de distintas fincas y ser pasteurizada antes de ser consumida. Por otro lado, se ha reportado que la pasteurización podría disminuir las concentraciones de ptaquilósido en la leche en un 50 %, mientras que la ebullición lo disminuye en un 75 % aproximadamente (Alonso-Amelot et al., 1998; Villalobos-Salazar et al., 2000; Gil da Costa et al., 2012). No obstante, no existen estudios experimentales que demuestren estos datos y den más información sobre la ruta de degradación del PTA a nivel molecular. Tampoco se han realizado estudios de procesamiento y estabilidad durante el almacenamiento de subproductos lácteos como el yogurt y queso tipo blando, los cuales son productos de alto consumo y suelen elaborarse frecuentemente de manera artesanal en zonas rurales destinadas a la producción agropecuaria de leche.

Bajo este contexto, la presente investigación busca llevar a cabo un estudio de estabilidad y prevalencia de la biotoxina ptaquilósido en leche bovina y subproductos lácteos elaborados a partir de leche cruda, como yogurt azucarado y queso blando. El estudio tiene como objetivo originar importantes aportes para el control y manipulación de leche que podría estar contaminada con PTA y causar implicaciones sanitarias en la salud pública, con el fin de ejercer mayor control sobre las poblaciones más vulnerables.

7.2. Materiales y métodos

7.2.1. Reactivos químicos y materiales

Estándar pterosina B 98% adquirido de Aobious (U.S.A, Gloucester). Metanol grado HPLC, etanol absoluto grado ACS y ácido clorhídrico grado analítico adquiridos de Sigma–Aldrich®, (Milwaukee, WI, U.S.A). Hidróxido de sodio pellets para análisis y Acetonitrilo Lichrosolv® que fueron adquiridos de Merck (Darmstadt, Alemania). Diclorometano grado ACS que fue obtenido de J.T. Baker® (U.S.A). Agua desionizada, obtenida a partir de un sistema de purificación MilliQ Plus (Miliford, MA, U.S.A). Ácido orto-fosfórico 85 % (H_3PO_4), obtenido de Fermont® (U.S.A). Resina Poliamida 6 (tamaño de partícula (50-160) μm de Sigma-Aldrich® (Alemania) y resina amberlite® XAD HP 20-60 mesh Sigma-Aldrich® (Francia). Cultivo Chr. Hansen termofílico para yogurt YC-X11 50U YoFlex® (Dinamarca). Cultivo Chr. Hansen láctico termofílico ST-M5 50U (Dinamarca), cuajo líquido 3 muñecas®

7.2.2. Recolección y preparación de las muestras

La recolección del helecho *Pteridium spp.* (*P. aquilinum caudatum var. caudatum* y *P. esculentum var. Arachnoideum*) se realizó de manera aleatoria. Se tomaron muestras, tanto de helechos tiernos como maduros, en el Cerro de la Muerte, Cartago y San José, (9°34'00"N 83°45'00"O). Los helechos se almacenaron a temperatura ambiente y protegidos de la luz, y se prepararon para el proceso de liofilización. Posteriormente, se molieron hasta obtener un polvo fino y se almacenaron a 10 °C en bolsas o frascos, protegidos de la humedad, el calor y la luz.

La leche utilizada fue provista por la Estación Experimental de Ganado Lechero Alfredo Volio Mata de la Facultad de Ciencias Agroalimentarias de la UCR, ubicada en

Ochomogo, Cartago, y correspondió a leche de vaca (*Bos taurus*) procedente de animales de raza Jersey. El ganado se encontraba sano y se garantizó que la leche estuviera exenta de biotoxina, ya que la estación ganadera se encuentra libre del helecho. Las muestras de leche se almacenaron a 4 °C por un periodo no mayor a 36 h y fueron transportadas al lugar de los ensayos manteniendo la cadena de frío por medio de hieleras sanitizadas.

7.2.3. Preparación de extracto concentrado en ptaquilósido (PTA) a partir del helecho (*Pteridium spp*)

El PTA fue aislado y purificado siguiendo la metodología descrita por Rasmussen et al (2005), Aranha et al. (2014) y Clauson-kaas et al. (2016), con modificaciones. Se mezclaron 100 g de polvo de helecho con 500 mL de agua destilada mediante agitación en baño ultrasónico durante 60 min, luego se filtró el extracto y se concentró para eliminar la mayor cantidad de agua.

Posteriormente, el extracto concentrado se hizo pasar por una jeringa empacada con 10 g de resina poliamida 6 de tamaño de partícula (50 -160) μm , Sigma-Aldrich, adaptada a una cámara de vacío. Una vez que se aplicó el extracto concentrado, éste fue eluido con 100 mL de agua destilada, aplicando ligeramente vacío en caso de ser necesario, para favorecer la elución de la muestra. El extracto colectado se pasó por una columna de vidrio de tamaño aproximado de 2,5 cm de diámetro por 33 cm de longitud y empacada con 100 g de resina Amberlite XAD2 (Supelco), que fue activada con metanol y enjuagada con agua. Seguidamente, el extracto se lavó con 150 mL de agua destilada y fue eluido con 150 mL de etanol, y luego se concentró en un rotavapor hasta sequedad, utilizando una temperatura no mayor a 42 °C.

El extracto se congeló, se liofilizó y, posteriormente, se realizó su conversión de PTA a PTB. Para su cuantificación, 2 mL del extracto acuoso de PTA se llevaron hasta un pH de 11 con NaOH 1 mol/L y se colocó en baño de agua a 45 °C durante 60 min, después se dejó enfriar y se llevó hasta pH < 2 con HCl 5 mol/L, para finalizar la conversión de PTA a PTB. El extracto fue finalmente extraído con 3 porciones de diclorometano de 1 mL cada una.

Los extractos se colectaron y se concentraron en un rotavapor a una temperatura no mayor a 42°C, el residuo se reconstituyó con 2 mL de metanol: agua 50:50 grado HPLC, se pasó a través de un filtro de 0,45 μm y se depositó en un vial para HPLC de vidrio color ámbar, para su posterior cuantificación mediante HPLC-DAD a 260 nm. A partir

del extracto concentrado, se preparó una disolución de PTA (4 – 6) mg/L en agua desionizada para posteriores análisis, y se analizó por triplicado mediante conversión de PTA a PTB para conocer la concentración exacta.

7.2.4. Estabilidad y prevalencia de la biotoxina en leche y subproductos lácteos

7.2.4.1.Efecto de la pasteurización sobre la estabilidad del ptaquilósido en leche bovina contaminada

A partir de la disolución de (4 – 6) mg/L PTA, se contaminaron muestras de leche fresca cruda bovina a concentraciones de 250 ng/mL, 500 ng/mL y 750 ng/mL. La leche contaminada se sometió a un proceso de pasteurización a partir del mismo lote, con el fin de evaluar si los cambios de temperatura y el tiempo de exposición eliminarían total o parcialmente el contenido de ptaquilósido en leche.

El proceso de pasteurización utilizado consistió en someter la leche a un calentamiento hasta alcanzar 65 °C, temperatura que se mantuvo constante durante 30 min, y luego se enfrió por shock térmico a 10 °C, siguiendo los procedimientos descritos por Chacón (2003). La leche pasteurizada se envasó en recipientes esterilizados para evitar alguna contaminación que pudiera alterar los resultados y para mantener su vida útil. Posteriormente, se analizó el contenido de ptaquilósido en la leche, mediante HPLC-DAD y se siguió la metodología de extracción y cuantificación detallada en los apartados 6.2.5, 6.2.6 y 6.2.7.

Para determinar la estabilidad de la biotoxina durante el almacenamiento de las muestras de leche, se guardaron porciones de leche contaminada debidamente empacadas y una porción sin contaminar como medio de control, y se mantuvieron en refrigeración. Estas porciones se analizaron por triplicado a las 0 semanas, 1 semana y 2 semanas durante el periodo de almacenamiento, considerando la vida útil del producto.

7.2.4.2.Elaboración artesanal de queso a partir de leche contaminada con PTA

A partir de las leches crudas contaminadas con ptaquilósido a concentraciones de 250 ng/mL, 500 ng/mL y 750 ng/mL, se continuó con la elaboración de queso blando. Se elaboró un único lote de producción, para lo que siguió la metodología descrita por Chacón (2003) (Figura 25). La temperatura a la que se preparó el queso fue de 25 °C

aproximadamente y se adicionó a la leche el cultivo láctico en una proporción de volumen de 1:50 (cultivo: leche). La mezcla se realizó en un recipiente de acero inoxidable previamente lavado y se agitó con una cuchara grande. Seguidamente, la mezcla se dejó en reposo durante 30 min, después de los cuales se continuó con el proceso de coagulación, en el que la temperatura se mantuvo a 39 °C. Durante la coagulación, se midió la temperatura en el centro del recipiente con un termómetro limpio, se adicionó lentamente el cuajo líquido en una proporción aproximada de 0,07 mL por cada litro de leche y se agitó vigorosamente por 3 min. Finalmente, la mezcla se dejó reposar durante 35 min y se verificó que el punto de corte fuera el adecuado haciendo presión sobre la pared del recipiente, si se despegaba fácilmente sin dejar pedazos en la pared, el punto de corte era el correcto, de lo contrario se esperaron 5 min más. Una vez que estuvo lista la cuajada, se cortó en cuadros pequeños con una lira para dejar salir la mayor cantidad de suero posible, también se batió la cuajada para mejorar la salida del suero. Luego, se agitó lentamente por 5 min y se dejó reposar durante 15 min; para favorecer el desuerado se adicionó agua a una temperatura aproximada de 60 °C (200 g de agua por cada kilogramo de leche cortada en queso), en cuyo caso se continuó agitando la cuajada.

Posteriormente, se separó aproximadamente el 70 % del suero para ser analizado posteriormente y la cuajada se dejó escurrir a través de una manta. Seguidamente, se recogió en un recipiente y se guardó para la posterior extracción y determinación de PTA. Se dejó una parte del queso sin salar y otras dos partes fueron saladas al 1 % y 2 %, con el fin de determinar el efecto de la fuerza iónica sobre la estabilidad del ptaquilósido; la sal se calentó con el fin de eliminar la mayor cantidad de agua. Finalmente, se realizó el moldeo, con moldes de plástico PVC redondos que se cubrieron con un lienzo y se llenaron con la cuajada, a la que se le aplicó una pequeña presión para compactarla mejor; luego se voltearon los moldes tres veces en intervalos de 15 min. Seguidamente, los moldes se dejaron reposar por 3 h y se sacaron los quesos, que fueron almacenados en refrigeración.

Se guardaron porciones debidamente empacadas del producto obtenido y se mantuvieron en refrigeración. Estas porciones se analizaron en cuatro tiempos durante su almacenamiento: a las 0 semanas, 1 semana, 2 semanas y 3 semanas, considerando la vida útil del producto.

Tanto a las muestras de suero como a las de queso, se les realizó la cuantificación de biotoxina para determinar si el procedimiento de elaboración de queso afectó la concentración inicial y si hubo pérdidas en el suero, la cuantificación se realizó justo

posterior a su elaboración (0 semanas). A partir del queso almacenado se tomó una muestra del suero obtenido a partir del desuerado natural del queso blando durante su almacenamiento, fueron analizadas por triplicado, luego de estar almacenadas por un mes, con el fin de evaluar la retención de biotoxina en el suero con el tiempo.

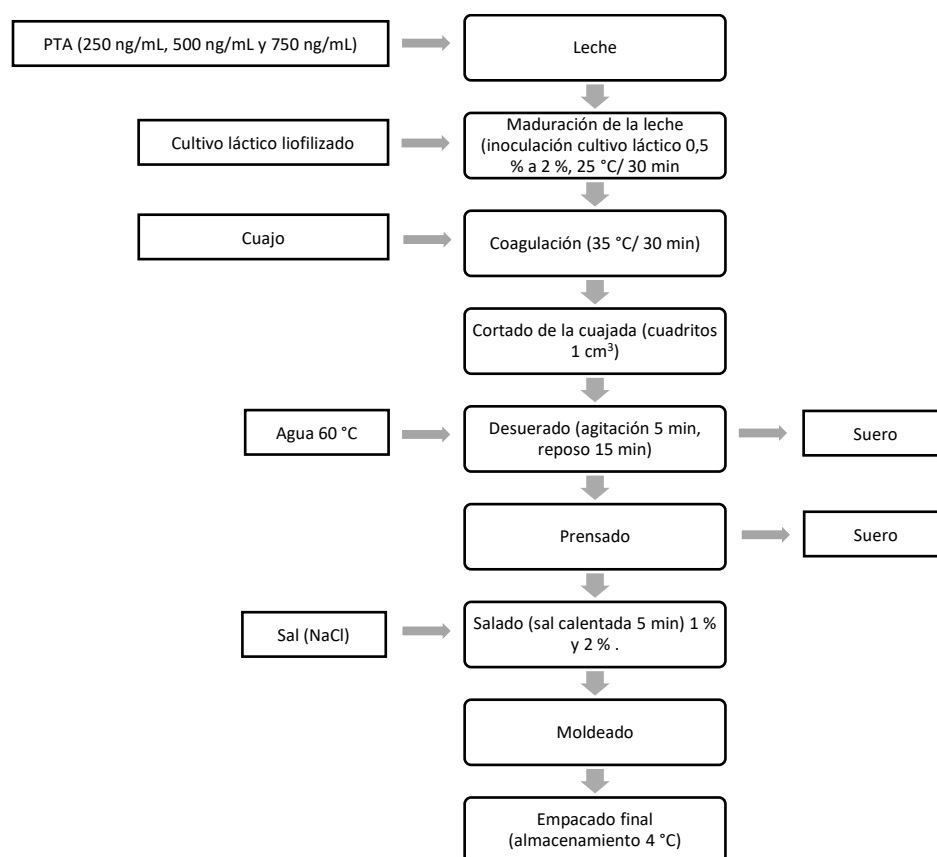


Figura 25. Diagrama de proceso para la elaboración de queso blando para la evaluación de la estabilidad y prevalencia del PTA.

7.2.4.3. Elaboración artesanal de yogurt a partir de leche contaminada con PTA

Mediante la elaboración de yogurt, se pudo determinar el efecto de la acidez sobre el contenido de ptaquilósido y su prevalencia en un producto lácteo distinto del queso blando. Se elaboró un único lote de manera artesanal, siguiendo el procedimiento descrito por Chacón (2003) y Zielinski, Toledo, Sotorani et al (2013) (Figura 26). Se calentó un litro de leche hasta llegar a aproximadamente 85 °C por 30 min (justo antes de que hierva) para pasteurizar el medio, luego se enfrió rápidamente hasta 46 °C, al sumergir el recipiente en el que se calentó la leche en un contenedor lleno de agua con hielo; por último, se retiró cuando el termómetro indicó una temperatura de 47 °C (Zielinski,

Toledo, Storani, & et al., 2013). Posteriormente, se realizó la contaminación de las muestras de leche a tres concentraciones de PTA: 250 ng/mL, 500 ng/mL y 750 ng/mL. Se agregaron 60 g de leche en polvo y 60 g de azúcar mientras la leche se estaba enfriando para obtener entre 12 % y 18 % de contenido de sólidos; una vez agregados, se agitó suavemente para evitar la formación de grumos.

Se adicionó el cultivo iniciador liofilizado directamente a la leche, según la recomendación del proveedor, y se agitó suavemente, manteniendo la temperatura cercana a 45 °C. De acuerdo con la recomendación del proveedor, por lo general se recomienda unos 5 g por cada litro. Luego se colocó el recipiente en donde se realizó la elaboración en un tanque con agua a 42 °C (nunca menos de 37 °C). Es muy importante que el baño mantenga esta temperatura constante durante la incubación.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las muestras se mantuvieron en refrigeración a 6 °C durante (3 – 4) h, con el fin de que el nivel de acidez fuera el adecuado, ya que no se recomienda que alcance valores de pH menores a 4,2 después de enfriar y almacenar. De igual forma, se evitó la producción de agua en la superficie por la contracción de las proteínas coaguladas. El yogurt se batió y se envasó en recipientes plásticos limpios que se almacenaron en refrigeración.

Seguidamente se cuantificó el contenido de ptaquilósido en el yogurt para determinar si la elaboración afecta la estabilidad y prevalencia de la biotoxina, específicamente, según el grado de acidez.

Se guardaron porciones debidamente empacadas del producto obtenido, que se mantuvieron en refrigeración, y se analizaron por triplicado en tres tiempos (0 semanas, 1 semana y 2 semanas), considerando la vida útil del producto.

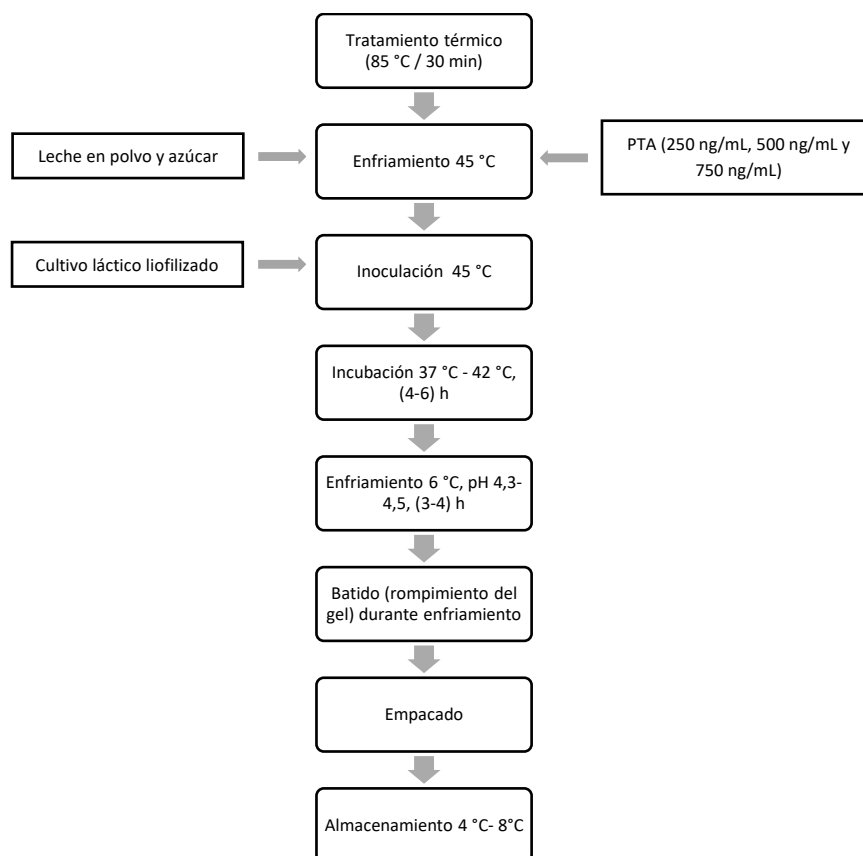


Figura 26. Diagrama de proceso para la elaboración artesanal de yogurt para la evaluación de la estabilidad y prevalencia del PTA.

7.2.4.4. Cuantificación de biotoxina en leche y subproductos lácteos

Para la precipitación de proteínas, la muestra de leche bovina fresca y las muestras de yogurt se trataron con 3 mL de metanol, agitándolas en baño ultrasónico por 15 min. Se utilizó un aproximado de 2 mL de leche, 2 mL de suero y 2 g para yogurt y queso por triplicado para cada caso. En el caso del queso, este se maceró con metanol, luego todas las muestras se centrifugaron a 3000 rpm por 5 min y se filtraron. El sobrenadante se trató con 3 mL de acetonitrilo para la precipitación de lípidos y se agitó en baño ultrasónico por 15 min más. Por otro lado, se realizó la conversión de PTA a PTB al líquido sobrenadante, utilizando las mismas cantidades de NaOH y HCl que en las muestras de helecho, y se incubó a 45 °C durante 60 min. Posteriormente, las muestras se diluyeron con 30 mL con agua destilada, se congelaron y se liofilizaron. Finalmente, el extracto seco se reconstituyó con 2 mL de una disolución metanol: agua (50:50), se pasó a través de un filtro de 0,45 µm y se depositó en un vial para HPLC de vidrio color ámbar para su posterior cuantificación mediante HPLC-DAD.

Para la cuantificación, se analizó una porción sin conversión de PTA a PTB y otras con conversión. La biotoxina se determinó como la cantidad de PTA presente originalmente en la muestra; sin embargo, en caso de detectar degradación significativa, se cuantificó como biotoxina total en otras formas tóxicas del sesquiterpeno.

7.2.5. Preparación de curva de calibración

El contenido de biotoxina se cuantificó mediante una curva de calibración realizada a partir de un estándar de alta pureza de PTB, en un rango de valores de (0,30 – 3,00) mg/L (Calderón et al., 2014; Sánchez & Secaira, 2014).

Para la preparación de la curva de calibración, se pesaron 0,001 g de estándar, que se disolvieron en metanol y se aforaron hasta 100 mL para obtener una concentración final de 10 mg/L. De esta disolución se prepararon estándares de 0,3 mg/L, 0,5 mg/L, 1,0 mg/L, 1,5 mg/L, 2,0 mg/L y 3,0 mg/L, estos se aforaron con metanol grado HPLC, se filtraron a través de un filtro de 0,45 µm y se guardaron en viales para HPLC de vidrio color ámbar.

7.2.6. Análisis instrumental

Para la cuantificación se utilizó un sistema HPLC Agilent 1200 (constituido de una bomba de vacío degasificadora, un automuestrador, una bomba binaria y un compartimento para columna termoestable, marca Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), se inyectaron 90 µL a una columna analítica phenomenex (Luna® 5 µm C18 (2) 100 Å, LC Column 250 x 4.6 mm, Ea) con precolumna (Zorbax plus C18, 5 µm particle size, 4.6 x 12.5 mm), a una temperatura de 25 °C. La fase móvil correspondió a agua con H₃PO₄ 0,1 % (eluyente A) y metanol (eluyente B). El gradiente de elución fue isocrático 50 % de B y 50 % de A, a una velocidad de flujo de 1 mL/min, durante 13,5 min.

7.2.7. Análisis estadístico

El análisis de los datos se realizó mediante pruebas de análisis de varianza ANOVA y comparación de medias por Tukey y t-Student ambas con un 95 % de confianza, boxplot y análisis bivariado utilizando los software estadísticos de Minitab 18 y JMP 8.

7.3.Resultados y discusión

Se ha estimado que el PTA es inestable, ya que puede degradarse en medios acuosos a través del tiempo y en presencia de luz (Rasmussen et al, 2005). No obstante, aún no hay estudios sobre la estabilidad de PTA disuelto en la leche y se han encontrado algunas interrogantes como la predicción de que la biotoxina todavía está presente después del procesamiento habitual de la leche y sus subproductos e incluso después de procedimientos rutinarios e industriales como la pasteurización, la evaporación y homogenización (Francesco et al., 2011). Por otro lado, hay estudios que han logrado determinar que el PTA en medios con un pH entre 3 y 5 podrían degradarse relativamente rápido debido a la hidrólisis de la molécula (Rasmussen et al., 2003a, b). Los estudios de estabilidad han sido realizados en muestras de suelo en los que se ha determinado la evidente degradación de la biotoxina por factores como la acidez, el contenido de arcilla, el contenido de carbono y la actividad microbiana. Sin embargo, en muestras lácteas no se han determinado factores que contribuyan a disminuir o degradar la biotoxina en el medio (Alonso-Amelot y Avendaño 2002).

Con el fin de llenar estos vacíos, en el presente estudio, se realizó un muestreo de leche bovina libre de PTA, que se contaminó a tres concentraciones de PTA (250 ng/mL, 500 ng/mL y 750 ng/mL), a partir de un extracto concentrado aislado del helecho *Pteridium*; seguidamente, las muestras fueron sometidas a procesos de pasteurización y elaboración de queso tipo blando y yogurt azucarado.

Los cambios en la concentración de PTA en las muestras de leche antes del procesamiento y después de la pasterización y elaboración de queso y yogurt, se muestran en la Cuadro 5, al igual que la concentración de PTA del suero obtenido durante el desuerado del queso blando.

Cuadro 5. Efecto del procesamiento de productos lácteos sobre la biotoxina en tres niveles de contaminación de PTA, analizada mediante HPLC-DAD 260 nm.

Concentración de biotoxina (mg/L y mg/kg)			
Producto lácteo	Nivel biotoxina	Antes de procesamiento	Después de procesamiento
Leche	Bajo	0,185 ± 0,004	0,220 ± 0,016
	Medio*	0,338 ± 0,018	0,423 ± 0,016
	Alto	0,477 ± 0,016	0,503 ± 0,023
Yogurt	Bajo	0,181 ± 0,009	0,164 ± 0,009
	Medio	0,356 ± 0,037	0,337 ± 0,035
	Alto	0,484 ± 0,050	0,360 ± 0,077
Queso **	Bajo*	0,156 ± 0,001	0,280 ± 0,006
	Medio*	0,301 ± 0,007	0,166 ± 0,006
	Alto*	0,569 ± 0,023	0,211 ± 0,010
Suero	Bajo*	0,156 ± 0,001	0,061 ± 0,002
	Medio*	0,301 ± 0,007	0,107 ± 0,001
	Alto*	0,569 ± 0,023	0,178 ± 0,025

*Existen diferencias estadísticamente significativas en las muestras antes de la elaboración y después de la elaboración con una 95 % de confianza.

** Determinación realizada para el queso con 0 % de sal.

Para estimar las diferencias entre los resultados antes y después del procesamiento, se realizó una prueba de t-Student. De acuerdo con los resultados, se concluye que no hay evidencia estadística ($p > 0,05$) de errores sistemáticos en las mediciones y que no hay diferencias significativas en la concentración de biotoxina antes y después de la pasteurización, tanto para las concentraciones bajas de PTA como para las concentraciones altas. No obstante, se pudo determinar que la pasteurización degrada todo el PTA a PTB, por lo que las cantidades expresadas como biotoxina total no muestran diferencias. De igual forma, en el caso del yogurt, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, ya que la elaboración de yogurt no altera la estabilidad y prevalencia del PTA que se encuentra originalmente en la leche contaminada, pero un pH de 4 en el medio podría degradar el PTA presente de un 6 % a 25 %. Sin embargo, este resultado no se considera significativo, ya que se atribuye la pequeña disminución en la concentración a la conversión de una parte de PTA a PTB, debido a la elaboración del producto.

En el caso del queso, se pudo determinar una disminución importante en las concentraciones medias y altas de PTA, ya que se reportó 45 % y 63 % de disminución, respectivamente. Los resultados expuestos se corroboran con la cuantificación de PTA en sueros obtenida durante el desuerado, pues se observó una pérdida de PTA cercana al 60 % para todas las concentraciones evaluadas. Este resultado era esperable, ya que el PTA es muy soluble en agua; no obstante, quedó un porcentaje importante retenido en la matriz del queso. Finalmente, la prueba de t-Student para quesos y sueros evidencia diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en la concentración de biotoxina antes y después del procesamiento, producto de la degradación e inestabilidad de la biotoxina en dichas matrices, así como de la complejidad de la elaboración y condiciones del medio.

Se realizó un estudio de degradación de la biotoxina en leche bovina cruda contaminada a tres niveles de concentración de PTA y almacenada en refrigeración (2 – 8) °C, durante dos semanas (Figura 27). Además, mediante análisis estadístico ANOVA se determinaron diferencias estadísticamente significativas en la concentración final de biotoxina a distintos tiempos de almacenamiento con un 95 % de confianza. Estos resultados indican que la biotoxina presente en las muestras de leche bovina se degrada con el tiempo. Además, se observó una disminución más importante durante la segunda semana de almacenamiento, momento en el que la leche cruda ya presentaba carga microbiana, por lo que la disminución se podría atribuir al crecimiento de bacterias capaces de utilizar PTA como fuente de energía (Rasmussen et al., 2005).

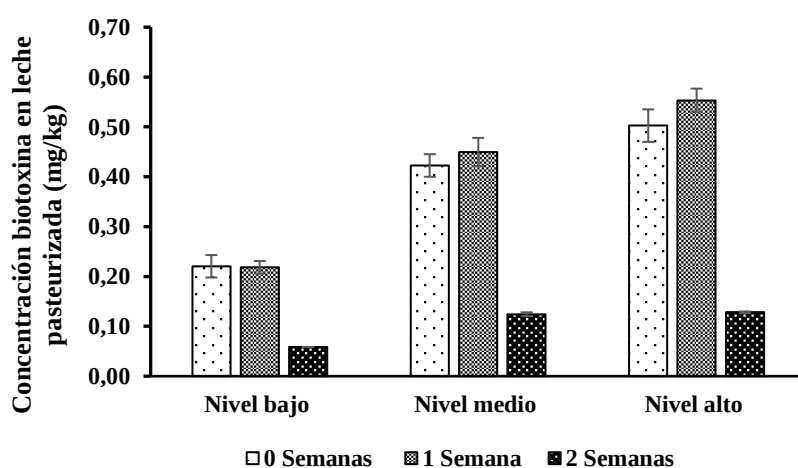


Figura 27. Concentración de biotoxina en leche bovina pasteurizada (mg/kg) en tres niveles de contaminación y dos semanas de almacenamiento en refrigeración a 8 °C, analizada mediante HPLC-DAD 260 nm.

No se observaron diferencias significativas ($p>0,05$) en el contenido de PTA a diferentes niveles de concentración, por lo que se concluye que la cantidad de biotoxina no es afectada por la cantidad de PTA presente inicialmente. Las muestras presentaron una degradación de 73 %, 72 % y 77 % para nivel bajo, medio y alto de concentración de PTA, respectivamente y hasta la última semana. Adicionalmente, se determinó que la concentración de biotoxina no se afecta por la interacción entre el tiempo de almacenamiento y el grado de contaminación de PTA por lo que, para este estudio, el grado de contaminación con la biotoxina no interfiere en el efecto del tiempo sobre la concentración de PTA.

El análisis bivariado confirma que la leche bovina (Figura 28a) muestra una disminución de la concentración de la biotoxina con el tiempo de almacenamiento hasta las 2 semanas, sin embargo, no se observó una interacción de tiempo con la concentración de PTA. Por otro lado, se observó que el tiempo de almacenamiento afecta de igual forma la degradación de PTA, independientemente de la concentración inicial de la biotoxina.

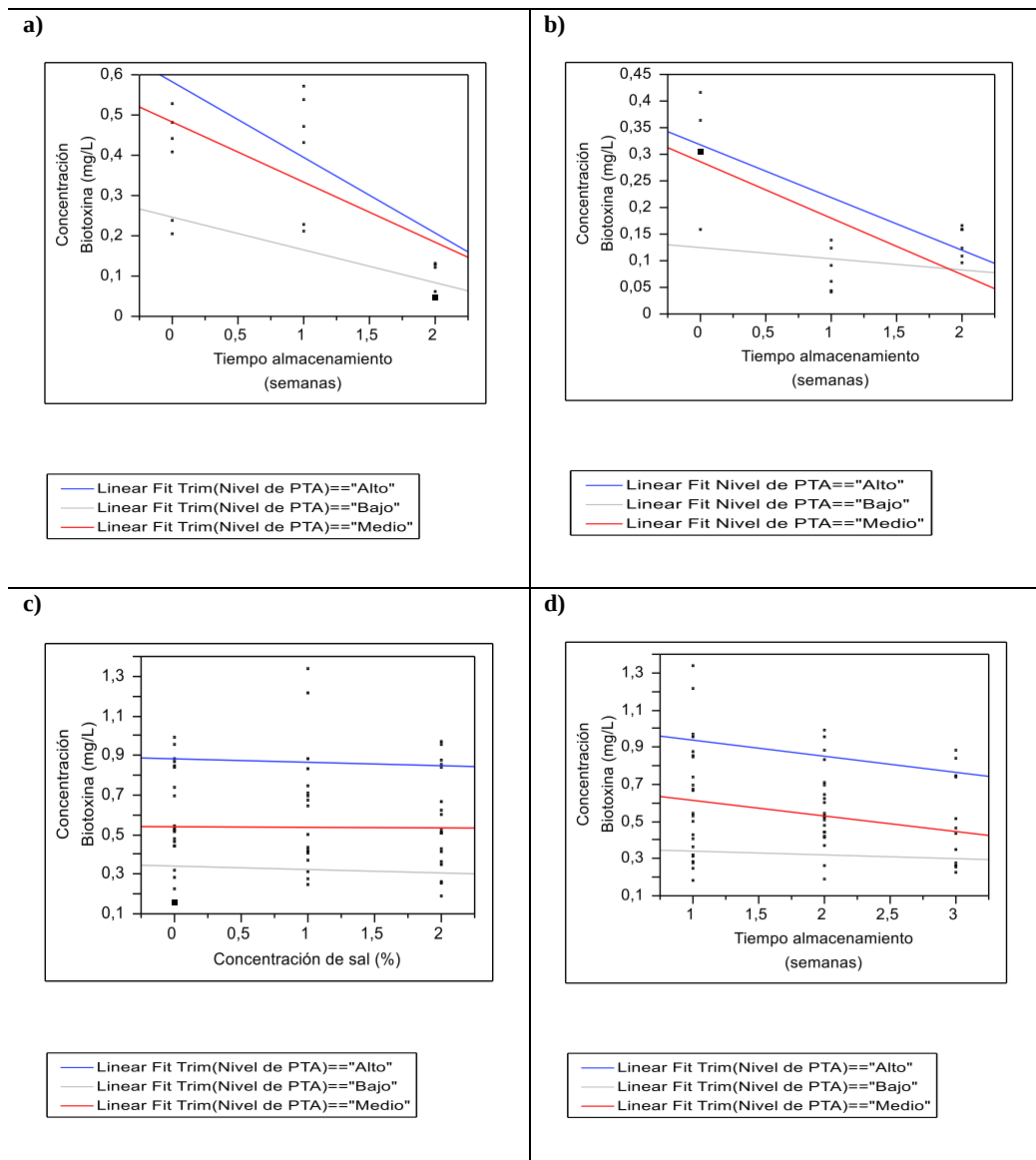


Figura 28. Análisis estadístico bivariado del contenido de PTA (mg/kg) con el tiempo de almacenamiento a 8 °C y cambio en la concentración de sal para el queso tipo blando. a) Leche bovina, b) Yogurt azucarado, c) Queso tipo blando a diferentes concentraciones de sal, d) Queso tipo blando almacenado.

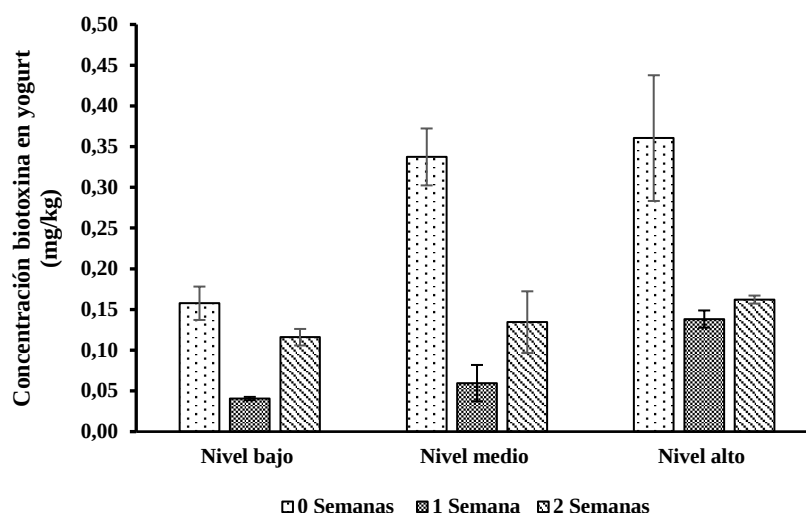


Figura 29. Concentración de biotoxina en yogurt azucarado (mg/kg) en tres niveles de contaminación y dos semanas de almacenamiento en refrigeración a 8 °C, analizada mediante HPLC-DAD 260 nm.

Las muestras de yogurt azucarado también fueron sometidas a un estudio de estabilidad por almacenamiento a 8 °C durante dos semanas, con el fin de determinar el curso temporal de la degradación de PTA y la variación resultante por el pH en un subproducto lácteo ácido como el yogurt (Figura 29). Mediante un análisis ANOVA se determinó que existen diferencias estadísticamente significativas con respecto al tiempo de almacenamiento y el nivel de PTA, con un 95 % de confianza. De igual forma, existen diferencias entre la concentración final de biotoxina a distintos tiempos de almacenamiento, con un 95 % de confianza, por lo que se concluye que el tiempo sí degrada la biotoxina presente en las muestras de yogurt azucarado. Conforme pasa el tiempo de almacenamiento a 8 °C, se observa una disminución en la concentración de biotoxina final.

No se obtuvo una interacción significativa ($p > 0,05$) entre el tiempo y la concentración de PTA (Figura 28b); sin embargo, se observa una menor pendiente para el nivel bajo, por lo que es posible que el tiempo afecte más a la degradación de concentraciones altas y medias de PTA. A la primera semana de almacenamiento a 8 °C, toda la biotoxina se encontraba presente como PTB, y después de la segunda semana de almacenamiento, se observó un ligero aumento en la concentración, debido a otras formas de la biotoxina que pudieron transformarse también a PTB, lo cual correspondió a un aumento de 65 %, 56 % y 15 % para el nivel de concentración bajo, medio y alto, respectivamente.

La fermentación láctea disminuye el pH de la leche hasta 4,2 - 4,5 (Wang et al., 2010), producto de la formación de ácido láctico, lo que podría degradar el PTA presente. Otros estudios realizados en suelos determinaron que el PTA encontrado en medios con pH 3 - 5 debería degradarse relativamente rápido, producto de la hidrólisis, y originaría la formación de pterosina B, mismo efecto que se comprobó justo después de su elaboración en las matrices lácteas (Rasmussen et al., 2005).

Por otro lado, la degradación de PTA es dependiente de la temperatura, por lo que almacenar los productos en refrigeración reduciría la degradación en comparación con un almacenamiento a 25 °C (Rasmussen et al., 2005); no obstante, una semana después de la preparación, el PTA se convierte totalmente a PTB, aún con almacenamiento en refrigeración a 8 °C. Estas investigaciones demuestran claramente que el PTA puede existir en un producto ácido como el yogurt durante períodos cortos de tiempo, más aún en almacenamiento a bajas temperaturas.

Los quesos formulados fueron sometidos a un estudio de estabilidad por tres semanas, los resultados se presentan en la Figura 30. Se observaron diferencias relevantes en la concentración de PTA a diferentes niveles de concentración, con un 95 % de confianza, por lo que se deduce que la concentración de biotoxina se ve afectada de diferente forma según la cantidad presente de PTA inicialmente. En general, se determinó que el tiempo si degrada la biotoxina presente en las muestras de queso blando.

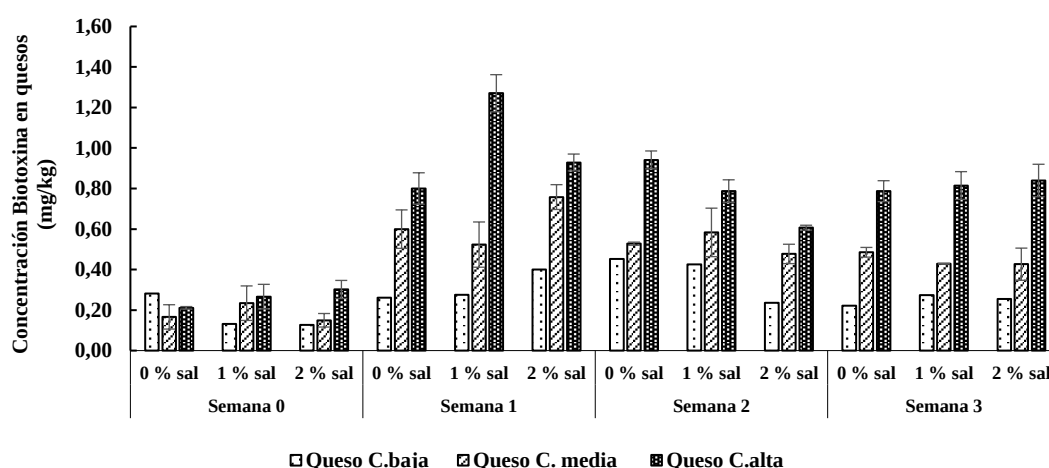


Figura 30. Concentración de biotoxina en queso tipo blando (mg/kg) en tres niveles de contaminación de PTA y concentración de sal (0 %, 1 % y 2 %) y dos semanas de almacenamiento en refrigeración a 8 °C, analizada mediante HPLC-DAD 260 nm.

A partir del estudio de diferentes concentraciones de sal (0 %, 1 % y 2 %), se determinó que no existen diferencias significativas en el contenido de PTA según la concentración de sal, con un 95 % de confianza. Por lo tanto, el contenido de biotoxina no se ve afectada por la fuerza iónica, según los niveles evaluados; estos resultados se pueden observar gráficamente, mediante el análisis bivariado (Figura 28c).

Cabe destacar que, aunque los quesos fueron elaborados a partir de leche cruda sin pasteurizar, se evaluó la presencia de la biotoxina inclusive hasta tres semanas después de su elaboración, cuando los quesos ya no eran aptos para su consumo. La interacción entre el tiempo de almacenamiento, la concentración de sal y el nivel de contaminación de PTA, no es significativa. Sin embargo, la interacción del tiempo de almacenamiento con el nivel de contaminación de PTA sí es significativa ($p \leq 0,05$), por lo que el nivel de contaminación de PTA afecta el efecto del tiempo sobre la degradación de la toxina.

Para el nivel bajo de PTA, no se observa un efecto del tiempo sobre la concentración de la biotoxina. Los estudios bivariados muestran que, a mayor tiempo de almacenamiento, se observa una disminución en la concentración de biotoxina final para el nivel medio y alto de PTA, por lo que se podría atribuir una degradación de la biotoxina en el medio después de un periodo de almacenamiento a 8 °C, para estos niveles (Figura 28d).

El queso es un producto con actividad de agua (a_w) muy elevada, cercana a 0,95, lo que aumenta la posibilidad de proliferación bacteriana. No obstante, si el queso es elaborado a partir de leche cruda sin pasteurizar, la carga microbiana es mayor, por lo que la vida útil del queso es menor. Si se asocia el hecho de que una mayor cantidad de microorganismos en el medio pueden degradar a mayor velocidad la materia orgánica presente, el PTA en el medio se degradaría también, lo que explicaría que el contenido de biotoxina en los quesos disminuye en el medio. Sin embargo, cabe destacar que en el medio pueden estar presentes otras formas de la biotoxina que, con el tiempo, se pueden transformar en PTB, lo que puede generar un aumento de la biotoxina en forma de PTB y se podría asociar a la fluctuación en la concentración de biotoxina en los quesos. Adicionalmente, no en todos los quesos existe un desuerado homogéneo, por lo que las pérdidas de biotoxina en los quesos pueden variar.

El desuerado durante la elaboración de quesos eliminó en un (15 - 17) % la cantidad inicial de biotoxina como PTA en la leche contaminada, utilizada independientemente de

la concentración de PTA presente originalmente en la leche. Asimismo, el suero de los quesos blandos, almacenados durante 30 días, presentó mayores concentraciones de biotoxina que los encontrados en el suero obtenido durante el desuerado de la elaboración (Figura 31). Adicionalmente, se demostró que los quesos con menor concentración de PTA presentaron una mayor pérdida de esta (16 - 30) % en comparación con los quesos de concentración media (15 - 20) % y alta 23 %, por medio del desuerado natural del queso blando después de un mes de almacenamiento de los quesos. Cabe destacar que los quesos con concentración alta de biotoxina presentaron menos pérdida de suero, por lo que no fue posible realizar la cuantificación de biotoxina en los SCA 1 % sal y SCA 2 % sal, ya que no se generó suero (Figura 31).

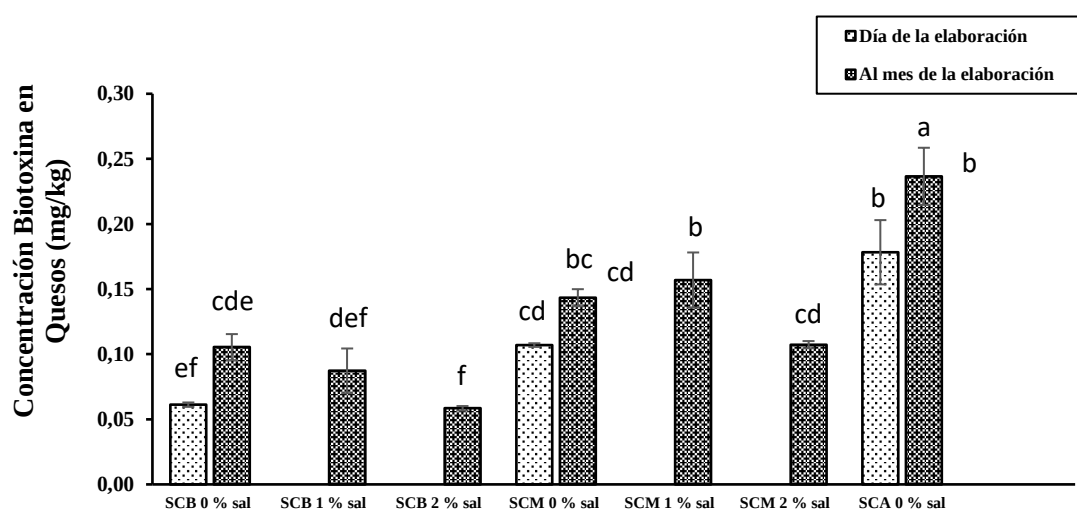


Figura 31. Concentración de biotoxina en el suero del queso tipo blando (mg/kg) en tres niveles de contaminación de PTA (baja (SCB), media (SCM) y alta (SCA), medidas al día de la elaboración y en tres niveles de concentración de sal (0 %, 1 % y 2 %) y al mes de almacenamiento en refrigeración a 8 °C, analizada mediante HPLC-DAD 260 nm.

A partir de un análisis de varianza ANOVA y prueba de comparaciones múltiples de Tukey se estima que existen diferencias significativas en la concentración de biotoxina proveniente de los quesos al día de la elaboración como al mes de la elaboración, para tres niveles de concentración de biotoxina, con un nivel de significancia de 0,05.

Los sueros de los quesos con menor contenido de sal (bajo y medio) presentaron mayor retención de biotoxina, lo que implica una menor prevalencia de la biotoxina en la red proteica del queso. En el caso de los sueros de los quesos con concentración media, no se observaron diferencias significativas con un 95 % de confianza en la retención de biotoxina entre los sueros provenientes de quesos con 0 % y 1 % de sal; sin embargo, en

el queso con 2 % de sal, si se observó una retención de biotoxina menor y una mayor prevalencia de esta en el queso, en comparación entre los quesos con misma concentración de biotoxina. Por lo tanto, a mayor contenido de sal, mayor fuerza iónica, menor retención de biotoxina en el suero y, podría estimarse, mayor prevalencia en la matriz del queso, sin presentarse variación en la cantidad de desuerado según la concentración de sal del queso.

7.4.Conclusiones

La pasteurización contribuye a una disminución de la biotoxina como PTA, producto de la degradación de PTA a PTB y, a su vez, éste se degrada hasta la segunda semana de almacenamiento en refrigeración a 8 °C, cuando su consumo ya no es óptimo. La disminución del pH a un valor cercano a 4, que se alcanza durante la elaboración de yogurt, no altera el contenido de PTA, ya que éste persiste en su forma química natural después de un periodo de 1 semana en refrigeración a (2 - 8) °C.

El desuerado, producto de la elaboración de queso tipo blando, puede eliminar hasta un 17 % del PTA; de igual forma, se pudo determinar una disminución importante de PTA para los quesos con concentraciones medias y altas de PTA, que aumentó con el tiempo de refrigeración de (2 - 8) °C, hasta el final de su vida útil.

Se evidenció que los quesos con concentración alta de biotoxina presentaron menos pérdida de suero y los sueros de los quesos con menor contenido de sal presentaron mayor pérdida de biotoxina durante el almacenamiento, lo que implica una menor prevalencia en la red proteica del queso.

7.5.Agradecimientos

Se reconoce el financiamiento y soporte dado por parte de la Estación Experimental de Ganado Alfredo Volio Mata, el Centro Nacional de Alta Tecnología (CeNAT) y el Centro Nacional de Innovaciones biotecnológicas (CENIBiot) de Costa Rica.

7.6.Referencias

- Alonso-Amelot, M.E., Castillo, U., Smith, B.L., Lauren D.R. (1998). Excretion through milk, of ptaquiloside in bracken-fed cows. A quantitative assessment. *Lait*, 78, 413–423.
- Alonso-Amelot, M., & Avendano, M. (2002). Human Carcinogenesis and Bracken Fern: A Review of the Evidence. *Current Medicinal Chemistry*, 9 (6), 675–686.
- Alonso-Amelot, M.E., Avendaño, M. (2001). Possible association between gastric cancer and bracken fern in Venezuela: an epidemiologic study. *The International Journal of Cancer*, 91, 252–259.
- Ayala-Luis, K. B., Hansen, P. B., Rasmussen, L. H., & Hansen, H. C. B. (2006). Kinetics of Ptaquiloside Hydrolysis in Aqueous Solution. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25 (10), 2623.
- Aranha, P. C. R., Hansen, H. C. B., Rasmussen, L. H., Strobel, B. W., & Friis, C. (2014). Determination of ptaquiloside and pterosin B derived from bracken (*Pteridium aquilinum*) in cattle plasma, urine and milk. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 951–952 (1), 44–51.
- Calderón, A., Sánchez, L.M., Mancebo, B., Marrero, E., Chiriboga, X., Silva, J. (2014). Residualidad del ptaquilósido en la leche procedente de granjas bovinas en tres cantones de la provincia Bolívar, Ecuador. *Revista Salud Animal*, 36 (1), 19–27.
- Chacón, A. (2003). La elaboración de queso fresco y otros derivados lácteos, guía básica artesanal y de la pequeña industria. Editorial Universidad de Costa Rica. San José. 66.
- Francesco, B., Giorgio, B., Rosario, N., Saverio, R. F., Francesco, D. G., Romano, M., ... Sante, R. (2011). A new, very sensitive method of assessment of ptaquiloside, the major bracken carcinogen in the milk of farm animals. *Food Chemistry*, 124 (2), 660–665.
- Gil da Costa, R. M., Bastos, M. M. S. M., Oliveira, P. A., & Lopes, C. (2012). Bracken-associated human and animal health hazards: Chemical, biological and pathological evidence. *Journal of Hazardous Materials*, 203-204, 1–12.

- Rasmussen, L.H., Jensen, L.S., Hansen, H.C.B., 2003a. Distribution of the carcinogenic terpene ptaquiloside in Bracken fronds, rhizomes (*Pteridium aquilinum*), and litter in Denmark. *Journal of Chemical Ecology*, 29, 771–778.
- Rasmussen, L.H., Kroghsbo, S., Frisvad, J.C., Hansen, H.C.B., 2003b. Occurrence of the carcinogenic Bracken constituent ptaquiloside in fronds, topsoils and organic soil layers in Denmark. *Chemosphere*, 51, 117–127.
- Rasmussen, L. H., Christian, H., Hansen, B., & Lauren, D. (2005). Sorption, degradation and mobility of ptaquiloside, a carcinogenic Bracken (*Pteridium sp.*) constituent, in the soil environment. *Chemosphere*, 58, 823–835.
- Skourti-Stathaki, E., Clauson-Kaas, F., Brandt, K. K., Rasmussen, L. H., & Hansen, H. C. B. (2016). Dissipation of pterosin B in acid soils – Tracking the fate of the bracken fern carcinogen ptaquiloside. *Chemosphere*, 165, 453–459.
- Ramwell, C. T., Beinum, W. Van, Rowbotham, A., Parry, H., Fera, C. R., Rowbotham, A., Parson, S. (2010). Ptaquiloside & other bracken toxins : A preliminary risk assessment.
- Villalobos-Salazar, J. (1987). Carcinogenicidad del *Pteridium aquilinum* y alta incidencia del cáncer gástrico en Costa Rica. *Abstracts XXIII World Veterinary Congress*, 90.
- Villalobos-Salazar, J., H. Hernandez, A., Meneses, G. Factors which may affect ptaquiloside levels in milk: effects of altitude, bracken fern growth stage and milk processing, in: J.A. Taylor, R.T. Smith (Eds.), *Bracken Fern: Toxicity, Biology and Control*, International Bracken Group Occasional Publication, Aberystwyth, 2000, 68–75.
- Wang, J., Guo, Z., Zhang, Q., Yan, L., Chen, Y., Chen, X., ... Zhang, H.-P. (2010). Effect of probiotic *Lactobacillus casei* Zhang on fermentation characteristics of set yogurt. *International Journal of Dairy Technology*, 63 (1), 105–112.
- Zaccone, C., Cavoski, I., Costi, R., Sarais, G., Caboni, P., Traversa, A., & Miano, T. M. (2014). Ptaquiloside in *Pteridium aquilinum subsp. aquilinum* and corresponding soils from the South of Italy: Influence of physical and chemical features of soils on its occurrence. *Science of The Total Environment*, 496, 365–372.

CAPÍTULO 8: DISCUSIÓN GENERAL

En Costa Rica y alrededor del mundo, se ha identificado la abundante presencia del helecho *Pteridium*, que se reconoce como un problema inminente para los animales en pastoreo y los seres humanos, ya que contiene importantes cantidades de la biotoxina ptaquilósido, asociada a padecimientos como la hematuria enzootica bovina en animales y el cáncer gástrico en humanos (Fletcher et al., 2011). A pesar de los estudios realizados a través del tiempo y la evidencia científica existente en torno a su toxicidad, aún falta mucho por estudiar. ¿Existe en Costa Rica un debido control de las zonas de pastoreo y áreas lecheras con el fin de disminuir la presencia de PTA en leche?, ¿Las autoridades de salud están realmente enteradas de los riesgos asociados a la presencia de la biotoxina en la leche? Quizás existan muchas otras preguntas; sin embargo, la respuesta puede ser en muchos casos negativa, lo que es verdaderamente preocupante. Por esta razón, debe existir un trabajo en conjunto entre el sector agropecuario y el sector de salud, para tomar medidas que disminuyan los riesgos asociados.

Desde la década de los 90's, en Costa Rica no se han realizado estudios al respecto. Si bien los aportes realizados por el investigador Jorge Villalobos han sido de suma importancia (Villalobos-Salazar., 1987; Villalobos-Salazar et al., 1989), el problema sigue existiendo casi dos décadas después. Los resultados realizados en el presente estudio reportan que Costa Rica es un país con alta presencia del helecho en zonas de pastoreo, que evidentemente existe presencia de la biotoxina en la leche de origen bovino en concentraciones de hasta 9,71 µg/L, reportadas hasta el momento, pero que podrían ser mayores en otras zonas del país. No obstante, no se está tratando de erradicar el problema desde su origen, ya que no se está llevando a cabo la erradicación de malezas ya sea de forma física o química.

Contar con un método estandarizado y validado, permitirá realizar más estudios relacionados con el tema, incluso el monitoreo de la biotoxina en la leche y subproductos lácteos, el involucramiento de aspectos fisiológicos y bioquímicos con respecto a la producción de PTA en helechos y su excreción en leche. Además, se podrá comprender y predecir mejor la aparición de este carcinógeno en el medio ambiente y su exposición a los seres humanos.

A partir de este estudio, se contemplan los primeros hallazgos en relación al contenido de ptaquilósido en dos variedades de helecho, de gran abundancia en Costa

Rica, *P. aquilinum caudatum* var. *caudatum* y *P. esculentum* var. *Arachnoideum*. Se analizó la variabilidad y distribución de la biotoxina en los raquis, frondas y tallos de los helechos, para los que se obtuvieron valores de $(47,9 \pm 1,9)$ mg/kg en raquis, $(32,3 \pm 1,2)$ mg/kg en tallos y $(46,8 \pm 4,1)$ mg/kg en frondas para *P. aquilinum caudatum* var. *caudatum*, y $(119,8 \pm 2,9)$ mg/kg en raquis, $(44,0 \pm 2,0)$ mg/kg en tallos, $(21,4 \pm 3,3)$ mg/kg en frondas para *P. esculentum* var. *Arachnoideum*. De acuerdo con los resultados, *P. arachnoideo* presentó un 60 % más de biotoxina concentrada en los raquis en comparación con la especie *P. caudatum*.

Se sabe que la leche es uno de los alimentos de mayor importancia en el mundo por su gran aporte nutricional, por lo que requiere un estricto control de calidad. Además de su gran demanda alimentaria, es relevante conservar su calidad e inocuidad para mantener la salud pública (Reyes et al., 2011). Considerando que el consumo de leche cruda en Costa Rica puede alcanzar un 40 % en zonas como el occidente del Valle Central del país (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2007), tanto el consumo de leche como la elaboración artesanal de subproductos lácteos, como yogurt y queso, implican un riesgo para la salud si son elaborados a partir de leche contaminada con la biotoxina que no haya sido pasteurizada.

El presente estudio confirmó que la pasteurización contribuye a una disminución de la biotoxina como PTA, así como a la disminución del pH a niveles cercanos a 4 durante la elaboración y almacenamiento de yogurt, ya que el PTA persiste en su forma química natural, pero después de un periodo 7 días en refrigeración a $(2 - 8)$ °C, se encontró una disminución cercana al 100 % por conversión del PTA a PTB en la matriz de yogurt. Otros aportes, como los encontrados durante la elaboración de queso tipo blando a partir de leche bovina cruda, indican que por el desuerado durante la elaboración se puede eliminar hasta un 17 % del PTA; de igual forma se pudo determinar una disminución importante para los quesos con concentraciones medias y altas de PTA, en las que se reportó 45 % y 63 % de disminución, respectivamente, que disminuyó aún más con el tiempo de refrigeración de $(2 - 8)$ °C, hasta el final de su vida útil.

Estos primeros hallazgos sobre la estabilidad y prevalencia de la biotoxina en leche bovina y subproductos lácteos permitirán extremar las medidas de inocuidad alimentaria, así como fomentar el debido tratamiento térmico que, además de eliminar la carga microbiana, favorece la disminución de la biotoxina ptaquilósido, que podría estar presente en la leche utilizada para el consumo directo o la elaboración de productos como yogurt azucarado y queso blando.

CAPÍTULO 9: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

9.1. Conclusiones

- La extracción en agua de helechos *Pteridium* liofilizados y pulverizados, con purificación en poliamida y amberlite®, y la posterior conversión de PTA a PTB, resultó ser una metodología adecuada para la obtención de un extracto concentrado de PTA de 4,69 mg/g.
- La metodología para la obtención del extracto de PTA presentó una buena linealidad, repetibilidad, recuperación y robustez, al igual que la metodología de cuantificación de la biotoxina en leche y subproductos lácteos.
- Mediante MS/MS se identificó la presencia de ptaquilósido y pterosina B en las variedades de *P. aquilinum caudatum* var. *caudatum* y *P. esculentum* var. *Arachnoideum*, por la presencia de picos 398 m/z y 218 m/z [M – Glu] + de PTA, de 219 m/z [M + H] +, y el fragmento ión dominante de PTB a 201 m/z.
- La cuantificación por HPLC permitió determinar que la biotoxina se encuentra presente en los raquis, frondas y tallos del helecho, y que su contenido fue muy variable entre las distintas partes del helecho de cada especie.
- La variedad *P. arachnoideo* presentó mayor contenido de PTA en comparación con la especie *P. caudatum*; sin embargo, esta diferencia es únicamente significativa en los raquis.
- En cuanto al contenido de PTA en diferentes estados fenológicos para la especie *P. aquilinum caudatum* var. *caudatum*, se concluyó que los helechos más jóvenes poseen hasta un 50 % más de PTA que los helechos con mayor desarrollo.
- A partir de la evaluación del efecto del procesamiento, como la pasteurización y elaboración del yogurt, sobre la biotoxina, se determinó que la pasteurización degrada todo el PTA a PTB, y que la cantidad de PTB presente en la leche pasteurizada se degrada hasta la segunda semana de almacenamiento en refrigeración a 8 °C, cuando su consumo ya no es óptimo.
- La preparación de yogurt no altera la estabilidad y prevalencia del PTA presente en la leche contaminada, por lo que un cambio del pH del medio hasta valores cercanos a 4 no degrada el PTA presente; sin embargo, el PTA se convierte

totalmente a PTB después de la primera semana de almacenamiento en refrigeración a 8 °C.

- Los estudios realizados en queso tipo blando mostraron que la cantidad de biotoxina en el queso disminuyó con el tiempo de almacenamiento, sin embargo, es preciso realizar más estudios para estimar la degradación del PTA a PTB durante la elaboración y almacenamiento.
- Los sueros de los quesos con menor contenido de sal presentaron mayor pérdida de biotoxina, lo que implica una menor prevalencia en la red proteica del queso.
- A mayor contenido de sal, habrá menor pérdida de biotoxina en el suero y, podría estimarse, una mayor prevalencia en la matriz del queso.

9.2. Recomendaciones

- Se determinó la presencia de la biotoxina en la leche de origen bovino proveniente de fincas de las zonas de Coto Brus y Zarcero, por lo que se considera importante realizar mayores estudios sobre la evaluación de la presencia y concentración de la biotoxina en leche proveniente de otras fincas ganaderas del país.
- La presencia de biotoxina en la leche implica un potencial riesgo para la salud de los consumidores, por lo que deben tomarse medidas para disminuir los efectos adversos que esto pueda ocasionar. Estas medidas deben contemplar desde la eliminación absoluta del helecho en las zonas de pastoreo del ganado, un monitoreo constante sobre la presencia de la biotoxina en la leche y el establecimiento de límites permitidos de PTA en la leche.
- Realizar inspecciones en las zonas ganaderas y la implementación, verificación y vigilancia de una normativa que regule la presencia de la biotoxina en leche.
- Por otro lado, a raíz de los estudios de procesamiento, se considera primordial la pasteurización de la leche y su correcta manipulación durante el procesamiento y elaboración de subproductos, así como la vigilancia de las fuentes de agua que pueden contaminarse con PTA.

CAPÍTULO 10: BIBLIOGRAFÍA ADICIONAL CITADA

- Alonso-Amelot, M. E., Avendaño, M. (2002). Human carcinogenesis and bracken fern: A review of the evidence. *Current Medicinal Chemistry*, 9, 675–685.
- Alonso-Amelot, M.E., Avendaño, M. (2001). Possible association between gastric cancer and bracken fern in Venezuela: an epidemiologic study. *International Journal of Cancer*, 91, 252–259.
- Alonso-Amelot, M. E., Perez-mena, M., Calcagno, M. P., & Jaimes-Espinoza, R. (1992). Quantitation of Pterosins A and B, and Ptaquiloside, the main carcinogen of *pteridium aquilinum* (L. Kuhn), by high pressure liquid chromatography. *Phytochemical Analysis*, 3 (4), 190-164.
- Borges, J. A., Camacaro, O., & Dominguez, L. (2013). subs . *Arachnoideum* colectado en el municipio Bolívar, estado Yaracuy, Venezuela Bromatological composition of *Pteridium aquilinum* subs. *Arachnoideum* collected in Bolivar municipality, Yaracuy state. *Venezuela Resumen Introducción*, 431–440.
- Calderón, A., Sánchez, L.M., Mancebo, B., Marrero, E., Chiriboga, X., Silva, J. (2014). Residualidad del ptaquilósido en la leche procedente de granjas bovinas en tres cantones de la provincia Bolívar, Ecuador, *Revista Salud Animal*, 36 (1), 19–27.
- El Machich Sociedad de Producción Rural de Responsabilidad Ilimitada. (2000). Restauración forestal en áreas invadidas con helecho *Pteridium aquilinum* Introducción.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). (2015).
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) y Federación Internacional de la Leche (FIL). (2012). Guía de buenas prácticas en explotaciones lecheras. Directrices FAO: Producción y Sanidad Animal No. 8, Roma.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136 (5), 359-386.

- Fischer, W. J., & Ag, S. I. (2011). *Environmental Contaminants*, 898–905.
- Fletcher, M.T., Brock, I.J., Reichmann, K.G., McKenzie, R.A., Blaney, B.J. (2011). Norsesquiterpene glycosides in bracken ferns (*Pteridium esculentum* and *Pteridium aquilinum* subsp. *wightianum*) from Eastern Australia: reassessed poisoning risk to animals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 (9), 5133-5138.
- Francesco, B., Giorgio, B., Rosario, N., Saverio, R. F., Francesco, D. G., Romano, M., ... Sante, R. (2011). A new, very sensitive method of assessment of ptaquiloside, the major bracken carcinogen in the milk of farm animals. *Food Chemistry*, 124 (2), 660–665.
- Fukase, K., Kato, M., Kikuchi, S., et al, (2008). Effect of eradication of *Helicobacter pylori* on incidence of metachronous gastric carcinoma after endoscopic resection of early gastric cancer: an open-label, randomized controlled trial. *The Lancet*, 372 (9636), 372 -392.
- Gil, R. M., Coelho, P., Sousa, R., Bastos, M. M. S. M., Porto, B., Teixeira, J. P., Lopes, C. (2012). Mutation Research /Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis Multiple genotoxic activities of ptaquiloside in human lymphocytes : Aneuploidy, clastogenesis and induction of sister chromatid exchange. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 747 (1), 77–81.
- Gil da Costa, R. M., Bastos, M. M. S. M., Oliveira, P. A., & Lopes, C. (2012). Bracken-associated human and animal health hazards: Chemical, biological and pathological evidence. *Journal of Hazardous Materials*, 203-204, 1–12.
- Gomes, J. N. (2012). Biological effects of *Pteridium aquilinum* and its toxin in gastric carcinogenesis: relationship with *Helicobacter pylori* infection. Faculdade de Medicina da Universidade do Porto - Porto, Université Paris Sud-11 - France.
- Gomes, J., Magalha, A., Amado, F., Aranha, P., Ovesen, R. G., & Hansen, H. C. B. (2012). *Pteridium aquilinum* and Its Ptaquiloside Toxin Induce DNA Damage Response in Gastric Epithelial Cells, a Link with Gastric Carcinogenesis. *Toxicological Sciences*, 126 (1), 60–71.
- Hirayama, T. (1979). Diet and cancer. *Nutrition and Cancer*, 1, 67–81.

- Holm, L., Schmidt, B., & Sheffield, E. (2013). Ptaquiloside in bracken spores from Britain. *Chemosphere*, 90 (10), 2539–2541.
- Kamon, S., Hirayama, T. (1975). Epidemiology of cancer of the esophagus in Miye, Nara and Wakayama prefectures with special reference to the role of bracken fern. *Proc. Japanese Cancer Association*, 34, 211.
- Laks, S., Meyers, M., & Jin Kim, H. (2017). Surveillance for Gastric Cancer. *Surgical Clinics of North America*. 97 (2), 317-331.
- Latorre O., Furlan MS., Sakai M., Fukumasu H., Hueza I.M., Haraguchi M., et al. (2009). Immunomodulatory effects of *Pteridium aquilinum* on natural killer cell activity and select aspects of the cellular immune response of mice. *Journal of Immunotoxicology*, 6 (2), 104-114.
- Marrero, E., Calderón, A. (2012). Plantas tóxicas e inocuidad alimentaria: Hematuria Enzoótica Bovina por *Pteridium spp.* un problema relevante de salud. *Revista Salud Animal*, 34 (3), 137–143.
- Marrs, R. H., & Watt, A. S. (2006). Biological Flora of the British Isles: *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn. *Journal of Ecology*, 94 (6), 1272–1321.
- Miesner, M. D. (2009). Bovine Enzootic Hematuria. En: D. E. Anderson, & D. Rings, Food Animal Practice, St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier. 330
- Ministerio de Agricultura y Ganadería. (2006). Caracterización Agrocadena de Leche, Región Central Oriental. Costa Rica.
- Ministerio de Agricultura y Ganadería. (2007). Enfoque de Agrocadena del Sistema Agroproductivo Lechero de la Región Central Occidental. Alajuela.
- Ramwell, C. T., Beinum, W. Van, Rowbotham, A., Parry, H., Fera, C. R., Rowbotham, A., Parson, S. (2010). Ptaquiloside & other bracken toxins: A preliminary risk assessment. *The Food and Environment Research Agency*.
- Rasmussen, L.H., Jensen, L.S., Hansen, H.C.B., (2003). Distribution of the carcinogenic terpene ptaquiloside in bracken fronds, rhizomes (*Pteridium aquilinum*), and litter in Denmark. *Journal of Chemical Ecology*, 29, 771–778.

- Rasmussen, L. H., Christian, H., Hansen, B., & Lauren, D. (2005). Sorption, degradation and mobility of ptaquiloside, a carcinogenic Bracken (*Pteridium sp.*) constituent, in the soil environment. *Chemosphere*, 58, 823–835.
- Reyes, J.E., García, M.G. & Hernández, L.A. (2011). Aplicación de los conceptos de inocuidad en la producción de leche en Sinaloa. Fundación PRODUCE, SAGARPA, Gobierno del Estado de Sinaloa.
- Riet-Correa F., Medeiros R., Pfister J., Schild AL., Dantas A. (2009) Poisonings by plants, mycotoxins and related substances in Brazilian Livestock. Ed. Sociedade Vicente Pallotti, Patos, Brazil.
- Rosenberger, G., & Heeschen, W. (1960), Dtsch. Tierärztl. Wochenschr, 67, 201–208.
- Sánchez, A. J., & Secaira, G. (2014). Risk by Human Health for Invasion of *Pteridium arachnoideum*, in Bolívar, Ecuador Ptaquiloside's Content in Fronds and in Milk. *International Journal of Applied Science and Technology*, 4 (6), 84–94.
- Solano, C. R. (2008). Efectos de algunas prácticas, solas y combinadas de Helechos *Pteridium aquilinum* en potreros. Guayaquil, Ecuador: Escuela Superior Politécnica del Litoral.
- Vargas-Chavez, S. (2016). Etiología y Epidemiología del Cáncer en Costa Rica. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica LXXIII* (618), 33–36.
- Veterinario SOS. (8 de agosto de 2016). Obtenido de <https://veterinariosos.blogspot.com/2016/08/hematuria-enzootica-bovina-intoxicacion.htm>
- Villalobos-Salazar, J. (1987). Carcinogenicidad del *Pteridium aquilinum* y alta incidencia del cáncer gástrico en Costa Rica. *Abstracts XXIII World Veterinary Congress*, 90.
- Villalobos-Salazar, J., Meneses, J., Rojas, J., Mora, R., & Herrero, M. (1989). Bracken derived carcinogens as affecting animal and human health in Costa Rica. En: Bracken toxicity and carcinogenicity as related to animal and human health. Spec. Publ. Int. Bracken Group. Geography Dep. Univ. College N. Wales.
- Virgilio, A., Sinisi, A., Russo, V., Gerardo, S., Santoro, A., Galeone, A., Roperto, F. (2015). Ptaquiloside, the Major Carcinogen of Bracken Fern, in the Pooled Raw Milk of Healthy Sheep and Goats: An Underestimated, Global Concern of Food Safety.

- Yamada, K., & Kigoshi, H. (2007). Ptaquiloside, the major toxin of bracken, and related terpene glycosides: chemistry, biology and ecology. *Natural Product Reports*, 24 (4), 798–813.
- Youden, W.J.; Steiner, E.H. (1997). Statistical Manual of the Association of Official Analytical Chemists. AOAC International. Maryland USA. 8.
- Zumbado-Gutiérrez, L., & Romero-Zuñiga, J. (2015). Conceptos sobre inocuidad en la producción primaria de la leche. *Revista Ciencias Veterinarias*, 33, 51-66.

APÉNDICE

Resumen de resultados estadísticos

Cuadro 6. Análisis ANOVA y prueba de comparaciones múltiples tukey para estados morfológicos de dos especies de helecho *P. arachnoideo* y *P. caudatum*.

Morfología	Medias	Varianza	Tukey	F	F crítico
Raquis <i>arachnoideo</i>	106,90	502,8187	A	40,9713	2,8524
Raquis <i>caudatum</i>	47,94	3,7011	B		
Fronδας <i>caudatum</i>	46,78	16,4646	B		
Tallos <i>arachnoideo</i>	44,00	11,8745	BC		
Tallos <i>caudatum</i>	28,52	43,9460	BC		
Fronδας <i>arachnoideo</i>	21,63	7,3665	C		

Nota: Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$)

Cuadro 7. Análisis ANOVA para el estudio del efecto de pasteurización y sin pasteurización sobre la concentración inicial de biotoxina en tres niveles de concentración (bajo, medio y alto) en leche bovina.

Térmico	Coef	IC de 95%	Valor T	Valor p
Sin pasteurizar	-0,0243	(-0,03971; -0,00889)	-3,86	0,008
Pasteurizado	0,0243	(0,00889; 0,03971)	3,86	0,008
Nivel bajo biotoxina	-0,15509	(-0,17688; -0,13329)	-17,41	0
Nivel medio biotoxina	0,02264	(0,00085; 0,04444)	2,54	0,044
Nivel alto biotoxina	0,13245	(0,11065; 0,15424)	14,87	0
Sin pasteurizar* C. baja	0,00632	(-0,01547; 0,02811)	0,71	0,505
Sin pasteurizar* C. media	-0,01808	(-0,03988; 0,00371)	-2,03	0,089
Sin pasteurizar* C. alta	0,01176	(-0,01003; 0,03356)	1,32	0,235
Pasteurizada* C. baja	-0,00632	(-0,02811; 0,01547)	-0,71	0,505
Pasteurizada* C. media	0,01808	(-0,00371; 0,03988)	2,03	0,089
Pasteurizada* C. alta	-0,01176	(-0,03356; 0,01003)	-1,32	0,235

Nota: probabilidad estadística significativa ($p < 0,05$)

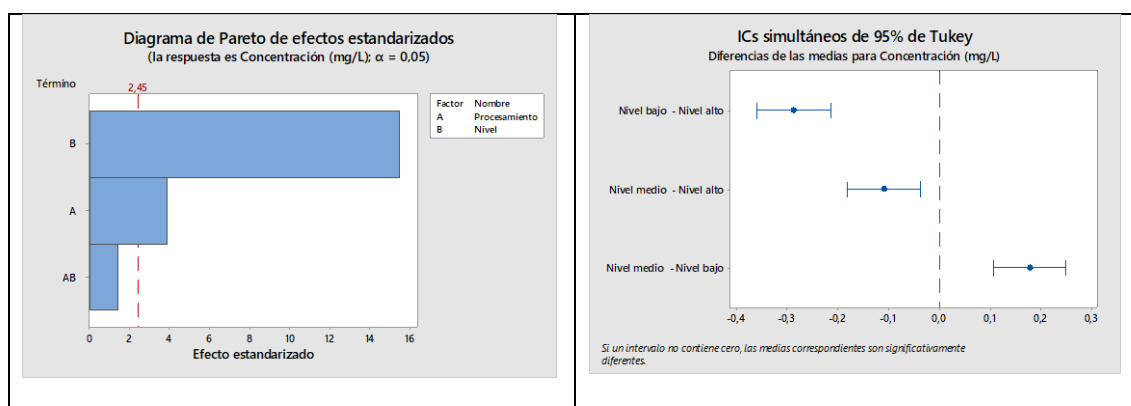


Figura 32. Diagrama de pareto y prueba de comparaciones múltiples tukey para estudio del efecto de sobre la concentración inicial de biotoxina en tres niveles de concentración (bajo, medio y alto) en leche bovina.

Cuadro 8. Resumen análisis estadístico ANOVA para evaluación del efecto de almacenamiento en muestras de leche, yogurt y queso almacenadas contaminadas a tres niveles de concentración de ptaquilósido.

Producto	Término	Suma de cuadrados	F Ratio	Prob > F
Leche	Tiempo de almacenamiento (semanas)	0,14013	13,0663	0,3712
	Nivel PTA	0,16798	7,8313	0,0067
	Tiempo almacenamiento* Nivel PTA	0,02312	1,0777	0,3712
Yogurt	Tiempo de almacenamiento (semanas)	0,03932	6,0854	0,0297
	Nivel PTA	0,03977	3,0772	0,0834
	Tiempo almacenamiento* Nivel PTA	0,01774	1,3732	0,2904
Queso	Tiempo de almacenamiento (semanas)	0,99828	26,3989	<0,0001
	Nivel PTA	2,50424	33,1114	<0,0001
	Tiempo almacenamiento* Nivel PTA	0,27953	3,6960	0,0291
	Concentración de sal	0,00001	0,0016	0,9681
	Tiempo almacenamiento* Concentración de sal	0,01733	0,4584	0,5003
	Nivel PTA* Concentración de sal	0,01416	0,1872	0,8296
	Tiempo almacenamiento*Nivel PTA*Concentración de sal	0,00579	0,0765	0,9264

Nota: probabilidad estadística significativa ($p < 0,05$)

Cuadro 9. Resumen de análisis estadístico ANOVA y Tukey para evaluación de pérdidas de biotoxina en el suero durante la formulación y almacenamiento en tres niveles de concentración de biotoxina y concentración de sal.

Nivel	Media	Tukey	T Radio	Prob < t
SCA 0 % sal, día	0,1783	B	7,01	<0,001
SCA 0 % sal, mes	0,2366	A	14,54	<0,001
SCB 0 % sal, día	0,0612	EF	-8,12	<0,001
SCB 0 % sal, mes	0,1054	CDE	-2,41	0,0367
SCB 1 % sal, mes	0,0873	DEF	-4,75	0,0008
SCB 2 % sal, mes	0,0572	F	-8,64	<0,0001
SCM 0 %, día	0,1070	CD	-2,20	0,0521
SCM 0 %, mes	0,1433	BC	2,49	0,0318
SCM 1 %, mes	0,1569	B	4,24	0,0017
SCM 2 %, mes	0,1073	CD	-3,22	<0,0001

Nota: Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$)

Cuadro 10. Resumen de análisis estadístico t-student para evaluación del procesamiento sobre la estabilidad de la biotoxina en muestras de leche, yogurt, queso y suero.

Producto lácteo	Nivel biotoxina	Antes de procesamiento	Después de procesamiento	t crítico	t calculado
Leche	Bajo	0,185	0,220	4,303	3,789
	Medio	0,338	0,423		9,202
	Alto	0,477	0,503		1,958
Yogurt	Bajo	0,181	0,164		3,272
	Medio	0,356	0,337		0,940
	Alto	0,484	0,360		2,789
Queso	Bajo	0,156	0,280		35,796
	Medio	0,301	0,166		38,971
	Alto	0,569	0,211		62,007
Suero	Bajo	0,156	0,061		82,272
	Medio	0,301	0,107		336,018
	Alto	0,569	0,178		27,089

Nota: probabilidad estadística significativa ($p < 0,05$)