

Trabajo Original

Toxicología Analítica

Heterogeneidad en el contenido de iludanos en *Pteridium aquilinum* subsp. *Caudatum* colectado en el estado Yaracuy, Venezuela.

Jorge A. Borges¹, Luis Domínguez² y Olga Camacaro³

¹Ing. Agrónomo. Oficina de Producción Animal. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, CIAE Yaracuy. Km. 3, Sector La Ermita – Estado Yaracuy, Venezuela. Código postal 3201. Correo: jborges@inia.gob.ve

²Médico Veterinario. Centro de Investigaciones del Estado para la Producción Experimental Agroindustrial. Zona Industrial “Agustín Rivero”, Independencia – Estado Yaracuy, Venezuela.

³Lcda. en Bioanálisis. Asesora externa. Centro de Investigaciones del Estado para la Producción Experimental Agroindustrial. Zona Industrial “Agustín Rivero”, Independencia – Estado Yaracuy, Venezuela.

Resumen

Se estudió la heterogeneidad en los contenidos de dos iludanos sesquiterpénicos, específicamente ptaquilósido (PTA) y caudatósido (CAU), presentes en el helecho *Pteridium aquilinum* subs. *Caudatum*, colectado en el Municipio Bolívar del Estado Yaracuy, Venezuela. Para fines del estudio, se ubicó una unidad de producción bovina situada a 1229 m.s.n.m., donde existe una alta densidad poblacional del helecho en las áreas establecidas como potreros. La recolección de los individuos en segunda etapa fenológica se hizo en transectas de 25 metros de separación. En el laboratorio se separaron y pesaron las pínulas, determinando el porcentaje de materia seca con la pina opuesta del mismo fronde. Para la cuantificación se transformaron los iludanos a sus pterosinas B (PTA) y A (CAU), y posteriormente éstas se cuantifican mediante HPLC. Los resultados indican una gran variabilidad en el contenido de PTA y CAU entre los individuos, con un coeficiente de variación estimado en 56,5 y 51,1, respectivamente. Para PTA los valores oscilaron entre 0,031 – 0,353 mg/g BS, con promedio de 0,178 mg/g BS; mientras que los valores de CAU determinados oscilan entre 0,053 – 0,902 mg/g BS, con promedio de 0,529 mg/g BS, siendo 2,9 veces superior al encontrado para PTA. De las muestras analizadas, 72,7% presentó niveles cuantificables de PTA y 90,9% de CAU, sin evidenciarse correlación entre los contenidos de iludanos encontrados con respecto a los porcentajes de materia seca acumulada en las pinas.

Palabras clave: Ptaquilósido, caudatósido, materia seca, pinas, helecho macho.

Abstract

Heterogeneity in the content of two sesquiterpene illudanes in *P. aquilinum* subsp. *Caudatum* collected in the Yaracuy state, Venezuela.

Heterogeneity was studied in the contents of two sesquiterpene illudanes, specifically ptaquiloside (PTA) and caudatoside (CAU), present in the fern *Pteridium aquilinum* subs. *Caudatum*, collected in Bolivar Township, Yaracuy state, Venezuela. For purposes of the study, a beef production unit situated at 1229 meters as selected, where there is high population density of fern in pastures established areas. The collection of individuals in second phenological stage was done in transects 25 meters apart. In the laboratory the pinnules they were separated and weighed, determining the percentage of dry matter with the opposite pina same frond. For quantifying the transformed illudanes their pterosinas B (PTA) and A (CAU), and then they are quantified by HPLC. The results show great variability in the content of PTA and CAU among individuals, with a coefficient of variation estimated at 56,5 and 51,1, respectively. For PTA values ranged from 0,031 to 0,353 mg/g DM, averaging 0,178 mg/g DM; whereas CAU certain values ranging from 0,053 to 0,902 mg/g DM, averaging 0,529 mg/g DM, being 2,9 times higher than that found for PTA. Of the samples tested, 72,7% had measurable levels of PTA and 90,9% of CAU, no evident correlation between the contents of iludanos found regarding the percentage of dry matter accumulated in pines.

Keywords: Ptaquiloside, caudatoside, dry matter, pines, male fern.

Introducción

En las plantas existe una enorme diversidad bioquímica de compuestos secundarios, fruto, tal vez, de su imposibilidad de huída frente a las agresiones ⁽¹⁾. Tal es el caso del helecho macho (*Pteridium aquilinum* (L.) (Hühn), planta considerada como una de las cinco principales malezas más comunes en el mundo, que afecta profusamente los sistemas intervenidos por la actividad agropecuaria en los cinco continentes ⁽²⁾. Según este mismo autor, en Centro y Suramérica se tienen dos de las doce variedades que existen en el mundo, la *Caudatum* y la *Arachnoideum*.

El helecho macho contiene factores antinutricionales que han sido señalados por investigadores como la principal causa de la Hematuria Enzoótica Bovina, tal es el caso del Ptaquilósido, el cual es un compuesto termoinestable, que se descompone a un segundo derivado químico denominado dienona ⁽²⁾. Este compuesto fue descrito por primera vez por Niwa *et al.*⁽³⁾ y ha sido cuantificado por varios investigadores tanto en la especie *P. aquilinum* ^(4, 5, 6, 7) como en otras especies de helechos ^(8, 9). Además de este compuesto, Castillo *et al.* ⁽¹⁰⁾, lograron aislar dos nuevos iludanos (isoptaquilosido y caudatosido), así como también cuatro pterosinas (A, B, K y Z), presentes en la subs. *Caudatum*.

Los iludanos son sesquiterpenos aislados de algunos hongos y de los géneros de helechos *Hypolepis* y *Pteridium* ⁽¹¹⁾.

Por lo antes expuesto, la finalidad del presente trabajo fue estudiar la heterogeneidad en los contenidos de dos iludanos sesquiterpénicos, específicamente ptaquilósido y caudatócido, presentes en el helecho *P. aquilinum* subs. *Caudatum*, colectado en el Municipio Bolívar del Estado Yaracuy, Venezuela.

Materiales y métodos

Para fines de este estudio, se ubicó una unidad de producción bovina situada a 1229 m.s.n.m., bajo las coordenadas N: 10°22'24" y W: 68°57'30" en el municipio Bolívar del estado Yaracuy, Venezuela, donde existe una alta densidad poblacional del helecho (7 ± 2 individuos/m²) en las áreas establecidas como potreros. El terreno es irregular, con 30° de inclinación y no tiene zonas inundables. Las características físico-químicas del suelo de describen a continuación: textura franco arcillo arenoso (FAa); pH=5,3 (moderadamente ácido); MO= 5,8%; C.E.= 0,063 dS/m⁻¹; macroelementos (mg/kg⁻¹) P= 5,7; K= 227,7; Ca= 311,3; microelementos (mg/kg⁻¹) Zn= 1,6; Cu= 0,7; Fe= 162,8; Mn= 5,5.

La distancia entre cada individuo colectado fue de 25 metros aproximadamente, recolectando un total de 15 muestras completas de frondes pertenecientes a individuos de la segunda etapa fenológica. Las muestras fueron trasladadas en cavas refrigeradas hasta el laboratorio, donde se procedió a clasificarlas según la subespecie correspondiente, mediante la identificación de las pinulas por forma y color, según lo señalado por Alonso-Amelot y Rodulfo-Baechler ⁽¹²⁾; de éstas, sólo 11 muestras (equivalente al 73,3% del total recolectado) correspondieron a la subespecie *Caudatum*, con la cual se trabajó. Las pínulas fueron pesadas en fresco, empleando una balanza digital de precisión 0,0001 g. Se determinó el porcentaje de materia seca de cada pina destinada a la cuantificación, con la pina opuesta del mismo fronde, siendo secadas en estufa de aireación forzada a 65 °C durante 72 horas para obtener el peso seco de las mismas. Para la cuantificación de los iludanos presentes, ptaquilósido (PTA) y caudatósido (CAU), se tomaron muestras del primer par de pinas, realizándose el procedimiento de forma indirecta al transformar los iludanos a sus pterosinas correspondientes (pterósina B y A, respectivamente) y posteriormente éstas se cuantifican mediante HPLC, según el protocolo descrito por Agnew y Lauren ⁽¹³⁾.

A los datos obtenidos se les aplicó estadística descriptiva, prueba de normalidad Shapiro-Wilks modificado (W^*), prueba T y análisis de correlación simple, empleando el software estadístico InfoStat/Profesional v.1.1 ⁽¹⁴⁾.

Resultados

Los resultados encontrados indican una gran variabilidad entre los individuos en cuanto al contenido de los iludanos ptaquilósido y caudatósido, con un coeficiente de variación estimado en 56,5 y 51,1, respectivamente. El estadístico W^* permitió evidenciar la distribución normal de los datos. Entre los datos obtenidos se encontraron diferencias significativas al someter a comparación los valores cuantificados, resultando valores de $p = 0,0016$ y $0,0002$, para PTA y CAU respectivamente, con un nivel de confianza del 95% según la prueba T.

Los contenidos de PTA determinados en las once muestras oscilan entre los valores de $0,031 - 0,353$ mg por cada gramo de biomasa seca de helecho, con un promedio de $0,178 \pm 0,101$ mg/g BS; mientras que los valores de CAU determinados oscilan entre $0,053 - 0,902$ mg/g BS, con un promedio de $0,529 \pm 0,278$ mg/g BS, siendo este valor 2,9 veces superior al encontrado para PTA.

Del total de muestras analizadas, un 72,7% presentó niveles cuantificables de PTA y un 90,9% de CAU, mientras que sólo en una muestra no se detectaron ninguno de estos dos iludanos.

No se encontró correlación entre los contenidos de iludanos encontrados con respecto a los porcentajes de materia seca acumulada, lo que pudiese inferir que estos compuestos no se ven afectados por la acumulación de MS en las pinas; sin embargo, se pudo apreciar que los mayores porcentajes de las observaciones CAU y PTA (70 y 60%, respectivamente) se distribuyeron entre el rango de 15 a 20% de la materia seca (grafico 1).

Discusión

De acuerdo a los resultados analizados en este trabajo, se puede apreciar la alta heterogeneidad en las concentraciones de los iludanos PTA y CAU en frondes de *P. aquilinum*. Alonso-Amelot et al ⁽¹⁵⁾, encontraron concentraciones de ptaquilósido entre 1,98 – 3,9 mg/g BS en rebrotes de la subespecie *Caudatum*, mientras que *Arachnoideum* poseía sólo entre 0,032 y 0,66 mg/g BS. En el "Chaco Húmedo" de Bolivia, Marrero et al. ⁽¹⁶⁾, señalaron contenidos de PTA variables entre 1,495 – 14,703 mg/g BS en esta especie, en locaciones bajo un rango de altitud entre 1990 – 2010 msnm.

En otras especies, como *P. esculentum*, el rango de concentración de PTA varía entre 0,28 – 13,3 mg/gMS ⁽⁹⁾ y hasta 5 mg/gMS en *P. aquilinum* subsp. *Wightianum*, antes *P. revolutum* ⁽⁴⁾, valores considerados muy altos con respecto a los reportados hasta ahora para *P. aquilinum* en Venezuela.

De acuerdo a Alonso-Amelot et al. ⁽¹⁵⁾, las concentraciones de PTA tienden a disminuir conforme avanza el estado fenológico del helecho. Sin embargo, en la subs. *Caudatum* la retención de esta toxina en las frondes maduras representan un mayor riesgo de exposición a los animales bajo pastoreo, llegándose a cuantificar entre 0,479 y 0,334 mg/g BS en frondes adultos ⁽¹⁷⁾. Por lo tanto, el riesgo de consumirlo es mayor mientras más juvenil sea fronde, acentuándose debido a que el tejido del helecho es más tierno y por consiguiente más aceptable al ganado en esas etapas, aunado también a sus sustanciales contenidos nutricionales ⁽¹⁸⁾.

El ptaquilósido es el responsable de causar, no solo carcinogenesis, sino también la degeneración de la retina, en ovinos y la aplasia mieloide, en bovinos ⁽¹⁹⁾. Incluso, si la cantidad de ptaquilósido es suficientemente alta (> 10 g/animal/día en vacas) se llega a provocar un cuadro de intoxicación aguda, muy similar al que ocasiona la sobre-ingestión de helecho macho adulto, que mata el animal en pocas horas ⁽²⁰⁾.

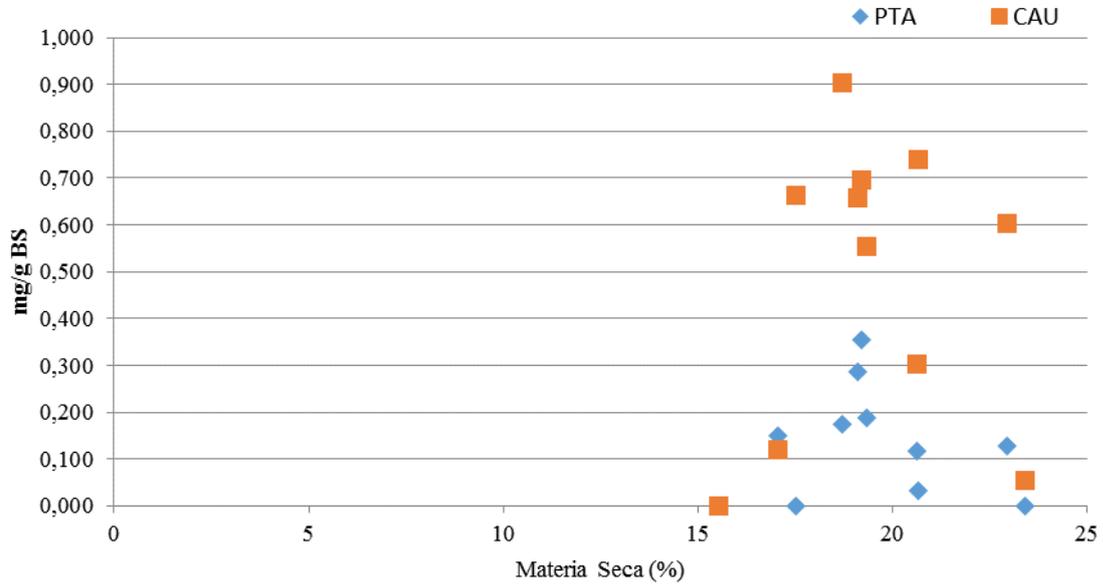
Bajo condiciones de alcalinidad, la pérdida de la glucosa da lugar a la formación de una dienona intermediaria, la cual posee un anillo ciclopropilo altamente reactivo capaz de reaccionar con macromoléculas celulares ⁽²¹⁾. Esto se cree que es la base del mecanismo

carcinogénico de este compuesto, al propiciar la formación y multiplicación de tejido disfuncional o canceroso, originando las profundas lesiones observadas patológicamente en tejidos de bovinos específicos, tales como el esófago y la vejiga (15, 22).

Además del ptaquilósido, se ha descubierto recientemente que éste se acompaña de otros tres compuestos muy parecidos que pueden tener las mismas características de carcinogenicidad de acuerdo a su estructura química. Estos compuestos, llamados isoptaquilósido, caudatósido y ptaquilósido Z están presentes solamente en los cayados recién cortados y luego desaparecen para la segunda etapa fenológica (2). El caudatósido, aislado en el año 1997 por Castillo et al., puede encontrarse en importantes concentraciones, incluso superando al ptaquilósido, en *P. caudatum*, aumentando así el potencial carcinogénico del mismo. De hecho, según los resultados encontrados en el presente trabajo, las concentraciones de CAU casi triplicaron las encontradas para PTA, así como también se encontró en un mayor porcentaje de las muestras estudiadas. En otras especies, como *P. esculentum* y *P. aquilinum* subsp. *Wightianum*, este compuesto se ha encontrado en pequeñas cantidades (23).

A pesar de no haberse encontrado en este trabajo una relación positiva que permitiera definir el comportamiento de estos iludanos con respecto a la acumulación de materia seca en los frondes del helecho, Alonso-Amelot et al. (17), señalan que el contenido de ptaquilósido y otra sustancia relacionada, la pterosina B, va descendiendo desde la primera a la cuarta etapa en *P. aquilinum* subsp. *caudatum*, quedando una cantidad inferior al 5% de la inicial. Esto permitiese inferir que las altas concentraciones encontradas en etapas jóvenes del helecho contribuyen un medio de defensa para evitar el consumo por insectos fitófagos y/o animales herbívoros, mientras que a medida que va envejeciendo, la acumulación de taninos, fenoles y sílice actúan como mecanismos de defensa, haciéndolo menos aceptable al ganado.

Gráfico 1. Distribución de los iludanos, ptaquilósido (PTA) y caudatócido (CAU) de acuerdo al porcentaje de materia seca de las pinas.



Referencias bibliográficas

1. Harborne, J.B. 1993. Introduction to Ecological Biochemistry. Academic Press. London.
2. Alonso-Amelot, M.E. 1999. Helecho macho, salud animal y salud humana. Rev. Fac. Agron. (LUZ), 16: 528-541.
3. Niwa, H., M. Ojiva, K. Wakamatsu, K. Yamada, S. Ohba, Y. Saito, I. Hirono, K. Matsushita. 1983. Stereochemistry of ptaquiloside, a novel norsesquiterpene glucoside from bracken, *Pteridium aquilinum* var. *Latiusculum*. Tetrahedron Lett., 24: 5371-5372.
4. Smith B.L., A. Seawright, J.C. Ng, A.T. Hertle, J.A. Thomson and P.D. Bostock. 1994. Concentration of ptaquiloside, a major carcinogen in bracken fern (*Pteridium* spp.), from eastern Australia and from a cultivated worldwide collection held in Sydney, Australia. Nat Toxins, 2(6): 347-353.
5. Burkhalter, P.W., P.M. Groux, U. Candrian, P. Hubner and J. Luthy. 1996. Isolation, determination and degradation of ptaquiloside - A bracken fern (*Pteridium aquilinum*) carcinogen. Journal of Natural Toxins, 5 (2): 141-159.
6. Dawra, R.K., N.P. Kurade and O.P. Sharma. 2002. Carcinogenicity of the fern *pteridium aquilinum* collected from enzootic bovine haematuria-free hilly area in India. Current Science, 83(8): 1005-1009.
7. Rasmussen, L.H., L.S. Jensen and H.C. Bruun. 2003. Distribution of the carcinogenic terpene ptaquiloside in bracken fronds, rhizomes (*Pteridium aquilinum*), and litter in Denmark. Journal of Chemical Ecology, 29(3): 771-778.
8. Somvanshi, R., D.R. Lauren, B.L. Smith, R.K. Dawra, O.P. Sharma, V.K. Sharma, A.K. Singh and N.K. Gangwar. 2006. Estimation of the fern toxin, ptaquiloside, in certain Indian ferns other than bracken. Current Science, 91 (11): 1547-1552.
9. Rasmussen L.H., D.R. Laurenb, B.L. Smith and H.C.B. Hansend. 2008. Variation in ptaquiloside content in bracken (*Pteridium esculentum* (Forst. f) Cockayne) in New

- Zealand. New Zealand Veterinary Journal, 56 (6): 304-309.
- 10.**Castillo, U.F; A.L. Wilkins, D.R. Lauren, B.L. Smith, N.R. Towers, M.E. Alonso-Amelot. 1997. Isoptaquiloside and caudatoside, illudane-type sesquiterpene glucosides from *Pteridium aquilinum* var. *Caudatum*. *Phytochemistry*, 44(5):901-906.
 - 11.**Weber, D., G. Erosa, O. Sterner and T. Anke. 2006. New bioactive sesquiterpenes from *Repartites metrodii* and *R. tricholoma*. *Z. Naturforsch*, 61c: 663-669.
 - 12.**Alonso-Amelot, M.E. y S. Rodulfo-Baechler. 1996. Comparative spatial distribution, size, biomass and growth rate of two varieties of bracken fern (*Pteridium aquilinum* L. Kuhn) in a neotropical montane habitat. *Vegetatio* 125: 137-147.
 - 13.**Agnew, M. and D. Lauren. 1991. Determination of ptaquiloside in bracken fern (*Pteridium esqueletum*). *Journal of Chromatography*, 538: 426-468.
 - 14.**InfoStat / Profesional v. 2.0. 2002. Universidad Nacional de Córdoba. Estadística y Diseño – FCA.
 - 15.**Alonso-Amelot, M.E., S. Rodulfo-Baechler y R. Jaimes-Espinoza. 1995. Comparative dynamics of ptaquiloside and pterosin B in the two varieties (*caudatum* and *arachnoideum*) of neotropical Bracken Fern (*Pteridium aquilinum* L. Kuhn). *Biochemical Systematics and Ecology*, 23(7-8): 709-716.
 - 16.**Marrero, E., Bulnes C. Sánchez LM, Palenzuela I, Stuart R, Jacobs F, Romero J. 2004. Chronic toxicity in cattle due to *Pteridium aquilinum* (Bracken Fern) in Tarija Department, Bolivia. An interdisciplinary investigation. In: Toxic plants and other Natural toxicants, CABI Publishing UK, Chapter 37: 248-252.
 - 17.**Alonso-Amelot, M.E. U. Castillo y F. De Jongh. 1993. Passage of the bracken fern carcinogen ptaquiloside into bovine milk. *Lait*, 73: 323-332.
 - 18.**Borges, J.A., O. Camacaro, L. Domínguez y A. Graterol. 2013. Composición bromatológica de *Pteridium aquilinum* subs. *Arachnoideum* colectado en el municipio Bolívar, estado Yaracuy, Venezuela. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*., 30: 431-440.
 - 19.**Yamada K, Ojika M, Kigoshi H. Ptaquiloside, the major toxin of bracken, and related terpene glycosides: chemistry, biology and ecology. *Nat. Prod. Rep.*, 24(4): 798-813.
 - 20.**Hirono, I., Y. Kono, K. Takahashi, K. Yamada, H. Niwa, M. Ojika, H. Kigoshi, K.

- Nijjima y Y. Uosaki. 1984. Reproduction of acute bracken poisonin in a calf with ptaquiloside, a bracken constituent. Vet. Record. 115: 375-378.
- 21.** Pereira LO, Bicalho LS, Campos-da-Paz Lopes, M de Sousa TM, Bao SN, de Fatima Menezes Almeida Santos, M.J. Fonseca. 2009. DNA damage and apoptosis induced by *Pteridium aquilinum* aqueous extract in the oral cell lines HSG and OSCC-3. J. Oral Pathol. Med., 38(5):441-447.
- 22.** Smith, B.L. 1997. The toxicity of Bracken fern (genus *Pteridium*) to animals and its relevance to man. In: D'Mello, J.P.F. (ed.) Handbook of Plant and Fungal Toxicants. CRC Press Inc., Boca Raton, pp. 63-76.
- 23.** Fletcher, M.T., Brock IJ, Reichmann KG, McKenzie RA, Blaney BJ. 2011. Norsesquiterpene glycosides in bracken ferns (*Pteridium esculentum* and *Pteridium aquilinum* subsp. *wightianum*) from Eastern Australia: reassessed poisoning risk to animals. J. Agric. Food Chem., 59(9): 5133-5138.

Recibido: 31/10/14

Aceptado: 10/11/14