



UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLIVAR

Formulario para la Presentación de Proyectos de Investigación Científica, Desarrollo Tecnológico e Innovación

Formulario tomado de la Secretaría Nacional de Educación Superior Ciencia y Tecnología - SENESCYT



A. DATOS GENERALES DEL PROYECTO

TIPOLOGÍA		
Investigación Básica	<input type="checkbox"/>	
Investigación Aplicada	<input checked="" type="checkbox"/>	
Desarrollo Tecnológico	<input checked="" type="checkbox"/>	

TÍTULO
Obtención de Pterosina B, en <i>Pteridium arachnoideum</i> como patrón para la determinación del tóxico carcinogénico (ptaquilósido) en diferentes matrices como control de calidad alimentaria.

ÁREA TEMÁTICA DE I+D EN EL QUE TENDRÁ IMPACTO EL PROYECTO		
GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA	Conservación, mejoramiento y propagación de especies vegetales de interés local, regional y nacional	
	Mejoramiento genético de variedades de interés comercial, medicinal, artesanal, nutricional y forestal	
	Caracterización genética del ganado	
	Caracterización de plantas y principios activos	X
	Identificación de metabolitos secundarios de plantas, hongos y bacterias	X
	Aplicación de organismos y/o productos generados, en el mejoramiento de suelos, alimentos y agua.	
	Caracterización botánica de especies endémicas y de la región.	
	Aplicación de organismos y/o productos generados, en el mejoramiento de suelos, alimentos y agua.	
GESTION EN SALUD	Atención primaria en salud	
	Talento humano (formación del talento humano en salud y enfermería)	
	Calidad del cuidado de enfermería	
	Participación Social	
ENFERMEDADES PREVALENTES TRANSMISIBLES Y NO TRANSMISIBLES	VIH y Tuberculosis	
	Alteraciones de la nutrición	
	Patologías maternas y neonatales	
	Enfermedades tropicales	
	Alteraciones en la salud mental	
SALUD ANIMAL	Enfermedades transmisibles y no transmisibles en relación a aspectos epidemiológicos, manejo clínico, diagnóstico y tratamiento.	
	Caracterización, manejo y conservación de ecosistemas	
BIODIVERSIDAD Y PATRIMONIO NATURAL		
HIDROLOGÍA	Hidrología/ Hidráulica, Distribución de precipitaciones, periodos de retorno	
RIESGOS Y CATÁSTROFES	Prevención de Riesgos/Catástrofes, vulnerabilidad a diferentes tipos de fenómenos naturales. Meteorología, Vulcanología y sismología	
AGROPECUARIAS	Seguridad y Soberanía Alimentaria	X
	Mejoramiento genético; pastos y forrajes; incremento de la producción pecuaria.	
AGROINDUSTRIA	Potenciamiento del desarrollo de técnicas y tecnologías Agroindustriales	
BIOMASA	Valorización de la Biomasa residual, con fines de utilización energética, industrial y agrícola	
ACUICULTURA	Estudios de sistemas acuícolas	
TECNOLOGÍAS DE LA INFORMACIÓN Y COMUNICACIÓN (TIC'S)	Software para procesos de gestión y administración pública y privada	
	Conectividad y telecomunicaciones en la sociedad de la información y el conocimiento.	
	Aplicaciones de geo informática	
ADMINISTRACIÓN	Economía popular y solidaria: creación de emprendimientos sustentables	



UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLIVAR

Formulario para la Presentación de Proyectos de Investigación Científica, Desarrollo Tecnológico e Innovación

(Formulario tomado de la Secretaría Nacional de Educación Superior Ciencia y Tecnología - SENESCYT)



N	Modelos económico administrativos en el desarrollo y crecimiento de las PYMES	
GESTIÓN EMPRESARIAL	Modelos de gestión administrativa en el sector público y privado en el campo turístico y hostelero, en zonas y áreas de riqueza paleontológica, arqueológica, antropológica	
	Estrategias administrativas de gestión social en los GADS parroquiales.	
	Mecanismos de desempeño para la preservación de las expresiones culturales	
	Patrimonio artesanal de aprovechamiento turístico	
EDUCACIÓN Y CONOCIMIENTO	Diversidad del aprendizaje - enseñanza	
	Correlaciones educativas en los procesos de generación de saberes y técnicas ancestrales.	
	Ambientes y estrategias de enseñanza - aprendizaje a grupos de vulnerabilidad social y económica	
	Pedagogía y Didáctica intercultural en contextos urbanos y rurales para la educación alternativa	
INTERCULTURALIDAD	Saberes	
	Aprendizaje intercultural y diálogo de saberes.	
	Comunicación intercultural en escenarios de identidad social	
	Modelos de estudios ancestrales e interculturales	
DERECHOS Y GARANTIAS DEL BUEN VIVIR	Tecnología y practica ancestral en la formación	
	Participación y organización del poder.	
	Derechos de naturaleza, humanos y biodiversidad	

TIEMPO DE EJECUCIÓN DEL PROYECTO

Duración del proyecto en meses

12 meses

FINACIAMIENTO DEL PROYECTO

Monto total del financiamiento proyecto

\$ 26 000 USD (Veinte y seis mil dólares) financiados por el Instituto de Investigación de la Universidad Estatal de Bolívar.



UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLIVAR

Formulario para la Presentación de Proyectos de Investigación Científica, Desarrollo Tecnológico e Innovación

(Formulario tomado de la Secretaría Nacional de Educación Superior Ciencia y Tecnología - SENESCYT)



B. LOCALIZACIÓN GEOGRÁFICA DEL PROYECTO

COBERTURA DE EJECUCIÓN DEL PROYECTO

(Seleccione sólo un tipo de cobertura)

Nacional

Zona 1 (Carchi, Esmeraldas,

Imbabura y Sucumbíos)

Zona 2 (Napo, Orellana y

Pichincha)

Zona 3 (Chimborazo,

Cotopaxi, Pastaza y

Tungurahua)

Zona 4 (Manabí, Sto.

Domingo de los Tsáchilas)

Zona 5 (Bolívar, Guayas, Los

Ríos y Santa Elena)

Zonas de Planificación

Zona 6 (Azuay, Cañar y

Morona Santiago)

Zona 7 (El Oro, Loja y

Zamora Chinchipe)

Zona 8 (Cantones Guayaquil,

Samborondón, Durán)

Zona 9 (Distrito

Metropolitano de Quito)

Provincial

Provincia Bolívar

Local

San Miguel (zonas ganaderas)

C. DATOS DE LA INSTITUCIÓN EJECUTORA

Universidad Estatal de Bolívar

Representante Legal

Ing. Diómedez
Núñez Minaya

Cédula de
Identidad

0200506764

Fax

Ej.: 08-2769812

Correo

dnunez@ueb.edu.ec

Teléfonos

032206010

Electrónico

Dirección

Av. Ernesto Che Guevara, S/N, Av. Gabriel Secaira, Guaranda

Página Web

www.ueb.edu.ec

Institucional

Órgano
Ejecutor

Facultad de Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y del Ambiente, Escuela de
Medicina Veterinaria y Zootecnia.

D.



UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLIVAR

Formulario para la Presentación de Proyectos de Investigación Científica, Desarrollo Tecnológico e Innovación

Formulario tomado de la Secretaría Nacional de Educación Superior Ciencia y Tecnología - SENESCYT



E. PERSONAL CIENTÍFICO-TÉCNICO DEL PROYECTO

PERSONAL DEL PROYECTO				
FUNCIÓN	CÉDULA DE IDENTIDAD	NOMBRE COMPLETO	FACULTAD A LA QUE PERTENECE	TELÉFONO FIJO, CELULAR Y CORREO ELECTRÓNICO
Director del Proyecto	1709791345	<i>Angela del Rocío Calderón Tobar</i> <i>PhD. Ciencia Veterinarias, especialidad Toxicología V.</i>	Facultad de Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y del Ambiente.	032206043 0994962320 acalderon@ueb.edu.ec
Director Subrogante	1102444484	<i>Augusta Jiménez Sánchez</i> <i>(MSc. Manejo Integral de Laboratorios de Desarrollo).</i>	<i>Instituto de Investigación de la Universidad Estatal de Bolívar.</i>	0990796788 0984365042 ajimenez@ueb.edu.ec
Investigador 1	0600869036	Clemencia Oderay Merino Peñafiel (Dra. Química).	<i>Facultad de Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y del Ambiente.</i>	032306379 032206695 0998945668 cmerino@ueb.edu.ec
Investigador 2				
Técnico de Laboratorio				



UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLIVAR

Formulario para la Presentación de Proyectos de Investigación Científica, Desarrollo Tecnológico e Innovación

(Formulario tomado de la Secretaría Nacional de Educación Superior Ciencia y Tecnología - SENESCYT)



F. RESUMEN EJECUTIVO

El género *Pteridium* representa una amenaza potencial para el mundo por su carácter invasivo y por la característica del género de constituir la única fuente actual de un compuesto carcinogénico natural que está asociado con la presencia de la enfermedad Hematuria Enzoótica Bovina en los diferentes continentes.

Ecuador ha reportado recientemente la incidencia de esta enfermedad y la elevada presencia del helecho *Pteridium arachnoideum* (+ del 80 %) que poseen las áreas de pastoreo, lo que influye en la salud animal con la aparición de cáncer de vejiga en el ganado y traducido en la cadena alimentaria a la aparición de cáncer de estómago en la población humana que hacen consumo de leche y carne de animales enfermos. El presente proyecto se basa en la necesidad inminente para el Ecuador de contar con un patrón de Pterosina B que permita la cuantificación del ptaquilósido (tóxico carcinogénico) como parte del control de calidad de la leche fresca de las áreas invadidas con la planta, así como proveniente de animales aparentemente sanos. La inexistencia comercial de este patrón, hace imprescindible la ejecución de esta investigación con el propósito de obtener la Pterosina B, en *Pteridium arachnoideum* como patrón para la determinación del tóxico carcinogénico (ptaquilósido) en diferentes matrices como control de calidad alimentaria, para su comercialización a laboratorios de normalización de la calidad de los alimentos que estén indexados al INEN y otros; así como también, la incorporación en el sistema de calidad de estos alimentos para que se garantice su inocuidad y sean considerados productos aptos para el consumo humano y se asegure la calidad alimentaria de la población humana.

Por otro lado, complementando este objetivo se realizará la estandarización y validación de la técnica analítica por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR o HPLC) para la cuantificación del fitotóxico (Ptaquilósido) en las diferentes matrices que posibiliten dar servicio a la población. Para lograr el objetivo planteado se procederá a establecer metodologías factibles económicamente para la extracción, purificación del patrón y para la validación de la técnica, según regulaciones nacionales e internacionales a tal efecto. Como resultado del proyecto se contará con un producto comercializable y con posibilidades de patentar el método de obtención, se podrá valorar la factibilidad posterior de transferir la tecnología a Empresas de manufactura de Químicos en el Ecuador; además, se contará con la ficha de costo de la producción del patrón y de la metodología analítica para el servicio a la población involucrada, basados en que la Universidad contará con el equipamiento necesario para la realización del objetivo propuesto en el presente proyecto.



UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLIVAR

Formulario para la Presentación de Proyectos de Investigación Científica, Desarrollo Tecnológico e Innovación

Formulario tomado de la Secretaría Nacional de Educación Superior Ciencia y Tecnología - SENESCYT



G. DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL PROYECTO

LÍNEA BASE DEL PROYECTO

El género *Pteridium* es de los de mayor distribución en el planeta y se ha comprobado que es la más intensiva y globalmente extensiva de todas las plantas, se encuentra en los cinco continentes, tanto en zonas templadas como tropicales y desde el nivel del mar hasta altitudes que superan los 3000 m. (1,2). Es una planta perenne que persiste por los rizomas. Tradicionalmente, se ha considerado al helecho macho como una especie singular: *Pteridium aquilinum* pero con diferentes subespecies y variedades reconocidas. En el hemisferio norte se reconocen las subespecies *aquilinum*, *descompositum*, *pubescens*, *feei*, *latiusculum*, *wrightianum*, *pseudocaudatum* y *africanum*. (3). En el hemisferio sur existen las subespecies *caudatum*, *arachnoideum*, *revolutum*, *yarrabense* y *esculentum*. En todas las subespecies y variedades se ha reportado la toxicidad de la toxina ptaquilósido (4).

El análisis de la información sobre el carácter invasivo de esta especie vegetal a nivel mundial, nos permite aseverar que el *Pteridium aquilinum* se ha convertido en un problema ecológico grave que se acentúa por malas políticas de manejo de la vegetación, del uso indiscriminado de las zonas boscosas para el silvopastoreo y el abandono de actividades de atención y mantenimiento a las comunidades herbáceas en general. (5).

El helecho macho (*Pteridium sp*) posee diferentes agentes venenosos: algunos glicósidos cianogénicos; factores o agentes de carácter antitiaminicos y factores de actividad carcinogénica (ptaquilósido). Por lo que puede dar lugar a efectos tóxicos y envenamiento en rumiantes (ganado bovino, ovino-caprino) y en no rumiantes (equinos, porcino, ratas, ratones, otros). (6). Esta especie vegetal que presenta una acción alelopática sobre la flora nativa del lugar y ocupando una alta dominancia en la misma, por su alto contenido de proteínas es una planta palatable por el ganado el que hace consumo de la misma (7).

La afectación en el ganado por esta especie está dada por la presencia en el vegetal de altas dosis de su principio fitotóxico: ptaquilósido (10 a 30 g tóxico/ kg de planta). Este elemento se considera un carcinógeno directo, dando lugar a la formación de dienona en el organismo a pH básico como producto intermediario y principio tóxico que forma un aducto con el DNA de forma irreversible, lo que está vinculado con la aparición de tumores a nivel de vejiga y esófago en el ganado con Hematuria Enzoótica (HEB) y posterior aparición de poblaciones humanas de riesgo de presentar cáncer gástrico por el consumo de leche y carne provenientes de animales enfermos, las que se encuentran con altos contenidos residuales del carcinógeno natural ptaquilósido.(3, 8, 9, 10, 11). La hematuria enzoótica bovina (HEB) es una enfermedad de curso crónico que se presenta en el ganado vacuno, reportada por diferentes países a nivel mundial, dada la invasión en zonas de pastoreo de la especie vegetal *Pteridium sp* (6, 12).

El ptaquilósido norsesquiterpénico presente en *Pteridium sp* es el acusante de las lesiones tumorales de carácter maligno que se producen en los animales, debido a la propiedad carcinogénica que estos poseen (13). La HEB posee un gran impacto económico, en Colombia se calcula que 30.000 cabezas de ganado en edades productivas tienen que ser sacrificadas anualmente, por lo que dejan de producir 24,5 millones de litros de leche, que se traduce en pérdidas económicas superiores a los 6 millones de dólares. (14). Bolivia con pérdidas anuales estimadas en \$2.000,000 USD. Otros países de Latinoamérica también reportan el impacto negativo para el desarrollo ganadero debido a esta intoxicación (15, 16, 17, 18). Casos de intoxicación por *P. aquilinum*; también, se reportan en países industrializados en diferentes confines del planeta, por ejemplo, en Inglaterra, Alemania, Islas Azores, Portugal, ente otros, (19, 20, 21, 22).

En Europa se reporta efectos tóxicos con el género *Pteridium* en Australia, Nueva Zelanda, Reino Unido, Dinamarca, Italia, observándose una dependencia directa de la concentración del tóxico con la altitud; con riesgo al ser humano tanto por el consumo de carne y leche contaminadas con la fitotoxina, así como a través de las esporas en personas que trabajan en los bosques y existe la especie como contaminantes. (8, 23). En Asia, se conoce que los pobladores de Japón consumen los crosiers (frondes jóvenes) en conservas (24) con tratamientos previos con agua hirviendo o soda, para la reducción de la carcinogenicidad del helecho; sin embargo, existe una mayor prevalencia de carcinoma en el tracto digestivo superior, principalmente en esófago y estómago por el consumo de frondes (24, 25).

En América Latina, se reporta la especie en diferentes países: Venezuela, Costa Rica, Brasil, Bolivia, Ecuador. Por ejemplo, en Costa Rica se ha observado mayor presencia de cáncer gástrico en humanos, en lugares donde existe una alta prevalencia de Hematuria Enzoótica Bovina. Trabajos realizados por un equipo de investigadores en Bolivia en el año 1999 caracterizaron esta enfermedad y la alta invasión de la subespecies *caudatum* y *arachnoideum* (26, 27, 28, 29).

Reportes de residualidad de ptaquilósido en leche, Venezuela y Costa Rica demuestran que se observa en la leche un 8.6% del ptaquilósido consumido en experimento con bovinos. Así como en otros alimentos como carne, se ha comprobado que después del calentamiento de la misma por 3 horas conserva una alta concentración del tóxico. (30).

Uno de los recursos económicos más importantes de Ecuador es la ganadería, no sólo como fuente de alimento sino también como fuente de trabajo para la población que se desarrolla, sobre todo, en los pisos medios de la Sierra. Se trata de una ganadería semiextensiva. Además, de ser uno de los sectores más dinámicos dentro de la producción agropecuaria. La mayor proporción corresponde a la ganadería bovina, tanto de carne como de leche, a tal punto que los ganaderos exhiben como insignia el hecho de que el país ahorra \$500 millones anuales al no tener que importar el producto. El gerente de la Asociación de Ganaderos de la Sierra y el Oriente (31), Juan Pablo Grijalva, subraya que el sector da trabajo directo a más de 1 500 000 ecuatorianos y que la producción nacional es de 3 525 027 litros diarios, para el consumo nacional. La ganadería de leche es para el pequeño productor la única fuente estable de ingresos, sobre todo en los sectores marginales, en donde el hombre de campo es dueño de hatos que producen hasta 50 litros por día.

Sin embargo, en Ecuador no existían reportes documentados de la existencia de Hematuria Enzoótica Bovina. Calderón *et al.* (12) Realizan el primer reporte considerando los signos clínicos y pruebas de laboratorio y la realización de un estudio preliminar epizootiológico, en el Cantón de San Miguel, Provincia Bolívar, donde se demuestra que la mortalidad asociada a la hematuria solo ocurrió en presencia de la especie *Pteridium arachnoideum* y una tendencia ($P < 0,1$) a presentar un alto Odds ratio (13) entre la presencia del helecho y los signos clínicos. Se demostró en estudios botánicos previos que en el Ecuador solo existe la especie *Pteridium arachnoideum*. (32). A todo lo dicho anteriormente, se une otro aspecto de extrema importancia; es el asociado a la eliminación del ptaquilósido presente en la leche de las vacas intoxicadas (33), sobre todo en la forma subclínica, donde no se aprecia aun signos clínicos; este hecho pone en riesgo a los consumidores de contraer cáncer gástrico por sus altos contenidos de residuales del tóxico. (10, 11, 15, 34, 35, 36). Dado los antecedentes, el consumo de leche en la población adulta y fundamentalmente infantil en zonas donde se presenta la Hematuria Enzoótica Bovina es un factor de riesgo en la aparición de cáncer gástrico, (8).

Considerando que el modo de acción toxicológico de este carcinógeno natural es a través de su conversión a una dienedona (producto intermediario) el cual se une al DNA para formar el aducto y la poca estabilidad del ptaquilósido (Figura 1). Este compuesto tóxico es posible determinarlo en las plantas, suelos, fluidos biológicos, carnes, agua, otras, a través de su compuesto estable Pterosina B. (37).

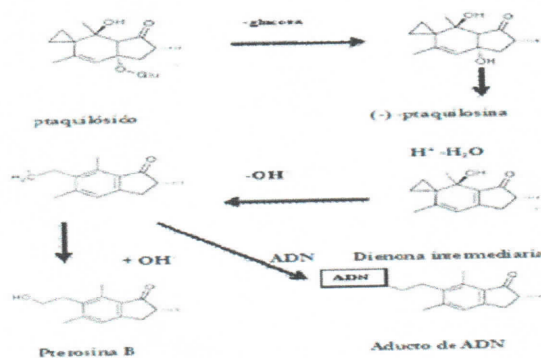


Figura1: Esquema de la Biotransformación del tóxico carcinogénico Ptaquilósido (Fuente: Smith, 1997)



UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLIVAR

Formulario para la Presentación de Proyectos de Investigación Científica, Desarrollo Tecnológico e Innovación

Formulario tomado de la Secretaría Nacional de Educación Superior Ciencia y Tecnología – SENESCYT



DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Problema de Investigación: Se manifiesta como problema científico a esta problemática la no disponibilidad comercial del patrón Pterosina B para la determinación del Ptaquilósido, fitotóxico carcinogénico que pone en riesgo a los consumidores de leche, carne, derivados y agua, de contraer cáncer gástrico en los humanos por no ser inocuos y que garanticen la seguridad alimentaria de la población a nivel nacional.

En todos los estudios realizados a nivel mundial, el patrón Pterosina B se obtiene por los especialistas que trabajan en la caracterización cuantitativa del tóxico. Aún países tan desarrollados como Italia, que recién concluyen y publican un nuevo método de determinación del tóxico, emplearon en las determinaciones y en la preparación del patrón Pterosina B – bromuro de sodio deuterado, fuente de plantas de la región (38).

A pesar que CAS suppliers (39) plantea la venta de este patrón de Pterosina B, no es posible el acceso al mismo en cantidades suficientes, además, de que la literatura al respecto no asigna precio al mismo, por lo que es un problema no resuelto la adquisición de patrón Pterosina B para asumir los trabajos de determinación del ptaquilósido residual en diferentes matrices que garanticen asumir el control de la calidad de estos productos que asegure consumir alimentos inocuos a la población.

Justificación de la Investigación: Con el desarrollo, tanto intensivo como extensivo de la ganadería, con énfasis en la especie bovina, aunque incluye a otras especies animales, no siempre se ha considerado determinados aspectos importantes que pueden condicionar posteriormente la presentación de intoxicaciones, tales como la flora primitiva de la región, las características del suelo, el clima regional, entre otros factores, y se establecen crianzas de animales, las cuales pueden estar afectadas por la invasión de especies vegetales indeseables, contentivas de sustancias dañinas y que, además, con frecuencia, pueden resultar resistentes al medio y llegan incluso a vencer a los cultivos beneficiosos (40, 41, 42).

Por otra parte, muchos compuestos químicos que se encuentran presentes en las plantas pueden afectar la salud humana por su ingestión a través de la cadena alimentaria, al consumir productos procedentes de animales, carne, leche y sus derivados, por lo que resulta un aspecto de vital importancia a tener en cuenta en la calidad de estos alimentos (43, 44).

En este orden de ideas se ha reportado la invasión de helechos tóxicos correspondiente a la especie *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn o bracken fern que afecta negativamente la crianza animal vacuna en diferentes regiones ganaderas del mundo y en particular de América Latina (12, 17, 42, 44, 45, 46), de ahí que los animales que consumen la planta resultan intoxicados de forma aguda o crónica en dependencia de la exposición al tóxico (13).

En la Provincia Bolívar, estudios recientes demuestran que en fincas ganaderas de los Cantones de Chimbo, San Miguel y Echeandía existe la presencia (60-100%) de helechos *Pteridium arachnoideum* en las zonas de pastoreo (11, 12). Se conoce también que esta problemática invasiva del *Pteridium arachnoideum* es extensiva a otras regiones del Ecuador (29, 32).

La magnitud del problema de la gran distribución de la planta tóxica asociada a la HEB, en diferentes regiones del mundo, representa serias afectaciones al desarrollo de la ganadería vacuna y con alcance a los consumidores en la cadena alimentaria (17, 18).

Una asociación entre el consumo de helechos y el cáncer en los seres humanos ha sido previamente demostrada (47). Las principales vías de exposición incluyen la ingestión como alimento de los helechos frescos (retoños), beber leche o agua contaminada con Ptaquilósido y la inhalación de aire que contiene las esporas de helechos. Estas exposiciones pueden llevar a un aumento de la incidencia de cáncer gástrico y de esófago en los seres humanos (36). Se ha encontrado que aproximadamente el 9% de Pt contenido en helechos que son consumidos por las vacas se transfiere a la leche (36). Además, Ptaquilósido se transfiere de la vegetación de helechos al suelo adyacente y a las aguas subterráneas y así contaminar el agua potable (25, 44).



UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLIVAR

Formulario para la Presentación de Proyectos de Investigación Científica, Desarrollo Tecnológico e Innovación

Formulario tomado de la Secretaría Nacional de Educación Superior Ciencia y Tecnología - SENESCYT



Se considera al Ptaquilósido como el causante de tumores malignos en los animales de granja y también en los humanos (43, 48, 49). El tóxico ptaquilósido es carcinogénico de acción directa que pone en riesgo al consumidor por consumir alimentos provenientes de animales intoxicados con Hematuria Enzootica Bovina (12, 42, 50).

El Comité Británico de Toxicidad de Químicos en Alimentos, Productos de Consumo y el Ambiente (COT), ha declarado al ptaquilósido como un agente carcinógeno potencial para los humanos a todos los niveles de ingestión (51). Sin embargo en el Ecuador no existe en las normas INEN 9-2008 para la leche y carne cruda, NTE INEN 1338 (2012) la regulación de este compuesto tóxico como residual en los productos cárnicos, lácteos e inclusive el agua (NTE INEN 1108), (52), por lo que existe la necesidad de que se conozca esta problemática del Ptaquilósido y se cree e implemente una norma de control de calidad de residuales fitotóxicos como el Ptaquilósido para garantizar la inocuidad de los alimentos y sean aptos para el consumo humano.

Varios estudios han documentado sus efectos genotóxicos como mutagénicos y clastogénicos del Ptaquilósido que actúa como agente alquilante de la molécula de ADN (53, 54, 55, 56, 57).

Otros autores han evidenciado los efectos citogenéticos como resultado de la inducción de aberraciones cromosómicas en animales afectados, luego del consumo reiterado de esta planta (58, 59, 60). También estudios recientes describen el efecto clastogénico, aneugénico e inductor de intercambio de cromátidas hermanas en linfocitos humanos a dosis de 5, 10 y 20 µg/mL (61).

*En la Provincia Bolívar, estudios recientes demuestran que en fincas ganaderas de los Cantones de Chimbo, San Miguel y Echeandía existe la presencia (60-100%) de helechos *Pteridium arachnoideum* en las zonas de pastoreo y la leche contiene niveles altos de residualidad de Ptaquilósido (10, 11). Se conoce también que esta problemática invasiva del *Pteridium arachnoideum* es extensiva a otras regiones del Ecuador (29, 32).*

*Considerando estos aspectos el presente proyecto se traza como objetivo general, obtener la Pterosina B en *Pteridium arachnoideum* como patrón para la determinación del tóxico carcinogénico (ptaquilósido) en diferentes matrices, en un laboratorio asignado a este fin por parte de la Universidad Estatal de Bolívar que garantice su obtención, formación y purificación para su posterior venta a empresas de regulación alimentaria que incluyan la detección de este metabolito secundario como parte del control de calidad para garantizar la inocuidad de los alimentos que consume la población local y/o nacional.*

Además, aprovechando los recursos y la asignación de un equipo de HPLC por parte de la Universidad, como complemento del objetivo general, se realizará la estandarización y validación de un método de análisis químico mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR o HPLC) para la cuantificación del tóxico en diferentes matrices, que permitan una vez concluido el proyecto brindar servicios en la Provincia Bolívar y/o a nivel nacional. Lo cual no está disponible en el país hasta el momento.



UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLIVAR

Formulario para la Presentación de Proyectos de Investigación Científica, Desarrollo Tecnológico e Innovación

Formulario tomado de la Secretaría Nacional de Educación Superior Ciencia y Tecnología - SENESCYT



METODOLOGÍA

I: Extraer y Purificar la Pterosina B.

Extraer el Ptaquilósido y formar la Pterosina B: Se empleará la metodología de Agnew y Lauren (62) de marcha fitoquímica de extracción del ptaquilósido de su fuente vegetal de origen, *Pteridium arachnoideum*, para lo cual el material vegetal será sometido a extracción con agua y posterior separación con solventes orgánicos. Se procederá a la conversión del ptaquilósido en Pterosina B mediante reacciones en medio básico y posterior ácido. Se separará del resto de los constituyentes de la planta.

Purificar la Pterosina B

Se someterá a procesos de purificación por pasaje por Cromatografía de columna a vacío empleando sílica como soporte u adsorbente, Cromatografía de Placa Delgada Preparativa, cristalizaciones sucesivas y Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Se comprobará la pureza del patrón así obtenido por HPLC analítica y determinación de punto de fusión u otros marcadores de propiedades químicas y físicas de este compuesto.

II: Estandarizar y validar el método

Estandarizar y validar del método de análisis de ptaquilósido en leche y agua por CLAR o HPLC:

Se aprovechará el equipamiento del proyecto para proceder a la estandarización del método químico de análisis por CLAR del ptaquilósido, así como la de poseer el patrón de pureza adecuada para técnicas analíticas, obtenido en el acápite anterior.

En este acápite se empleará la metodología descrita en la literatura y por los organismos nacionales e internacionales en materia de validación de técnicas analíticas: procedimiento de calibración para muestras de leche y agua, linealidad, reproducibilidad, límite de detección y límite de cuantificación, así como el recobrado del analito. En esta se emplearán leche fresca de animales sanos y agua potable, no sometidos a la acción y presencia de la contaminación de las zonas de pastos con *Pteridium arachnoideum* (denominadas leches controles negativas y aguas controles negativas).

Estimar la concentración del Ptaquilósido mediante la Pterosina B en leche fresca bovina por la técnica de CLAR o HPLC.

Las muestras de leche serán tomadas al azar de zonas previamente seleccionadas donde exista una mayor presencia del helecho *Pteridium arachnoideum* y que los animales tengan o no las manifestaciones clínicas de Hematuria Enzoótica Bovina (HEB), también se tomarán de zonas con ausencia del helecho.

Estimar la concentración del Ptaquilósido mediante la Pterosina B en agua por la técnica de CLAR o HPLC.

Las muestras de agua serán tomadas de fuentes de zonas previamente seleccionadas donde exista una mayor presencia del helecho *Pteridium arachnoideum*, así como también de zonas con ausencia del helecho.

III.- Obtener a nivel piloto la extracción de la Pterosina B con fines comerciales

Extraer el Ptaquilósido y formar la Pterosina B

Se empleará la metodología de Agnew y Lauren (62) de marcha fitoquímica de extracción del ptaquilósido de su fuente vegetal de origen, *Pteridium arachnoideum*, para lo cual el material vegetal será sometido a extracción con agua y posterior separación con solventes orgánicos. Se procederá a la conversión del ptaquilósido en Pterosina B mediante reacciones en medio básico y posterior ácido. Se separará del resto de los constituyentes de la planta.

Purificar la Pterosina B

Se someterá a procesos de purificación por pasaje por Cromatografía de columna a vacío empleando sílica como soporte u adsorbente, Cromatografía de Placa Delgada Preparativa, cristalizaciones sucesivas y



UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLIVAR

Formulario para la Presentación de Proyectos de Investigación Científica, Desarrollo Tecnológico e Innovación

Formulario tomado de la Secretaría Nacional de Educación Superior Ciencia y Tecnología - SENESCYT



Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Se comprobará la pureza del patrón así obtenido por HPLC analítica y determinación de punto de fusión u otros marcadores de propiedades químicas y físicas de este compuesto.

Pruebas de almacenamiento del producto terminado (Pterosina B).

Se realizarán pruebas de humedad y conservación del producto a temperatura ambiente y en refrigeración (4 °C), prueba de almacenamiento del producto en diferentes envases para la determinación de la vida útil en anaquel.

Determinar el costo de producción de la obtención de Pterosina B.

Se determinará el costo de producción de la Pterosina B, con la finalidad de asignar un precio para la venta y analizar si se justifica la tecnología desarrollada en cuanto al beneficio que se obtendrá versus el precio del mismo y de igual manera para la cuantificación del tóxico por CLAR.

IV: Difundir los resultados del proyecto

Para la difusión de los resultados, se generará el manual de procedimientos; un artículo científico, ponencia internacional, además, se realizarán conferencias a los involucrados directos e indirectos, mismas que se ayudará mediante la utilización de medios audio-visuales, boletines divulgativos de prensa, trípticos y otros.

RESULTADOS ESPERADOS

Se obtendrá el patrón Pterosina B como indicador de la determinación del ptaquilósido.

Se contará con una marcha analítica estandarizada y validada para la cuantificación del ptaquilósido en muestras de leche y agua.

Laboratorio de análisis químico equipado para prestar el servicio de la determinación del ptaquilósido en las diferentes matrices a la población interesada.

Se obtendrá el manual técnico y un artículo científico publicado en revistas indexadas nacionales e internacionales de los resultados obtenidos.

Demostrar la problemática del principio fitotóxico y sugerir a las autoridades de control, la inclusión del análisis de la presencia del ptaquilósido en productos alimenticios, leche y agua en caso de que se encuentren residuales tóxicos como el Ptaquilósido.

Realización del trámite para la consecución de la patente de extracción y las técnicas de análisis.

La relevancia de los resultados es que por primera vez en el Ecuador se contará con una marcha analítica estandarizada y validada para la cuantificación del Ptaquilósido en diferentes matrices como leche y agua, que garantice la inocuidad de los mismos sin residuales de este fitotóxico que es carcinogénico por excelencia.

Se dará a conocer a los organismos gubernamentales reguladores de la calidad de los alimentos, tal como el INEN, sobre la problemática que implica consumir alimentos con residuales fitotóxicos como el Ptaquilósido y para que se incluya en las normas de calidad de los alimentos como un requisito indispensable y obligatorio, la detección de este metabolito secundario que es carcinogénico para la salud pública a todos los niveles de ingestión.

Por tanto el campo de acción o aplicabilidad que tendrían los resultados de este proyecto es en la salud pública, garantizando que los productos a través de la cadena alimentaria sean inocuos y aptos para el consumo de la población a nivel provincial y/o nacional, preservando la seguridad alimentaria del país.

UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLIVAR

Formulario para la Presentación de Proyectos de Investigación Científica, Desarrollo Tecnológico e Innovación

(Formulario tomado de la Secretaría Nacional de Educación Superior Ciencia y Tecnología – SENESCYT)

H. SOSTENIBILIDAD

Este proyecto se presenta a esta convocatoria por la necesidad real, imperiosa e inminente de la alta presencia del helecho *Pteridium arachnoideum* en zonas ganaderas de los cantones de San Miguel, Chimbo y Echeandía (11, 13), planta que produce intoxicación al ganado bovino, especialmente y, que afecta al humano a través de la cadena alimentaria por consumir carne y leche con residuales del tóxico carcinogénico. Esto repercute primariamente a cuantiosas pérdidas económicas por la presentación de la enfermedad crónica en la masa ganadera en la región y país y el decomiso de carnes y leche que conllevará el conocimiento del riesgo en la cadena alimentaria que representa para el humano el consumo de leches con altos contenidos de ptaquilósido (11) con el consiguiente riesgo de contraer cáncer gástrico en la población infantil y adulta. Por lo que se obtendrá cantidades apreciables del patrón en el transcurso del proyecto que garanticen su disponibilidad para su comercialización. Los resultados obtenidos de producción se podrán mantener en el tiempo posterior a la conclusión del proyecto por la aportación que represente la venta del producto para la adquisición de nuevos recursos materiales que permitan mantener el patrón en stock y consecuentemente su sostenibilidad productiva.

Por otra parte la Universidad Estatal de Bolívar como ente de Educación Superior e Investigación, se podrá consignar a nivel nacional como la entidad que brinde servicios a la población en la identificación y cuantificación del Ptaquilósido en las diferentes matrices para el control de calidad de la leche y agua, proporcionando seguridad al consumidor en el Ecuador, en la medición de este peligroso compuesto para la salud humana y animal. Ambos aspectos propuestos en el proyecto presenta gran impacto económico y social de la región y reconocimiento para la Universidad Estatal de Bolívar en esta temática a nivel nacional.

I. EFECTOS MULTIPLICADORES

Una segunda fase en la continuidad del proyecto podría incluir:

Cuantificar el Ptaquilósido en otras matrices como carne, suelo, sangre, otros por CLAR.

Etapas de control fitosanitario de esta maleza, en la búsqueda de las mejores acciones en la eliminación de la especie vegetal invasiva de las zonas de pastos de la provincia y del país mediante estudios experimentales, utilizando diferentes herbicidas biológicos.

Realizar estudios de análisis de riesgo de la población humana que vive en las zonas donde existe la presencia del helecho *Pteridium arachnoideum* y la afectación de los animales con Hematuria Enzoótica Bovina.

Obtener metabolitos secundarios de *Pteridium arachnoideum* que tienen efecto anticancerígeno y realizar experimentos en modelos biológicos.

Realizar estudios fito-toxicológicos en modelos biológicos (roedores, curieles, conejos) para evidenciar el efecto tóxico del Ptaquilósido en el organismo animal mediante un análisis histopatológico e inmunohistoquímico

Realizar estudios para la obtención de un kit de diagnóstico rápido para la detección del ptaquilósido en las diferentes matrices *in situ* y laboratorio.

UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLIVAR

Formulario para la Presentación de Proyectos de Investigación Científica, Desarrollo Tecnológico e Innovación

(Formulario tomado de la Secretaría Nacional de Educación Superior Ciencia y Tecnología - SENESCYT)

J. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO

BENEFICIARIOS DIRECTOS

En primer lugar los beneficiarios directos de los resultados del proyecto lo constituyen las entidades responsables de la salud animal y humana en la provincia y el país, al contar con el patrón y el método químico de análisis del carcinógeno como parte del control de calidad de la leche y agua en la medición de la seguridad al consumidor, considerando a las poblaciones susceptibles de riesgo por el consumo de estos productos contaminados con un elemento carcinogénico.

Con los resultados de esta investigación se beneficiarán en primer lugar la población de la provincia Bolívar 183.641.000 habitantes y la población total a nivel nacional 14 millones 306 mil 876 habitantes (INEC-2010) que corren el riesgo de contraer cáncer gástrico a través de la cadena alimentaria por consumir carne y leche de animales intoxicados con el fitotóxico carcinogénico Ptaquilósido.

BENEFICIARIOS INDIRECTOS

Todos los estamentos que laboran en la Universidad Estatal de Bolívar.

Macro y micro empresarios que procesan la leche y la carne; así como grupos artesanales que se dedican a estas actividades pecuarias en el área de lácteos y cárnicos.

Laboratorio de análisis de control de calidad de los alimentos indexados al Instituto Nacional Ecuatoriano de Normalización (NTE.INEN) y otros laboratorios certificados y validados a nivel nacional.

Las instituciones que certifican y validan los métodos (Organización de Acreditación Ecuatoriana) para parámetros físicos, biológicos y toxicológicos (fitotóxicos) en productos alimenticios en el Ecuador.

Entidades de fabricación de productos químicos en el Ecuador, si se realiza la transferencia posterior de la tecnología.

UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLIVAR

Formulario para la Presentación de Proyectos de Investigación Científica, Desarrollo Tecnológico e Innovación

(Formulario tomado de la Secretaría Nacional de Educación Superior Ciencia y Tecnología - SENESCYT)

K. IMPACTO DEL PROYECTO

Con la obtención de la Pterosina B como patrón para la cuantificación de residualidad del tóxico Ptaquilósido en leche y agua, se garantiza que estos productos sean inocuos para el consumo de la población y así prevenir a la Salud Pública del riesgo potencial de contraer cáncer gástrico que a través de la cadena alimentaria puedan consumir alimentos contaminados con este residual carcinogénico.

Llevar la propuesta al Instituto Nacional de Estandarización y Normalización (INEN -NTE) que se aplique de forma obligatoria la detección del tóxico Ptaquilósido como norma de calidad en los alimentos (leche y agua).

L. TRANSFERENCIA DE RESULTADOS

Los resultados del presente proyecto generará la presentación de una patente referida al proceso de obtención del producto o patrón de Pterosina B, por lo que la ejecución del mismo presenta elementos protegibles mediante secreto empresarial para la no divulgación de los resultados hasta tanto no se defina el otorgamiento de la patente.

Una vez concluido el proceso de patente, se podrá valorar por el personal asignado de la Universidad la factibilidad y pertinencia de la transferencia de la tecnología a la Industria de Químicos del Ecuador en la que la Institución fungirá como propietario de la Patente para su negociación.

Los resultados en cuanto a la estandarización y validación del método de análisis químico en la determinación del carcinógeno ptaquilósido en las diferentes matrices, será publicado en revistas indexadas nacionales y extranjeras, así como presentadas en eventos nacionales e internacionales por las autoras de la metodología.

Seminario: Realizar capacitación sobre la problemática de la residualidad del Ptaquilósido en productos de consumo como leche y agua, preparado para académicos, estudiantes, organismos gubernamentales como Ministerio de Salud Pública (MSP), Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca-Guaranda (MAGAP-G), Agencia Agropecuaria de Calidad (AGROCALIDAD) y el INEN.

Actividades de vinculación con la colectividad: realizar charlas a los productores ganaderos de los diferentes cantones de la Provincia Bolívar que tienen presencia en las zonas de pastoreo el helecho *Pteridium arachnoideum* que produce intoxicación a los animales y que a través de la cadena alimentaria afecta al hombre por consumir carne y leche de animales intoxicados.

M. FACILIDADES DE TRABAJO

Para la ejecución de este proyecto se requiere de un equipo de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR o HPLC), rota-evaporador, estufa, balanza analítica y técnica digital, agitador orbital de 350 rpm, plancha de calentamiento, liofilizador, una bomba al vacío, mismos que si existen en la universidad y que se encuentran en bodega sin utilizar, equipos fundamentales para realizar la presente investigación y que se requiere se instalen en un espacio físico y específico para el desarrollo de la investigación.

También se requiere de una centrifuga de tubos grandes (50 o 100 mL), un equipo baño ultrasónico, balanza para la determinación de porcentaje de humedad rápido, bomba de laboratorio con intercambio bajo de aceite, que no existen en la Institución; así como de reactivos químicos, instrumentales,

UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLIVAR

Formulario para la Presentación de Proyectos de Investigación Científica, Desarrollo Tecnológico e Innovación

(Formulario tomado de la Secretaría Nacional de Educación Superior Ciencia y Tecnología – SENESCYT)

materiales varios y consumibles, específicos para esta investigación que no se encuentran en stock y son indispensables adquirirlos para el desarrollo del proyecto.

En cuanto a la materia prima existe la disponibilidad, ya que se encuentra en la naturaleza como una maleza que afecta el equilibrio del ecosistema por su efecto alelopático e invasivo donde exista la presencia de este helecho tóxico (*Pteridium arachnoideum*).

En cuanto a la movilidad es necesario contar con el servicio de un transporte para realizar los muestreos que se requieren, mismo que está presupuestado dentro de la ejecución del proyecto.

N. IMPACTO AMBIENTAL

*Con la ejecución de la presente investigación se tendrá impactos ambientales positivos ya que en la generación y ejecución de este proyecto se considera la utilización de la especie vegetal *Pteridium arachnoideum*, como materia prima para obtener el Patrón Pterosina B, helecho que en la actualidad representa para el país un problema ambiental, por ser una planta invasiva que cubre las áreas de pastoreo de los animales, en especial las zonas donde hay humedad y otras condiciones para su presencia, que propician cambios negativos en los ecosistemas nacionales y representan un alto riesgo para la salud humana y animal. Con el uso de esta planta estaríamos mitigando en cierta forma el problema de la maleza, llegando a un equilibrio, es decir, preservando el medio ambiente.*

El desarrollo del proyecto conlleva también la utilización de reactivos y solventes químicos orgánicos a nivel de laboratorio, los mismos que se pueden reciclar para otros fines inherentes a las tareas de laboratorio hasta su agotamiento y que trabajados en las condiciones apropiadas no generan ningún riesgo ambiental.

O. ASPECTOS BIOÉTICOS Y SOCIALES

En el aspecto social de las personas involucradas se está proporcionando con la ejecución de este proyecto el conocimiento necesario del principio activo carcinogénico del helecho macho para que estos traten de controlar o erradicar esta maleza que es un sustento de alimento que está más al alcance de los animales por falta de disponibilidad de alimentos apropiados para suplir sus requerimientos y por ello las pérdidas económicas para el productor ganadero; por consiguiente repercute en la salud animal y humana a través de la cadena alimentaria por consumir productos contaminados de animales enfermos convirtiéndose en un problema social de gran riesgo para la salud y seguridad alimentaria.

Por otro lado, en el aspecto bioético, al generar este patrón de Pterosina B para la determinación del Ptaquilósido en diferentes matrices, debe por tanto ser utilizado para el fin propuesto y no hacer usos inadecuados de este metabolito que atente con la vida y el bienestar de la población en general.

UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLIVAR

Formulario para la Presentación de Proyectos de Investigación Científica, Desarrollo Tecnológico e Innovación

(Formulario tomado de la Secretaría Nacional de Educación Superior Ciencia y Tecnología – SENESCYT)

P. REFERENCIAS CITADAS

1. VARGAS, P; FRANCA, T; BARROS, CSL; TOKARNIS, CH. Histopatological aspects of Bovine Enzootic Hematuria in Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* . 2003. 23 (2) 65-81.
2. RAMÍREZ, T; María Rosa, GARCÍA, P; Blanca, OROZCO S. Helechos invasores y sucesión secundaria post- fuego. *Ciencias*. No.085. Universidad Autónoma de México. D.F. 2007. pg. 18-25.
3. MARÍN, R.E; LLOBERAS, M; VIGNALE, D; ODRIOZOLA, E. Toxicidad natural de *Pteridium aquilinum* (Helecho) en bovinos y su importancia en humanos. *Veterinaria Argentina*. 2004. 21 (206) 413-420.
4. SHAHIN, M; BARRY, LS; PRAKASH, S. Bracken carcinogens in the human diet. *Mutation Research* 1999. 443. 69–79.
5. PINTO, C; PELETEIRO, M.C; LOBO, R.A; MACHADO, J; SILVA, L. Intoxicacao aguda pelo feto común (*Pteridium aquilinum* (L) Kuhn) em bovinos. *Rev. Portuguesa. Ciencias Veterinarias*. 2007. 102 (563-564) 289-298.
6. VETTER, J. A biological hazard of our age: bracken fern [*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn]-a review. *Acta Vet Hung*. 2009. 57(1): 183-196.
7. BORGES, J; CAMACARO, A; DOMINGUEZ, O y GRATEROL, A. Composición bromatológica de *Pteridium aquilinum* subs. *arachnoideum* colectado en el Municipio de Bolívar, Estado de Yaracuy. Venezuela. 2012. www.ergomix.com.
8. GOMES, J; MAGALHAES, A; VARERIE, M; Ines, F; AMADO, S; ARANHA, P; OVESEN, R; GARTNER, F; CELSO, A y ELIETTE, T. *Pteridium aquilinum* and its Ptaquiloside toxin induce DNA damage response in gastric epithelial cell, a link with gastric carcinogenesis. *Oxford Journals- Life Sciences-Medicine –Toxicological Science*. 2011. 126 (1): 60-71.
9. MARRERO Faz Evangelina y CALDERÓN Tobar Ángela. Plantas tóxicas e inocuidad alimentaria: Hematuria Enzootica Bovina por *Pteridium* spp. Un problema relevante de salud. Artículo reseña. *Rev. Salud Anim*. 2012. 34(3): 137-143.
10. CALDERÓN Ángela; MANCERO Betty; SÁNCHEZ Luz María; CHIRIBOGA Jimena; LUCERO Diego y MARRERO Evangelina. Niveles de Ptaquilósido en muestras de leche bovina en granjas de San Miguel de Bolívar, Provincia Bolívar-Ecuador. *Rev. Salud Anim*. 2013. 25(2).
11. CALDERÓN Tobar Ángela; SÁNCHEZ Luz María; MANCERO Betty; MARRERO Evangelina; CHIRIBOGA Ximena y SILVA José. Residualidad del Ptaquilósido en la leche procedente de granjas bovinas en tres cantones de la Provincia Bolívar, Ecuador. *Rev. Salud Anim. Indx Scielo* 2014. 36(1).
12. CALDERÓN Tobar Ángela; MARRERO Faz Evangelina; MURILLO. V; VEGA. V. Reporte de caso de Hematuria Enzootica Bovina por ingestión de *Pteridium arachnoideum* en la región ganadera de San Miguel de Bolívar, Provincia Bolívar, Ecuador. *Rev. Salud Animal*. 2011. 33(3).
13. JUBB, KVF; KENNEDY, PC and PALMER, C. *Pathology of Domestic Animals*. Volumen II. Edited by M. Grant Maxie. Fifth edition. Chapter 4 Urinary System and hematopoietic system: 2009. 504:521. 568:570 pp.
14. TORRES, J. Prevenga la Hematuria en su ganado. *Rev. El Cebú- Colombia.* . 1990. 255:37.
15. ALVARADO, DM. Evolución de algunos aspectos epidemiológicos y ecológicos del cáncer gástrico en Costa Rica. *Rev. Costa Rric. Salud Pública*. 2003. 12:21.
16. GONZALES, CE; CHAVERO, AC; PERALES, RC; FALEON, NP y EVARISTO, RR. Caracterización de las lesiones encontradas en bovinos con Hematuria Vesical Enzootica en la zona de Oxapamba, Pasco. *Rev.Inv. Vet. Perú*. 2004. 15 (1) 25-26.

UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLIVAR

Formulario para la Presentación de Proyectos de Investigación Científica, Desarrollo Tecnológico e Innovación

(Formulario tomado de la Secretaría Nacional de Educación Superior Ciencia y Tecnología – SENESCYT)

17. RIET-CORREA; MEDEIROS, R; PFISTER, J; SCHILD, AL and DANTAS, AF. Poisonings by plants, mycotoxins and related substances in Brazilian Livestock. Ed. Sociedades Vicente Pallotti, Pasto, Brazil. 2009.
18. SÁNCHEZ-VILLALOBOS, A; ALVARADO, C; BRACHO, D; RAMÍREZ, D; NERI, R y OCANDO, J. Observaciones clínico patológicas en vacas con hematuria enzoótica bovina. Revista Científica. 2010. 14 (4).
19. CALDOW, G and BURNS, F. Bracken poisoning in farm animals in Great Britain: a brief outline in relation to disease surveillance data. In: Taylor, J.A. and Smith, R.T., (Eds.) Bracken Fern: Toxicity, Biology and Control. Proceedings of the International Bracken Group Conference Manchester 1999, pp. 197-200. Aberystwyth: International Bracken Group. United Kingdom. 2000.
20. SCHRADER, A; SCHULTZ, O; VÖLKER, H and PULS, H. Actual plant intoxications in ruminants of North-Eastern Germany. Berliner Münchener Tierärztlicher Wochenschrift 2001. 114, 218-221.
21. PINTO, CA. Hematúria enzoótica bovina: contribuc, ão para o seu estudo etiopatogénico, PhD Thesis, Faculty of Veterinary Medicine, Technical University of Lisbon, Lisbon, Portugal. 2010.
22. FLETCHER, MT; REICHMANN, KG; BROCK, I J; MCKENZIE, R A. and BLANEY, B J. Residue potential of norsesquiterpene glycosides in tissues of cattle fed Austral bracken (*Pteridium esculentum*). J Agric Food Chem. 2011. 59(15): 8518-8523.
23. POTTER, DM and BAIRD, MS. Carcinogenic effects of balizada do in bracken fern and related compounds. British Journal of Cancer. 2000. 83(7): 914-920.
24. VELA, Carla Maria; SAMPAIO, Ana Angelita; ARAUJO, Rodolfo; SAKATE MICHIKO. *Pteridium Aquilinum* Na alimentacao Humana: Uma Revisao. Acta Veretinarum Brasilica. 2010. 4(2): 64-69.
25. RASMUSSEN, Lars Holm. PTAQUILOSIDE – AN ENVIRONMENTAL HAZARD? Occurrence and fate of a Bracken (*Pteridium* sp.) toxin in terrestrial environments. Ph.D.-thesis, 2003.
26. ALONSO-AMELOT, ME. Braken fern, animal and human health. Rev Fac Agron. 1999. 16:528-41.
27. MARRERO, E; STUART, R.; SÁNCHEZ, LM; BULNES, C.; PALENZUELA, I. Informe técnico de la caracterización del cuadro clínico de la Hematuria Enzootica Bovina que afecta zonas ganaderas del Departamento de Tarija, Bolivia. Proyecto Autapo – CENSA- ICA, 1999.
28. VILLALOBOS, J.; Últimos Avances en la Investigación del *Pteridium aquilinum* en Relación con la Salud Humana y la Salud Animal. I Curso Internacional de Toxicosis por Plantas. Memorias. La Habana. Abril, 10 al 12. Cuba. 2000. 34-37.
29. ROOS, KR; PETERS, RT; BENDIX, J and BECK, E. Growth of Tropical Bracken (*Pteridium arachnoideum*): Response to Weather Variations and Burning. Invasive plant Science and Management 2010. 3:402-211.
30. ALONSO- AMELOT. M. E; CASTILLO, U.; De Jongh. Passage of the bracken fern carcinogen ptaquilósido into bovine milk. Lait, 1993. 73: 323- 332.
31. Asociación de Ganaderos de la Sierra y Oriente (AGSO) www. Agso.com.ec 2012.
32. NAVARRETE, H; LEÓN, B; GONZALES, J; AVILES, DC; SALAZAR, J; MELLADO, F; ALBAN, J y ØLLGAARD, B. Helechos. Botanica Economica de los Andes Centrales. Universidad Mayor de San Andres, La Paz. . 2006. 385-411.
33. ALONSO-AMELOT, ME. The link between Bracken fern and stomach cancer: milk. Nutrition 1997. 13, 694-696.
34. ALONSO-AMELOT, ME; CASTILLO, UF; AVENDAÑO, M; SMITH, BL and LAUREN, DR. Milk as a vehicle for the transfer of ptaquiloside: a Bracken carcinogen. In: Taylor, J.A. and

UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLIVAR

Formulario para la Presentación de Proyectos de Investigación Científica, Desarrollo Tecnológico e Innovación

(Formulario tomado de la Secretaría Nacional de Educación Superior Ciencia y Tecnología - SENESCYT)

- Smith, R.T., (Eds.) Bracken Fern: Toxicity, Biology and Control. Proceedings of the International Bracken Group Conference Manchester 1999, pp. 86-90. Aberystwyth: International Bracken Group. United Kingdom. 2000.
35. ALONSO-AMELOT, ME and Avendaño, M. Possible association between gastric cancer and bracken fern in Venezuela: an epidemiologic study. *Int J Cancer*. 2001. 91:252-9.
 36. ALONSO-AMELOT, ME and AVENDAÑO, M. Human carcinogenesis and bracken fern: a review of the evidence. *Curr Med Chem*. 2002. 9(6): 675-686.
 37. JENSEN PH; JACOBSEN OS; HANSEN HC. Quantification of balizada do and pteroin B in soil and groundwater using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *J Agric Food Chem*. 2008. 12; 56 (21):9848-54.
 38. BONADIES, F; Berardi ,G; Nicoletti, R; Saverio, RF ; De Giovanni F; Marabelli R; Santoro A; Raso Cinzia; Tagarelli, A; Roperto F; Russo V; Roperto, S. A new, very sensitive method of assessment of balizada do, the major bracken carcinogen in the milk of farm animals. *Food Chemistry* 2011. 124. 660-665.
 39. Chemical Suppliers (CAS) - CHEMCATS - Find commercially available chemicals, pricing and supplier contact information. www.cas.org/content/chemical-suppliers. 2012.
 40. RASMUSSEN, LH; LAUREN, D; SMITH, B. and HANSEN, HCB. Variation in ptaquiloside content In bracken (*Pteridium esculentum* (Forst. f) Cockayne) in New Zealand. *N Z Vet J*. 2008. 56(6): 304-309.
 41. JOHANNES, K; STROBEL, BW. And HANSEN, HCB. Climate change, invasive species and toxic plant substances in soil and water. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2009. 6(30): 302022.
 42. SHARMA, R; BHAT, TK. and SHARMA, OP. The environmental and human effects of ptaquiloside-induced enzootic bovine hematuria: a tumorous disease of cattle. *Rev Environ Contam Toxicol*. 2013. 224: 53-95.
 43. RASMUSSEN, L H; SCHMIDT, B and SHEFFIELD, E. Ptaquiloside in bracken spores from Britain. *Chemosphere*. 2012. 10.092.
 44. RASMUSSEN, L H; SCHMIDT, B and SHEFFIELD, E. Ptaquiloside in bracken spores from Britain. *Chemosphere*. 2013. 90(10): 2539-2541.
 45. SÁNCHEZ-VILLALOBOS, A; ALVARADO, C; BRACHO, D; RAMÍREZ, D; NERI, R y OCANDO, J. Observaciones clínico patológicas en vacas con hematuria enzoótica bovina. *Revista Científica*. 2010. 14 (4).
 46. GOMEZ, J; MAGALHÃES, A; MICHEL, V; AMADO, IF; ARANHA, P; OVESEN, RG; HANSEN, HC; GÄRTNER, FB; REIS, CA. and TOUATI, E. *Pteridium aquilinum* and its ptaquiloside toxin induce DNA damage response in gastric epithelial cells, a link with gastric carcinogenesis. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*. . 2012. 126(1): 60-71
 47. ALONSO-AMELOT, ME; CASTILLO, U; SMITH, BL; LAUREN, DR. Excretion through milk, of ptaquiloside in bracken-fed cows. A quantitative assessment, *Lait* 1998. 78; 413-423.
 48. CAMPOS, PM; PEREIRA, LO; BICALHO, LS; DOREA, JG; POCAS, FMJ. and SANTOS, MF. Interacción de bracken-fern extrac whitth vitamina C in human submandibular gland and oral epithelium cell lines. *Mutation Research/Genetic Toxicologi and environmental Mutagenesis*. 2008. 653 (2):158-163.
 49. TENDRAFILOVA, A; PEEV, L; ANTONOVA, D; TASHEV, A; TODOROV, T and DILOV, P. Determination of ptaquiloside in *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn from central rhodopes (Bulgaria). *Rev. Comptes Rendus de L. Academie Bulgare des Sciences*. 2012. 65(9):1193-1198.

UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLIVAR

Formulario para la Presentación de Proyectos de Investigación Científica, Desarrollo Tecnológico e Innovación

(Formulario tomado de la Secretaría Nacional de Educación Superior Ciencia y Tecnología – SENESCYT)

50. MARRERO, Faz E., ALFONSO, HA., FUENTES, FV; TABLADA, PR; SÁNCHEZ, PLM; PALENZUELA, PI. y BULNES, GC. Plantas Toxicas del Trópico. 3ra Edición, Ed. San Luis, Cuba. 2010.
51. Committee on the Toxicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment, COT. Statement on the Risk to Consumers of Eating Foods Derived from Animals that Have Eaten Bracken, Food Standards Agency, London, 2008. pp. 20–21.
52. Instituto Nacional de Estandarización y Normalización (INEN) [http://www.normalizacion.gob.ec/Normas INEN 9-2008 para la leche y carne cruda, NTE INEN 1338 \(2012\) el agua \(NTE INEN 1108\)](http://www.normalizacion.gob.ec/Normas%20INEN%209-2008%20para%20la%20leche%20y%20carne%20cruda,%20NTE%20INEN%201338%20(2012)%20el%20agua%20(NTE%20INEN%201108).2014). 2014.
53. RECOUSO, RC; STOCCO, SRC; FREITAS, R; SANTOS, RC; de FREITAS, AC; BRUNNER, O; BECAK, W. and LINDSEY, CJ. Clastogenic effect of bracken fern (*Pteridium aquilinum* v. *arachnoideum*) diet in peripheral lymphocytes of human consumers: preliminary data. Rev. Vet Comp Oncol. 2003. 1(1):22-29.
54. ALMEIDA Santos, MF; DOREA, JG. and LUNA, H. Bracken-fern extracts can be clastogenic or aneugenic depending on the tissue cell assay. Food Chem Toxicol. 2006. 44(11):1845-1848.
55. FERGUSON, LR. And PHILPOTT, M. Nutrition and mutagenesis. Rev. Annu Rev Nutr. 2008. 28: 313-329.
56. PEREIRA, LO; BICALHO- CAMPOS, PLM; DE SOUSA, TM; BAO, SN; de Fatima MENEZES, ASM and FONSECA, MJ. DNA damage and apoptosis induced by *Pteridium aquilinum* aqueous extract in the oral cell lines HSG and OSCC-3. J Oral Pathol Med. 2009. 38(5):441-447.
57. GIL DA COSTA, RM; BASTOS, MMSM; OLIVEIRA, PA and LOPES, C. Bracken-associated human and animal health hazards: Chemical, biological and pathological evidence. Journal of Hazardous Materials. 2012. 203-204: 1-12.
58. LIOI, MB; BARBIERI, R; BORZACCHIELLO, G; DEZZI, S; ROPERTO, S y SANTORO A. Chromosome aberrations in cattle with chronic enzootic haematuria. J Comp Pathol. 2004. 6:131:233.
59. PERETTI, V; CIOTOLA, F; ALBARELLA, S; RUSSO, V; MEO, GPD y IANNUZZI, L. Chromosome fragility in cattle with chronic enzootic haematuria. Mutagenesis. 2007. 22:317–20.
60. ROPERTO, S; BORZACCHIELLO, G; BRUN, R; LEONARDI, L; MAIOLINO, P; MARTANO, M; PACIELLO, O; PAPPARELLA, S; RESTUCCI, B; RUSSO, V; SALVATORE, G; URRARO, C. and ROPERTO, F. A Review of Bovine Urothelial Tumours and Tumour-Like Lesions of the Urinary Bladder. Journal of the Comparative Pathology. 2010. 142:95-108.
61. GIL DA COSTA, RM; COELHO, P; SOUSA, R; BASTOS, MM; PORTO, B; TEIXEIRA, JP; MALHEIRO, I. and LOPES, C. Multiple genotoxic activities of ptaquiloside in human lymphocytes: aneuploidy, clastogenesis and induction of sister chromatid exchange. Mutat Res. 2012^a. 747(1): 77-81.
62. AGNEW, MP and LAUREN, DR. Determination of ptaquiloside in Bracken fern (*Pteridium esculentum*). J Chromatogr. 1991. 538:462–468.



UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLIVAR

Formulario para la Presentación de Proyectos de Investigación Científica, Desarrollo Tecnológico e Innovación

(Formulario tomado de la Secretaría Nacional de Educación Superior Ciencia y Tecnología – SENESCYT)



Q. DECLARACIÓN FINAL

El equipo de investigadores, representado por el Director del Proyecto, y la Institución Postulante Principal, a través de su Representante Legal, de forma libre y voluntaria declaran lo siguiente:

- Que el proyecto descrito en este documento es una obra original, cuyos autores forman parte del equipo de investigadores y por lo tanto asumimos la completa responsabilidad legal en el caso de que un tercero alegue la titularidad de los derechos intelectuales del proyecto, exonerando a la UEB de cualquier acción legal que se derive por esta causal.
- Que el presente proyecto no causa perjuicio alguno al ambiente y no transgrede norma ética alguna, y que en el caso de que la investigación requiera de permisos previo a su ejecución, el Director del Proyecto remitirá una copia certificada de los mismos a la UEB.
- Que este proyecto no se ha presentado ninguna otra institución pública o privada, para el financiamiento del presupuesto solicitado a la UEB. El incumplimiento de este acuerdo será causal para que el proyecto no sea financiado o para la terminación anticipada unilateral del convenio firmado con la UEB.
- De otorgarse financiamiento por la UEB para la ejecución del proyecto, aceptamos que los bienes adquiridos con estos fondos permanecerán bajo la responsabilidad de la institución postulante durante la ejecución del proyecto, pero la UEB se reserva el derecho de determinar el destino final de los mismos, una vez finalizado el proyecto.
- Aceptamos que si el proyecto se accede a financiamiento de la UEB y como parte de los resultados del mismo se genera algún producto o procedimiento susceptible de obtener derechos de propiedad intelectual, de los cuales se deriven beneficios, éstos serán compartidos por la UEB, la institución postulante, la(s) instituciones que compartieron la investigación y el equipo de investigadores, en los términos definidos en el respectivo convenio específico.

Lugar: Guaranda.

Fecha: 24-04-2014

Nombre: Angela del Rocío Calderón Tobar
CI: 1709791345

Director del Proyecto

Nombre: Diómedez Guadalupe Núñez Mihaya
CI: 0200506764

Representante Legal de la Institución Beneficiaria



ANEXO 1: MATRIZ DE MARCO LÓGICO

JERARQUIA DE OBJETIVOS	DEFINICIÓN DEL INDICADOR	FUENTES DE VERIFICACIÓN	SUPUESTOS
<p>FIN (OBJETIVO A LARGO PLAZO):</p> <p>El Fin de esta investigación refiere a la solución del problema principal que es garantizar la seguridad alimentaria mediante el consumo de alimentos libres de residuos fitotóxicos como el Ptaquilósido en productos tales como leche y agua, que sean inocuos para el consumidor de la Provincia y a nivel nacional.</p>	<p>Con la obtención de la Pterosina B como patrón para la cuantificación de residualidad del tóxico Ptaquilósido en leche y agua, se garantiza que estos productos sean inocuos para el consumo de la población y así prevenir a la Salud Pública del riesgo potencial de contraer cáncer gástrico que a través de la cadena alimentaria puedan consumir alimentos contaminados con este residual carcinogénico.</p> <p>Llevar la propuesta al Instituto Nacional de Estandarización y Normalización (INEN - NTE) que se aplique de forma obligatoria la detección del tóxico Ptaquilósido como norma de calidad en los alimentos (leche y agua).</p>	<p>Realizar charlas sobre la problemática de residualidad de este tóxico a los directivos del INEN para que tomen las medidas pertinentes y se realice el establecimiento de la determinación del principio tóxico Ptaquilósido como norma de calidad de los alimentos de leche y agua, garantizando de esta manera la seguridad alimentaria a la población ecuatoriana en general.</p> <p>Para esto la Universidad patenta la metodología de extracción de la Pterosina B como patrón para la posterior venta a las empresas de regulación alimentaria y también brinda el servicio de la cuantificación del Ptaquilósido en leche y agua porque cuenta con la metodología, las técnicas y equipos necesarios para este fin.</p>	<p>Los directivos del INEN-NTE toman con responsabilidad la seguridad alimentaria del consumidor y garantizan la aplicación obligatoria de la detección del principio tóxico Ptaquilósido como norma de calidad alimentaria en elche y agua.</p> <p>La Universidad Estatal de Bolívar cuenta con laboratorio de análisis cromatográficos y dispone del presupuesto planificado.</p>
<p>OBJETIVO GENERAL (O PROPÓSITO):</p> <p>Obtener la Pterosina B, en <i>Pteridium arachnoideum</i> como patrón para la determinación del tóxico carcinogénico (ptaquilósido) en diferentes matrices como control de calidad alimentaria.</p>	<p>Obtener 100 gramos de Pterosina B, con una pureza mayor al 80 % en el plazo de 12 meses.</p>	<p>Producto terminado (Pterosina B) envasado en viales de capacidad de 250 mg.</p> <p>Ficha de costos de producción y valor de venta del producto terminado.</p>	<p>Las autoridades aprobaron el proyecto con su financiamiento total (\$ 30 000 USD) acorde a lo presupuestado para cada fase.</p> <p>Se cuenta con el equipamiento necesario y en funcionamiento en un espacio físico adecuado y con todos los materiales e insumos requeridos.</p>

OBJETIVOS ESPECÍFICOS (Componentes o resultados):				
OBJETIVO 1 Extraer y Purificar la Pterosina B.	Concentración de Pterosina B en gramos /kg de materia prima (Helecho) y el grado de pureza en el plazo de dos meses.	Recolección de material vegetal en diferentes zonas de San Miguel de Bolívar. Equipos: balanza analítica; baño ultrasónico, calentador agitador orbital; rota- evaporador, estufa, centrifuga de tubos grandes; tijera de jardinero o guillotina. Sustancias químicas calidad para análisis: agua destilada y tipo I, éter de petróleo, hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, diclorometano. Resina de polyamide 6, carbón activado, metanol, hexano, acetato de etilo, cloruro de sodio. Materiales y cristalería: material e insumos apropiados para el ensayo de extracción del analito. Movilidad: Se requiere de un transporte para realizar los diferentes muestreos en San Miguel de Bolívar y para comprar los reactivos, materiales e insumos.	Protocolo de la metodología de extracción de la Pterosina B.	Que se cuente con el presupuesto adecuado y laboratorio específico para este fin.
ACTIVIDADES 1.1.- extracción del Ptaquilósido y formación de Pterosina B según la metodología (Agnew y Lauren 1991) de marcha fitoquímica de extracción del ptaquilósido de su fuente vegetal de origen, <i>Pteridium arahnoides</i>	Recolección del material vegetal en diferentes zonas de San Miguel de Bolívar. Equipos: balanza analítica; baño ultrasónico, calentador agitador orbital; rota- evaporador, estufa, centrifuga de tubos grandes; tijera de jardinero o guillotina. Sustancias químicas calidad para análisis: agua destilada y tipo I, éter de petróleo, hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, diclorometano. Resina de polyamide 6, carbón activado, metanol, hexano, acetato de etilo, cloruro de sodio. Materiales y cristalería: material e insumos apropiados para el ensayo de extracción del analito. Movilidad: Se requiere de un transporte para realizar los diferentes muestreos en San Miguel de Bolívar y para comprar los reactivos, materiales e insumos.	Ficha técnica de recolección del material vegetal. Protocolo del procedimiento de extracción de la Pterosina B. Material fotográfico de muestreo realizado.	Protocolo de la metodología de extracción de la Pterosina B.	Se cuenta con los equipos instalados y en funcionamiento en un espacio físico adecuado y con las sustancias química y materiales necesarios para cumplir con esta actividad. Se cuenta con la movilidad requerida para hacer los muestreos en tiempo y espacio. Se cuenta con el financiamiento propuesto.
1.2.- Purificación de la Pterosina B mediante las técnicas de: Cromatografía de columna a vacío empleando sílica como soporte u adsorbente, Cromatografía de Placa Delgada Preparativa, cristalizaciones sucesivas y lectura en Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).	Costo de financiamiento: \$ 12750 USD (Dieciséis mil setecientos cincuenta dólares). Columnas apropiadas, columnas a vacío y equipo HPLC. Solventes y materiales: Metanol, diclorometano, acetato de etilo y hexano. Materiales e Insumos apropiados para la purificación.	Ficha técnica de procedimiento de purificación de la Pterosina B.	Protocolo de la metodología de extracción de la Pterosina B.	Existen las diferentes columnas de cromatografía y equipo HPLC para la purificación y las sustancias químicas de calidad y en cantidad adecuadas para cumplir con esta actividad.

<p>OBJETIVO 2. Estandarizar y validar el método</p>	<p>Estandarizar la metodología utilizada y validar el método, mediante el uso de estadísticos en el plazo de tres meses.</p>	<p>Establecimiento del protocolo para la estandarización y validación del método Los cromatogramas obtenidos en la técnica HPLC en las diferentes matrices muestreadas y la utilización de la estadística.</p>	<p>Se cuenta con el equipo HPLC instalado y en funcionamiento en un espacio físico adecuado. Las sustancias químicas son adquiridas en tiempo, espacio con la calidad y cantidad requerida.</p>
<p>2.1.- Estandarizar y validar del método de análisis de ptaquilósido en leche fresca bovina por CLAR o HPLC:</p>	<p>Muestras de leche control negativo (de zonas donde no hay la presencia de <i>Pteridium arachnoideum</i>). Estandarizar y validar el método a través de: correlación de la curva, repetibilidad, reproducibilidad intermedia, límite de detección y de cuantificación, rango de trabajo, pruebas de adición, pruebas T y pruebas F. Lo anterior se consigue al analizar las muestras repetidamente en el equipo HPLC. Costo de financiamiento: \$ 500 USD.</p>	<p>Ficha técnica del muestreo de leche Protocolo de estandarización y validación del método analítico.</p>	<p>Se cuenta con el personal profesional adecuado para cumplir con esta actividad. Se cuenta con el financiamiento propuesto en tiempo y espacio.</p>
<p>2.2.- Estandarizar y validar del método de análisis de ptaquilósido en agua por CLAR o HPLC</p>	<p>Muestras de agua control negativo (de zonas donde no hay la presencia de <i>Pteridium arachnoideum</i>). Estandarizar y validar el método a través de: correlación de la curva, repetibilidad, reproducibilidad intermedia, límite de detección y de cuantificación, rango de trabajo, pruebas de adición, pruebas T y pruebas F. Lo anterior se consigue al analizar las muestras repetidamente en el equipo HPLC.</p>	<p>Ficha técnica del muestreo de agua. Protocolo de estandarización y validación del método analítico.</p>	<p>Se cuenta con el personal profesional adecuado para cumplir con esta actividad. Se cuenta con el financiamiento propuesto en tiempo y espacio.</p>
<p>2.3- Estimar la concentración del Ptaquilósido mediante la Pterosina B en leche fresca bovina por la técnica de CLAR o HPLC</p>	<p>Muestras de leche (100 mL) de zonas ganaderas (San Miguel de Bolívar) con presencia del helecho (<i>Pteridium arachnoideum</i>) y que los animales tengan o no</p>	<p>Datos cromatográficos de residualidad en leche por HPLC.</p>	<p>Se cuenta con los equipos necesarios, las sustancias químicas de calidad para el análisis correspondiente, los</p>

	<p>la sintomatología clínica de HEB.</p> <p>Equipos: HPLC, rota-evaporador, calentador agitador orbital, centrifuga de tubos grandes (50-100 mL).</p> <p>Sustancias químicas calidad para análisis: metanol, acetoneitrilo, cloruro de sodio, hidróxido de sodio, diclorometano. Materiales e insumos apropiados.</p> <p>Movilidad: se requiere de un transporte para realizar los muestreos.</p> <p>Costo de financiamiento: \$ 1565 USD</p>	<p>Datos estadísticos de la cuantificación del Ptaquilósido en leche por HPLC.</p> <p>Ficha técnica de las granjas muestreadas en San Miguel de Bolívar.</p> <p>Material fotográfico del muestreo realizado.</p>	<p>materiales e insumos y la movilidad en tiempo y espacio requerido para cumplir con las actividades propuestas.</p> <p>Se cuenta con el financiamiento propuesto.</p>
<p>2.4.- Estimar la concentración del Ptaquilósido mediante la Pterosina B en agua por la técnica de CLAR o HPLC</p>	<p>Muestruos de agua (100 mL) de zonas ganaderas (San Miguel de Bolívar) con presencia del helecho (<i>Pteridium arachnoideum</i>).</p> <p>Equipos: HPLC, rota-evaporador, calentador agitador orbital, centrifuga de tubos grandes (50-100 mL).</p> <p>Sustancias químicas calidad para análisis: metanol, acetoneitrilo, cloruro de sodio, hidróxido de sodio, diclorometano. Materiales e insumos apropiados.</p> <p>Movilidad: se requiere de un transporte para realizar los muestreos.</p> <p>Costo de financiamiento: \$ 1565 USD.</p>	<p>Datos cromatograficos de residualidad en agua por HPLC.</p> <p>Datos estadísticos de la cuantificación del Ptaquilósido en agua por HPLC.</p> <p>Ficha técnica de los lugares muestreados en San Miguel de Bolívar.</p>	<p>Se cuenta con los equipos necesarios, las sustancias químicas de calidad para el análisis correspondiente, los materiales e insumos y la movilidad en tiempo y espacio requerido para cumplir con las actividades propuestas.</p> <p>Se cuenta con el financiamiento propuesto.</p>

<p>OBJETIVO 3.</p> <p>Obtener a nivel piloto la extracción de la Pterosina B con fines comerciales.</p>	<p>Obtener 100 gramos de Pterosina B con una pureza mayor al 80% en el plazo de 5 meses.</p>	<p>Producto terminado y envasado en viales con capacidad de 250 mg.</p>	<p>Los equipos requeridos instalados y en funcionamiento en un espacio físico adecuado. Se cuenta con las sustancias químicas en calidad y cantidad necesarias.</p>
<p>3.1.- extracción del Ptaquilósido y formación de Pterosina B según la metodología (Agnew y Lauren 1991) de marcha fitoquímica de extracción del ptaquilósido de su fuente vegetal de origen, <i>Pteridium arahnoides</i></p>	<p>Recolección del material vegetal en diferentes zonas de San Miguel de Bolívar.</p> <p>Equipos: balanza analítica; baño ultrasónico, calentador agitador orbital; rota- evaporador, estufa, centrifuga de tubos grandes; tijera de jardinero o guillotina.</p> <p>Sustancias químicas calidad para análisis: agua destilada y tipo I, éter de petróleo, hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, diclorometano. Resina de poliamide 6, carbón activado, metanol, hexano, acetato de etilo, cloruro de sodio.</p> <p>Materiales y cristalería: material e insumos apropiados para el ensayo de extracción del analito.</p> <p>Movilidad: Se requiere de un transporte para realizar los diferentes muestreos en San Miguel de Bolívar.</p> <p>Costo de financiamiento: \$930 USD.</p>	<p>Ficha técnica de recolección del material vegetal.</p> <p>Protocolo del procedimiento de extracción de la Pterosina B.</p> <p>Material fotográfico de muestreo realizado y procedimiento en el laboratorio.</p>	<p>Se cuenta con los equipos instalados y en funcionamiento en un espacio físico adecuado y con las sustancias química y materiales necesarios para cumplir con esta actividad.</p> <p>Se cuenta con la movilidad requerida para hacer los muestreos en tiempo y espacio.</p> <p>Se cuenta con el financiamiento propuesto.</p>
<p>3.2.- Purificación de la Pterosina B mediante las técnicas de: Cromatografía de columna a vacío empleando sílica como soporte u adsorbente, Cromatografía de Placa Delgada Preparativa, cristalizaciones sucesivas y lectura en Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)</p>	<p>Columnas apropiadas, columnas a vacío y equipo HPLC.</p> <p>Solventes y materiales: Metanol, diclorometano, acetato de etilo y hexano.</p> <p>Materiales e Insumos apropiados para la purificación.</p>	<p>Ficha técnica de procedimiento de purificación de la Pterosina B.</p>	<p>Existen las diferentes columnas de cromatografía y equipo HPLC para la purificación y las sustancias químicas de calidad y en cantidad adecuadas para cumplir con esta actividad.</p>
<p>3.3.- Pruebas de almacenamiento del producto terminado (Pterosina B).</p>	<p>Pruebas de humedad y conservación del producto a temperatura ambiente y en refrigeración (4 °C), prueba de almacenamiento en diferentes envases para la determinación de la vida útil en anaquel.</p>	<p>Fichas técnicas de control de pruebas del almacenamiento de la Pterosina B.</p>	<p>Se cuenta con el espacio físico adecuado para el almacenamiento del producto terminado.</p>

<p>3.4.- Costes de producción del producto terminado.</p>	<p>Establecimiento de la relación costo/beneficio del patrón obtenido.</p> <p>Rendimiento del ptaquilósido en la materia prima de origen y la producción de la Pterosina B a partir de la materia prima secundaria.</p>	<p>Fichas de control de producción del patrón.</p> <p>Ficha técnica de rendimiento del Ptaquilósido (gr/kg de fronde).</p> <p>Ficha técnica del cálculo de precio del producto terminado (Pterosina B).</p>	<p>El costo del producto no se afecta por el precio del mercado local/nacional.</p> <p>Se cuenta con personal profesional capacitado.</p>
<p>OBJETIVO 4</p> <p>Difundir los resultados del proyecto</p>	<p>La escritura de un manual técnico, un artículo científico, dos seminarios sobre la problemática del Ptaquilósido en leche y agua a los involucrados directo e indirecto y una ponencia internacional, en el plazo de 6 meses</p>	<p>Presentación física del ejemplar (libro incluyendo el Manual técnico y artículo científico). Registro de asistencia de los participantes al seminario taller sobre la temática dirigida a la población involucrada.</p>	<p>Se cuenta con el financiamiento adecuado y con la disponibilidad del tiempo requerido para realizar las actividades propuestas.</p>
<p>4.1.- Elaboración de un Manual técnico.</p>	<p>Uso de la información de fuentes primarias y secundarias Costo de financiamiento: \$ 500 USD.</p>	<p>Manuscrito del manual técnico para su revisión.</p>	<p>Se cuenta con el asesoramiento adecuado y personal profesional capacitado para cumplir con esta actividad.</p>
<p>4.2. Seminario sobre la temática dirigida a la población involucrada.</p>	<p>Seminarios sobre la problemática a la comunidad universitaria (estudiantes, docentes y administrativos) y productores ganaderos de San Miguel de Bolívar. Uso de material divulgativo y herramientas audiovisuales. Costo de financiamiento: \$ 2470 USD.</p>	<p>Registros de asistencia a los seminarios talleres.</p>	<p>La población involucrada asiste a los seminarios talleres planificados sobre la problemática.</p>
<p>4.3. elaboración de un artículo científico</p>	<p>Uso información de fuentes primarias y secundarias Costo de financiamiento: \$ 500 USD.</p>	<p>Manuscrito del artículo científico para ser publicado.</p>	<p>Personal profesional capacitado para realizar esta actividad.</p>
<p>4. 4 Difundir los resultados obtenidos ante el directorio del INEN y ponencia internacional.</p>	<p>Solicitar al INEN se inserte en las NTE-INEN una norma técnica obligatoria de control de calidad de la detección y cuantificación de la presencia del Ptaquilósido en la leche y agua como un requisito indispensable para que obtengan los registros sanitarios y sean considerados aptos para el consumo humano, respectivamente. Costo de financiamiento: \$5220 USD.</p>	<p>Entrevista con directivos del INEN. Informe de viajes realizados</p>	<p>Los directivos del INEN se concientizan sobre la problemática del fitotóxico en la leche y el agua y se comprometen al establecimiento de la norma técnica.</p>



ANEXO 2: CRONOGRAMA DE TRABAJO POR OBJETIVOS

ANEXO 3: PRESUPUESTO MENSUAL POR LÍNEAS DE
FINANCIAMIENTO

3) EQUIPOS												
Gastos necesarios en la adquisición de Equipos (Equipos: de Laboratorio; para construcción de prototipos de equipos y maquinarias; componentes para construcción de planta piloto; de desarrollo experimental; Maquinaria o componentes para mejoras en tecnología de procesos) indispensables y esenciales para el desarrollo y consecución de los objetivos del proyecto.												
Nombre: **												
Descripción Corta: **												0,00
Cantidad: **												0,00
Nombre: **												0,00
Descripción Corta: **												0,00
Cantidad: **												0,00
Subtotal												0,00

4) RECURSOS BIBLIOGRAFICOS Y SOFTWARE												
Gastos necesarios en la adquisición de Bibliografía especializada, software y licencias de uso considerados como indispensables y esencial para el desarrollo y consecución de los objetivos del proyecto.												
Nombre: ** Análisis químico e Instrumental moderno												
Descripción Corta: **										250,00		250,00
Cantidad: ** 1												250,00
Nombre: ** Fundamentos y Técnicas de Análisis Bliquoímico Instrumental												
Descripción Corta: **										250,00		250,00
Cantidad: ** 1												250,00
Subtotal												0,00
Subtotal												500,00

ANEXO 4: RESUMEN DEL PRESUPUESTO DEL PROYECTO

ANEXO 4

RUBROS	APORTES UEB	
	EFECTIVO	
	Año 1	Año 2
1. Remuneración recursos humanos (Director, Investigadores, Pasantes)		
2. Viajes Técnicos	4490	
3. Capacitación (cursos, seminarios)		
4. Equipos		
5. Recursos Bibliográficos y Software.	500	
6. Materiales y Suministros	11000	
7. Transferencia de resultados	7500	
8. Subcontratos y servicios	2510	
Total	26000	
Porcentajes	100	