

Artículo científico

Consumo de Helecho Macho (*Pteridium caudatum*) e inocuidad láctea en bovinos de Coto Brus, Puntarenas¹

Daniela Burgos-Álvarez², Alejandro Chacón-Villalobos³, Luis A. Villalobos-Villalobos⁴

RESUMEN

Los compuestos antinutricionales contenidos en plantas pueden asociarse con una afectación a través del consumo de sus productos derivados, tanto en la salud animal como en la humana. El ptaquilósido presente en helechos *Pteridium caudatum* (L.) Maxon es un ejemplo. El objetivo de esta investigación fue determinar evidencia de consumo de *Pteridium* por bovinos lecheros y cuantificar el contenido de ptaquilósido presente en leche. Se evaluaron dos fincas lecheras ubicadas en Coto Brus, Puntarenas, entre enero y julio de 2019. Los hatos en ambas fincas contaban con patrón multirracial predominante con cruces de raza Holstein, Jersey y Simbrah. Se determinó una producción de biomasa en los potreros de pastoreo de 1,4-2,3 ton MS/ha para *Brachiaria humidicola* y 1,7-1,9 ton MS/ha de forraje *Brachiaria brizantha*, con suelos de tipo andisol un pH de 6,3; acidez de 0,13 cmol(+)/L y 0,15 cmol(+)/L; CICE de 12,52 cmol(+)/L y 9,48 cmol(+)/L; y con un porcentaje de cobertura del helecho *Pteridium caudatum* (L.) Maxon de 15-19% y 13-15%, en las fincas 1 y 2 respectivamente. En ambas fincas, el ganado mostró una preferencia de consumo del helecho en estados fenológicos tempranos, etapas en las que los contenidos de ptaquilósido son mayores (253-1138 mg/Kg/MS), expresados como pterosina B. El contenido de ptaquilósido encontrado en leche (0,39-0,91 mg/L) en este estudio, es evidencia indirecta del

¹Este trabajo formó parte del proyecto de investigación "Estudio de la estabilidad y prevalencia de ptaquilósido en leche bovina y en subproductos lácteos procesados". N°737-B8211, inscrito en la Vicerrectoría de investigación de la Universidad de Costa Rica.

²Escuela de Zootecnia, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. Correo electrónico: dani_burgos21@hotmail.com

³Estación Experimental Alfredo Volio Mata, Universidad de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. Autor para correspondencia: alejandro.chacon@ucr.ac.cr

⁴Universidad de Costa Rica, Escuela de Zootecnia, Centro de Investigación en Nutrición Animal, San José, Costa Rica. Correo electrónico: luis.villalobosvillalobos@ucr.ac.cr

Recibido: 02 mayo 2021

Aceptado: 02 septiembre 2021

Esta obra está bajo licencia internacional Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObrasDerivadas 4.0.



consumo por parte de los animales. La presencia de *Pteridium* en potreros pastoreados por vacas en producción debe controlarse para evitar su potencial transferencia a productos lácteos.

Palabras Clave: *Pteridium*, ptaquilósido, antinutriente, ganado lechero, calidad de la leche, inocuidad de la leche, compuestos secundarios.

ABSTRACT

Consumption of Male Fern (*Pteridium caudatum*) and dairy safety in cattle from Coto-Brus, Puntarenas.

Antinutritional compounds in plants can be associated with an effect on both livestock and human health, through the consumption of derived products. The ptachyloside contained in *Pteridium caudatum* (L.) Maxon ferns is an example. The objective of this research was to assess the consumption of *Pteridium* by dairy cattle and quantify the content of ptachyloside in milk. Two dairy farms located in Coto Brus, Puntarenas, were evaluated, from January through July 2019. The breeds utilized in both farms consisted of a multiracial pattern of Holstein, Jersey and Simbrah crosses. Biomass yields in grazing paddocks were 1.4-2.3 ton DM/ha for *Brachiaria humidicola* and 1.7-1.9 ton DM/ha for *Brachiaria brizantha*. The soils were andisols with a pH of 6.3, acidity of 0.13 cmol (+)/L and 0.15 cmol (+)/L, CICE of 12.52 cmol (+)/L and 9.48 cmol (+)/L and with a coverage percentage of fern *Pteridium caudatum* (L.) Maxon of 15-19% and 13-15%, in farms 1 and 2 respectively. In both farms, livestock showed a greater preference for consumption of the fern in early phenological stages, which also contained higher amounts of ptachyloside (253-1138 mg/Kg/DM), expressed as pterosin B. The content of ptachyloside found in milk (0.39-0.91 mg/L) in this study, is indirect evidence of consumption from livestock. The presence of *Pteridium* in pastures grazed by lactating cows must be controlled to avoid its potential transference to dairy products.

Keywords: *Pteridium*, ptachyloside, antinutrient, dairy cattle, milk quality, milk innocuity, secondary compounds.

INTRODUCCIÓN

El género de helechos *Pteridium* es una de las cinco plantas más abundantes a nivel mundial (Calderón et al., 2014), en Costa Rica se presentan tres especies que son *Pteridium arachnoideum* (Kaulf.) Maxon, *Pteridium caudatum* (L.) Maxon y *Pteridium feei* (Marrero y Calderón, 2012); se pueden encontrar en altitudes desde los 600 hasta los 3200 m.s.n.m (Verde et al., 2017). Dichas plantas tienen una buena capacidad para tomar nutrientes del suelo, alta resistencia a microorganismos e insectos, y buena adaptación a situaciones de estrés como diferentes densidades de luz (Marrero y Calderón, 2012).

Los helechos del género *Pteridium* presentan potencialidad toxicológica, ya que contienen compuestos carcinogénicos, inmunosupresores, clastogénicos y mutagénicos; como el ptaquilósido (Rodríguez, 2017), que en un medio ácido se transforma en pterosina B, y en dienona en un medio alcalino (Cáceres et al., 2012; Oliveros y Alonso-Amelot, 2002; Rincón et al., 2016). Un 1% aproximado del peso seco del helecho corresponde a ptaquilósido, alojado en diversas partes de la planta como las raíces, los rizomas y las frondas; estas últimas reportan contenidos entre 2145-5800 µg/g de ptaquilósido (Holm et al., 2013).

La ingesta de ptaquilósido por parte de los animales provoca que este compuesto se excrete en leche. Sin embargo, a largo plazo se acumula en el organismo provocando afecciones como la hematuria vesical enzoótica bovina, que puede presentarse y no ser percibida (microhematuria) o presentarse como sangre en orina (macrohematuria), ocasionando anemia e incluso la muerte del animal (Rodríguez, 2017). Otras afectaciones que pueden ocurrir son hemorragias cutáneas, úlceras, neoplasias, petequias, anorexia, tumores y una mayor incidencia del virus del papiloma bovino (Da Silva, 2017; García et al., 2017; Holm et al., 2013; López, 2010; Rodríguez, 2017).

El consumo de ptaquilósido tiene consecuencias negativas sobre la salud pública, ya que se ha demostrado que puede ocasionar cáncer de esófago y gástrico en humanos (Gomes et al., 2012), al promover la apoptosis de las células epiteliales gástricas (Gomes et al., 2012; Holm et al., 2013; Rincón et al., 2016). En Costa Rica, Bonadies et al. (2011), determinaron que la tasa de incidencia de estos padecimientos es dos veces mayor en personas residentes de zonas con alta presencia del

helecho y, por ende, mayor probabilidad de exposición a la toxina, en comparación con personas que viven en zonas libres de esta planta. La ingesta del ptaquilósido puede darse por consumo de derivados, como la carne y la leche provenientes de animales que han consumido directamente el helecho (Calderón et al., 2014; Oliveros et al., 2015; Tourchi, 2014); por medio de la ingesta de agua que contenga el compuesto (Ramwell et al., 2010; Tourchi, 2014); o la respiración de esporas que circulen en el ambiente (Holm et al., 2013).

El objetivo de esta investigación fue estudiar si el helecho del género *Pteridium* es consumido por bovinos lecheros, así como determinar y cuantificar el contenido de ptaquilósido excretado en leche, dada su toxicidad y efectos sobre la salud humana y animal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización

La fase experimental se llevó a cabo en dos fincas lecheras ubicadas en los distritos de Sabalito y Agua Buena, del cantón Coto Brus, provincia de Puntarenas, en Costa Rica, América Central, durante los meses de enero a diciembre del año 2019.

La Finca 1 se encuentra en el sector de Cañas Gordas de Agua Buena de Coto Brus, a una altitud mínima de 1069 m.s.n.m. y máxima de 1182 m.s.n.m., con temperatura promedio de 21,2 °C y una precipitación aproximada de 3458 mm por año. Tiene una extensión de 6,1 hectáreas, divididas en 10 potreros con un área promedio de 6100m² cada uno, y tiene una alta degradación de pasturas debido a la presencia de malezas de hoja ancha y pastos invasivos como *Andropogon bicornis* (cola de venado), *Sporobolus poiretii* (pitilla), *Brachiaria humidicola*, *Homolepsis aturensis* (paja amarga) y *Paspalum conjugatum* (zacate amargo). El hato de esta finca tiene un patrón multirracial, con la predominancia de las razas Holstein, Jersey y Simbrah; el sistema es basado en

pastoreo como única fuente de alimento, logrando una producción láctea diaria promedio de 9-10 litros de leche por animal, con cuatro vacas en ordeño.

La Finca 2 se ubica en el pueblo de Valle Hermoso del cantón Sabalito de Coto Brus y presenta una altitud mínima de 880 m.s.n.m. y máxima de 993 m.s.n.m., una precipitación anual de 3609 mm y una temperatura promedio de 22,1 °C. El área dedicada al ganado lechero es de cuatro hectáreas divididas en 11 potreros con un área promedio de 3631 m². La dieta de los animales consiste principalmente de pastoreo de *Brachiaria brizantha*. Sin embargo, los animales consumen una pequeña cantidad de alimento balanceado al momento del ordeño que a veces se suplementa con harina de coquito, dependiendo de su disponibilidad. Igualmente, cuenta con ocho vacas en ordeño con patrón multirracial y una producción diaria de 10-12 litros de leche por vaca.

Análisis del suelo

En cada finca se realizó un análisis de suelos, para cada uno se tomaron 15 submuestras utilizando un barreno a 15-20 cm de profundidad (Schweizer, 2011), recorriendo el terreno en forma de zigzag y descartando áreas atípicas. Con el fin de obtener una muestra compuesta, cada submuestra se depositó en un balde y se cuarteó, lo que resultó en 500-1000 g a los que se les realizó un análisis de suelo químico completo con materia orgánica por medio del método KCI-OLSEN+CN (Salazar, 2015). Las muestras de suelos fueron analizadas en el Laboratorio de Suelos y Foliar del Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA) de la Universidad de Costa Rica.

Cálculo de área destinada al pastoreo y determinación de biomasa

Para la determinación del área de cada potrero se utilizó un GPS marca Garmin, modelo GPSMAP-62s y se elaboraron mapas del área destinada a pasturas dentro de cada finca usando el programa *MapSource* versión 6.16.3. Se estimó la disponibilidad de biomasa en potreros muestreando cinco puntos aleatorios con una edad de cosecha de 19 y 20 días para la Finca 1 y 2 respectivamente. Las muestras fueron cosechadas a una altura de 5 cm del nivel del suelo, utilizando un marco de 0,5m x 0,5m por potrero. Se realizaron muestreos en un potrero con poca abundancia y en otro con mucha abundancia de helecho *Pteridium caudatum* (L.) Maxon en condiciones prepastoreo

durante época seca (enero), transición (abril) y lluviosa (julio). Cada muestra fue pesada de manera individual, luego se calculó un promedio total y se estimó la biomasa fresca por hectárea. En cada muestreo se tomó una muestra compuesta de 1 kg y se secó en un horno de convección a 60°C por 48 horas, para obtener su contenido de materia seca y la posterior estimación de la producción de biomasa seca por hectárea del pasto.

Muestreo del helecho

La recolección del helecho se basó en la clasificación fenológica realizada por Borges et al. (2013), en estado fenológico inicial (II-rebrote) y en los dos estados fenológicos tardíos o de frondas maduras (III-juvenil y IV-adulto); esto se debió a que, de acuerdo con Rincón et al. (2016), los estados fenológicos iniciales presentan un mayor contenido de ptaquilósido. Las muestras se almacenaron a una temperatura de 4°C para luego ser enviadas a los laboratorios del Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas (CENIBiot), en donde fueron liofilizadas, procesadas y cuantificadas por el método de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) ultravioleta con arreglo de diodos (Calderón et al., 2014).

Determinación del porcentaje de cobertura y consumo del helecho

La determinación del porcentaje de cobertura se realizó en la época lluviosa (julio), transición (abril) y seca (enero). Se seleccionaron de forma aleatoria cuatro potreros por finca para establecer la cantidad de helecho aparente. Estos potreros se clasificaron visualmente y empleando criterios agrostológicos por medio de la estimación de la composición botánica de las pasturas, de forma que quedaran dos con una alta presencia y dos con baja presencia del helecho. Cada uno de los potreros se dividió de manera visual en cuatro bloques y en cada uno se lanzó 10 veces, y de forma aleatoria, un marco de 1m x 1m (dimensiones elegidas para abarcar los helechos más grandes), luego se capturó una foto de cada marco y se evaluó el porcentaje de cobertura en cada una utilizando una cuadrícula virtual compuesta por 100 cuadros de 2cm x 2cm cada uno. Con los resultados obtenidos se estimó el porcentaje de cobertura total del área de pastoreo en cada finca al sustraer el porcentaje de cobertura de helecho (Villalobos, comunicación personal, 2018).

El cálculo del consumo de helecho se llevó a cabo de manera observacional en épocas lluviosa, transición y seca. Se determinó por medio de fotos tomadas a los helechos que quedaron en los marcos de 1m x 1m, antes y después del pastoreo, en el que los animales consumían esta planta en el potrero. Asimismo, se evaluó de forma cualitativa la integridad de las frondas de los helechos en cada foto, prestando especial atención a la ausencia de partes de las frondas o de rebrotes.

Análisis bromatológico de forrajes y de helecho *Pteridium caudatum*

Las muestras compuestas de un kilogramo de forraje tomadas en los meses de abril y julio para cada finca fueron analizadas en el laboratorio de Bromatología de la Estación Experimental Alfredo Volio Mata. Se determinó el contenido de materia seca, proteína cruda y extracto etéreo (AOAC, 2019), y el contenido de las fracciones de la pared celular por medio de fibra detergente neutro, fibra detergente ácida y lignina (Lourenço et al., 2017). Dichos análisis se realizaron en una muestra de helecho *Pteridium caudatum* en estado fenológico maduro (adulto).

Análisis del contenido porcentual de ptaquilósido en leche

Se analizó el contenido de ptaquilósido presente en muestras de leche tomadas del tanque de cada finca en las épocas lluviosa, de transición y seca, lo que resultó en un total de tres muestras por finca. Las muestras se recolectaron 96 horas después del presunto consumo, momento en el que se obtienen cantidades máximas de ptaquilósido estable en leche, según lo reportado por Alonso-Amelot y Avendaño (2002). El análisis de las muestras se llevó a cabo por medio del método de detector de arreglo de diodos con cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC (Calderón et al., 2014) y se realizó en el CENIBiot.

Análisis de información

La información de biomasa, porcentaje de cobertura y concentración del ptaquilósido fue analizada por medio de estadística descriptiva.

RESULTADOS

Los análisis de los suelos muestreados en ambas fincas y en potreros con presencia del helecho, se muestran en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Resultado de análisis de suelo realizado en las dos fincas experimentales del cantón de Coto Brus.

Finca Evaluada	Componente Analizado											
	pH	SA(%)	cmol(+)/L					mg/L				
			Acidez	Ca	Mg	K	CICE	P	Zn	Cu	Fe	Mn
Finca 1	6,3	1	0,13	10,77	1,51	0,11	12,52	1	0,5	14	55	15
Finca 2	6,3	2	0,15	6,72	2,22	0,39	9,48	1	3,9	20	71	25
Valor Crítico	5,5	-	0,50	4,00	1,00	0,20	5,00	10	3	1	10	5

CICE= capacidad de intercambio catiónico, SA= saturación de acidez.

La Figura 1 muestra los porcentajes de cobertura de helecho obtenidos para cada una de las fincas abordadas con respecto al periodo del año en que se efectuó dicha determinación.

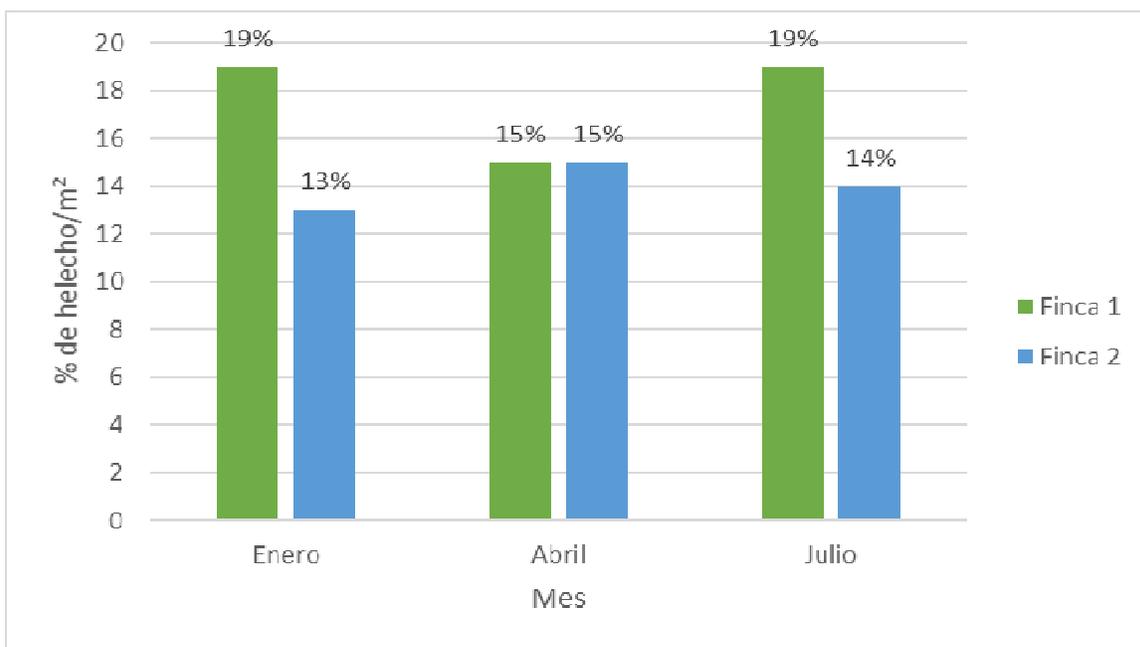


Figura 1. Porcentaje de cobertura de helecho en las fincas del cantón de Coto Brus, en el periodo de enero-julio 2019. San José, Costa Rica. Enero 2019-Diciembre 2019.

La cobertura media a lo largo del periodo total fue de 17,7% para la Finca 1 y de 14% para la Finca 2. El comportamiento a lo largo de los meses no fue uniforme entre fincas, ya que en la Finca 1 se registró un declive de cuatro puntos porcentuales en la cobertura en abril, y aumentó de nuevo a 19% en julio. Por otro lado, la Finca 2 tuvo valores similares entre muestreos, habiendo una diferencia de dos puntos porcentuales en el valor máximo y mínimo encontrado.

La estimación de biomasa en toneladas de materia seca/ha se puede observar en la Figura 2, en la cual, en la Finca 1, la mayor parte de la biomasa estimada pertenece a la especie *Brachiaria humidicola* (con edad de cosecha de 19 días), mientras que la Finca 2 poseía mayor biomasa de la especie *Brachiaria brizantha* (con edad de cosecha de 20 días) (Rodríguez, comunicación personal, 2019).

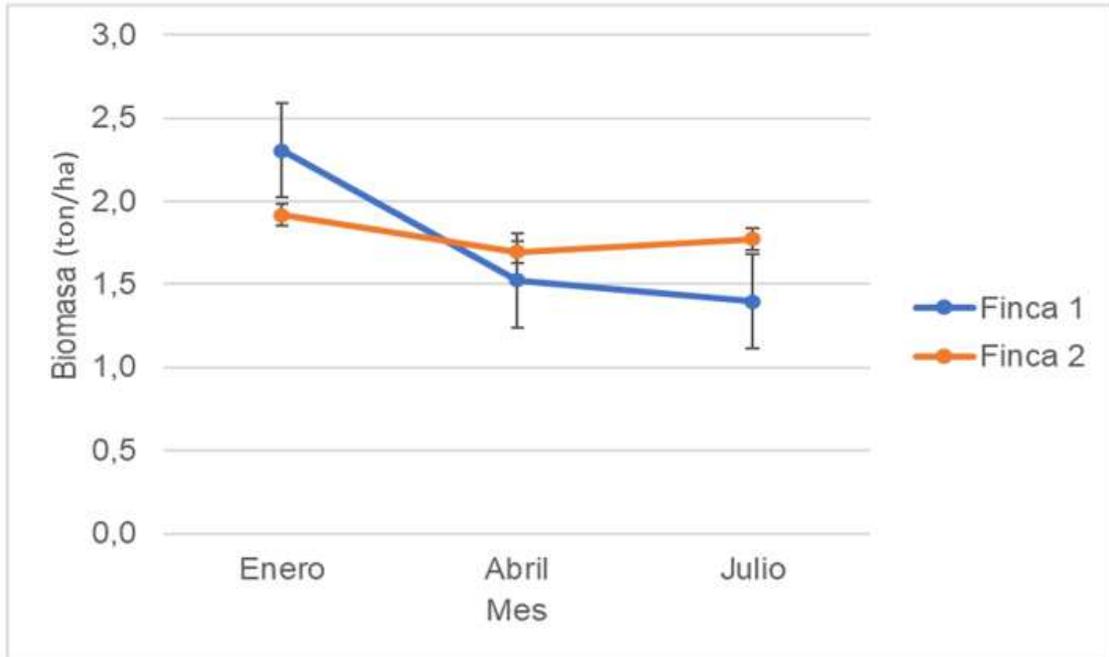


Figura 2. Biomasa estimada en área de pastura de cada finca del cantón de Coto Brus, en el periodo enero-julio. San José, Costa Rica. Enero 2019-Diciembre 2019.

Los resultados del análisis bromatológico realizado a los dos tipos de forrajes, *Brachiaria humidicola* (Finca 1) y *Brachiaria brizantha* (Finca 2), se pueden observar en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Resultado de análisis bromatológico de los forrajes *Brachiaria humidicola* (Finca 1) y *Brachiaria brizantha* (Finca 2), según mes del año. San José, Costa Rica. Enero 2019-Diciembre 2019.

Forrajes	Valores porcentuales de los parámetros bromatológicos (%)				
	Mediciones de abril				
	MS	PC	FDN	FDA	Extracto Etéreo
<i>Brachiaria humidicola</i>	32,22	9,21	56,07	31,72	2,06
<i>Brachiaria brizantha</i>	23,98	9,61	56,33	34,18	1,73
	Mediciones de julio				
	MS	PC	FDN	FDA	Extracto Etéreo
<i>Brachiaria humidicola</i>	23,08	9,65	53,73	31,45	3,46
<i>Brachiaria brizantha</i>	20,53	9,65	58,82	34,97	1,56

MS=materia seca; PC= proteína cruda; FDN= fibra detergente neutro; FDA= fibra detergente ácido

El análisis bromatológico correspondiente al helecho entero de la variedad *Pteridium caudatum* existente se muestra en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Valores de los componentes evaluados en el análisis bromatológico de planta entera *Pteridium caudatum*. Enero 2019-Diciembre 2019.

Componente	Valor Porcentual (%)
Materia Seca (MS)	34,10
Proteína Cruda (PC)	14,65
Fibra detergente neutro (FDN)	54,40
Fibra detergente ácido (FDA)	41,53
Lignina	17,53

Las concentraciones de ptaquilósido expresadas como pterosina B (PTB) según el estado fenológico del helecho se muestran en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Concentración promedio de PTB (mg/kg) según estado fenológico del helecho *Pteridium caudatum*. Enero 2019-Diciembre 2019.

Finca	Estado Fenológico	Concentración promedio de PTB (mg/kg) según mes					
		Enero		Abril		Julio	
		Valor	D.E.	Valor	D.E.	Valor	D.E.
1	II	532	18	553	11	420	81
	III	562	21	786	100	253	74
	IV	107	8	131	22	228	72
2	II	1138	100	623	23	120	25
	III	508	11	656	5	139	42
	IV	524	36	217	41	36	8

D.E: Desviación estándar.

La mayor concentración de pterósina B correspondió a los estados fenológicos juveniles (II y III), mientras que en el estado IV, el contenido de pterósina B fue menor. Las concentraciones menores en ambas fincas, sin distinción de fenología, correspondieron al mes de julio.

La Figura 3. muestra ejemplos selectivos en el consumo de los helechos por parte del ganado lechero de las fincas evaluadas. Se encontró una mayor preferencia por los rebrotes con respecto a las frondas maduras, que permanecieron intactas. Este comportamiento fue uniforme entre fincas y a lo largo de todo el periodo de medición, sin importar la época del año.



Figura 3. Ausencia de rebrotes en helechos, a causa del consumo animal. Enero 2019-Diciembre 2019.

La concentración de ptaquilósido detectada en mg/L para las muestras de leche de cada finca a lo largo del período experimental se muestra en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Concentración promedio de ptaquilósido (mg/L) en leche obtenida por cuantificación con HPLC-DAD 260 nm. Enero 2019-Diciembre 2019.

Finca	Concentración promedio PTA (mg/L) según mes		
	Enero	Abril	Julio
Finca 1	ND	0,44±0,05	0,4±0,1
Finca 2	0,91±0,26	0,39±0,05	0,61±0,03

ND: no detectado

PTA: ptaquilósido

DISCUSIÓN

El pH y la acidez intercambiable fueron similares en ambas fincas y mostraron valores mayores y menores a sus niveles críticos respectivamente. El CICE y elementos menores como Cu, Fe y Mn mostraron valores superiores a sus niveles críticos, lo cual es común para el segundo micromineral en suelos tropicales (Bertsch, 1998). El P y K se presentaron concentraciones menores al valor

crítico lo que es común en suelos andisoles caracterizados por estar presentes en zonas volcánicas como Coto Brus, que recibe cenizas del volcán Barú, en Panamá (Cubero, 2015).

Los helechos del género *Pteridium* se pueden adaptar a suelos de variadas composiciones físicas (arenosos y arcillosos) y químicas (pH entre 2,8-8,6); pudiendo encontrarse en órdenes entisoles y vertisoles, así como en suelos marrones permeables, podzoles ácidos, suelos secos, suelos con agua superficial y suelos artificiales (Milligan et al., 2018; Senyanzobe et al., 2021). Este género muestra mayor afinidad por suelos con pH de 3,5-5,5, una buena profundidad para que los rizomas puedan extenderse más de un metro y una adecuada disponibilidad de nitrógeno, potasio, fósforo y calcio (Jean, 2017). Méndez (2012) determinó que, para 337 muestras de suelo en la región de Coto Brus, un 67% presentó un pH menor al valor crítico de 5,5, un 37% resultó en un rango de pH de 5,5-6,5, y únicamente un 1% de las muestras presentaron un pH mayor a 6,5.

La capacidad efectiva de intercambio catiónico del suelo debe ser alta, ya que se considera un indicador del potencial de fertilidad y capacidad de retención de elementos con alto valor nutricional disponibles para las plantas. El sistema suelo debe ser capaz de mantener cargas negativas y atraer cargas positivas de iones como calcio (Ca^{++}), magnesio (Mg^{++}), potasio (K^+), sodio (Na^+), amonio (NH_4^+), aluminio (Al^{+++}) e hidrógeno (H^+). En ambas fincas la CICE fue mayor al valor crítico; sin embargo, valores entre 0-20 $\text{cmol}(+)/\text{L}$ se relacionan con suelos poco fértiles y contenidos bajos de materia orgánica (Chávez, 2015).

En lo que respecta a la acidez intercambiable, este parámetro corresponde al contenido de aluminio e hidrógeno intercambiable en el suelo. Cuando este valor sobrepasa los 0,5 $\text{cmol}(+)/\text{L}$ es común observar problemas en el crecimiento de las plantas, ya que su valor óptimo debe ser menor o igual a 0,3 $\text{cmol}(+)/\text{L}$ (Milton, 2016). La saturación de acidez es una medida porcentual del intercambio catiónico encontrado que se da por la ocupación del aluminio e hidrógeno, y en la cual valores mayores al 10% pueden afectar el crecimiento de plantas poco tolerantes al aluminio, mientras que las especies tolerantes a la acidez pueden tolerar valores máximos de hasta 60% (Castro y Munévar, 2013).

La región de Coto Brus es lluviosa con influencia monzónica y oceánica, lo que genera una alternancia de un régimen de lluvias intensas y épocas secas cortas (Ramírez de la Ribera et al., 2017). Debido a lo anterior, los contrastes en producción de biomasa a lo largo del periodo evaluado no son sorprendidos (Figura 1). Una baja disponibilidad de forraje puede modificar la presión de pastoreo sobre los forrajes de interés, contribuyendo así la degradación de la pastura y a una mayor propagación y consumo de malezas como el helecho macho (Álvarez et al., 2013; Blanco, 2012; Escalante, 2015).

La cobertura porcentual del helecho *Pteridium* en potreros puede ser afectada por diversos factores que potencien o supriman su crecimiento, como la precipitación o la radiación solar. En el caso de este helecho, Milligan et al. (2018) y Senyazobe et al. (2021) señalan que con suministro de agua y una mayor exposición a la radiación solar, el helecho puede aumentar su crecimiento, explicando las variaciones presentes en meses de época seca y época lluviosa. Los mismos autores indican que la capacidad adaptativa y competitividad de *Pteridium* le permite prevalecer sobre otras especies en épocas de condiciones desfavorables con suelos erosionados, baja fertilidad e incluso bajo condiciones de estrés. Las condiciones tropicales en la región de Coto Brus hacen que la humedad y temperatura no sufran variaciones estacionales extremas durante el año, favoreciendo así la liberación de esporas para su propagación y mayor prevalencia del helecho (Eslava et al., 2019).

La presión de pastoreo puede influir sobre la presencia del helecho en las fincas, según Alonso-Amelot (1998), el consumo del pasto (por su palatabilidad) por parte del ganado tiende a ejercer una presión por selección, favoreciendo el crecimiento de malezas. El manejo del forraje puede influir además sobre la presencia del helecho en las pasturas. En las dos fincas evaluadas se aplican dosis bajas de fertilización, lo cual puede desplazar los forrajes al haber un detrimento en la fertilidad de los suelos (Escalante, 2015).

La distribución localizada del helecho en ciertos sectores de los potreros, y su menor porcentaje de cobertura en la Finca 2, pueden atribuirse al manejo nutricional utilizado. Esta finca utiliza suplementación con harina de coquito a los animales al momento del ordeño, lo que podría

disminuir la presión sobre el pasto y, por consiguiente, podría presentar una mayor capacidad competitiva contra malezas como el helecho, principalmente en épocas críticas (Milligan et al., 2018; Senyanzobe et al., 2021).

Estos resultados permiten inferir que la presencia del helecho en potreros obedece a un efecto multifactorial y refuerza la importancia de ejercer un control integrado sobre este tipo de malezas, cuya capacidad adaptativa les permitirá prevalecer a lo largo del tiempo con cambios leves en cobertura de los potreros.

La Finca 1 cuenta con disponibilidad promedio de pasto por potrero de 421 kg//MS/día en el mes de enero y 256 kg//MS/día en el mes de julio, contemplando un aprovechamiento de 30% del pasto (Andrade, 2006). Si se estima un consumo de materia seca por parte de los animales de 2,2% del peso vivo (peso vivo promedio de 400 kg), esto se traduce en una demanda de 70,4 kg//MS totales (por cada cuatro vacas), durante los dos días de ocupación de cada potrero. En la Finca 2, la biomasa disponible fue 206,9 y 196,1 kg//MS/díapor potrero, para los meses de enero y julio respectivamente (considerando un 30% de aprovechamiento de pasto). Si se estima un consumo de MS de 2,1% del peso vivo, la demanda total de pasto durante los dos días de ocupación por potrero es de 134,4 kg//MS (por cada ocho vacas). Esta estimación permite deducir que los requerimientos de materia seca de los animales sí pueden ser cubiertos por la materia seca promedio producida en ambas fincas.

En cuanto a la producción anual de biomasa, la Finca 1 produce un promedio de 1,73 ton MS/ha que permite una rotación anual de 19 ciclos (33 ton MS/ha/año), coincidiendo con lo afirmado por Escobar y Rúa (2017) para *Brachiaria humidicola* (7 a 34 ton MS/Ha/año). En el caso de la Finca 2, la producción promedio de biomasa fue de 1,8 ton MS/ha, que permite realizar 18 ciclos (32 ton MS/ha/año), superando lo reportado por Peters et al. (2010) para *Brachiaria brizantha* (8 a 20 ton MS/ha/año).

Debido a que la presencia de *Pteridium* en ambas fincas se mantuvo relativamente constante durante el año (Figura 1), las estimaciones potenciales de disponibilidad de biomasa y asignación de materia seca deben considerar la cobertura de biomasa potencialmente consumible por el

ganado en pastoreo. De esta forma, la biomasa anual corregida por nivel de cobertura de pasto (100% - % cobertura helecho) es menor, mostrando en ambas fincas valores de 27 ton MS/ha/año. A partir de esta, se calculó la asignación de materia seca diaria por animal y la presión de pastoreo diaria en cada finca, obteniéndose valores de 108 kg MS/animal/día y 762,5 m²/animal/día para la Finca 1; y valores de 35 kg MS/animal/día y 227 m²/animal/día en la Finca 2.

Bajas cargas animales pueden resultar en un subpastoreo, que ocasionaría una producción excesiva de biomasa y de material senescente que no es consumido por los animales, lo que podría propiciar la aparición de malezas como el helecho. Una mayor intensificación en el uso del forraje a través una menor asignación de materia seca por animal al día y una mayor presión de pastoreo diaria, podrían disminuir la probabilidad de presencia de malezas. En este estudio se observó, en promedio, un porcentaje de cobertura de helecho mayor en la Finca 1, lo cual coincide con una asignación de materia seca por animal por día que triplica (27 % del PV) la oferta en la Finca 2 (8,75 % del PV); teniendo esta última un porcentaje de cobertura de helecho menor durante el período de evaluación (Figura 1).

El contenido de PC de los pastos de ambas fincas fue levemente superior a los valores de 7,7% y 8,70%, reportados en la literatura por Avella (2017), Jarma et al. (2012) y Balseca et al. (2015). Lo contrario ocurrió con la FDN y FDA, mostrando valores menores a los reportados por estos mismos autores (61,80%-69,64% FDN y 37,26%-48,90% FDA), mientras el extracto etéreo presentó valores similares. Contenidos altos de proteína y bajos de fibra suelen relacionarse con edades de cosecha menores y manejo de la cosecha (Cherney et al. 1993; Villalobos y WingChing, 2019).

El helecho evaluado presentó un contenido proteico superior (Cuadro 3) al de los pastos utilizados en ambas fincas (hasta 5% más), lo cual podría, aunque no sea deseable, llenar parte de los requerimientos nutricionales del ganado lechero (NRC, 2001) considerando la evidencia de su consumo (Figura 3). Los valores del análisis bromatológico concuerdan, según Borges et al. (2013), con los valores bromatológicos de un helecho *Pteridium* en estado fenológico joven, quienes obtuvieron valores de MS=35,60% y PC=14,41%.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se deduce que el consumo de rebrotes del helecho en las fincas experimentales se puede atribuir a su contenido nutricional, ya que tienen mayor contenido de PC que el pasto y los helechos de edad avanzada. Además, la velocidad de crecimiento de los pastos tropicales hace que su valor nutricional se vea disminuido rápidamente por un aumento de los carbohidratos estructurales al avanzar la madurez (González et al., 2011).

De igual forma, los rebrotes del helecho contienen menos taninos y están menos lignificados que los estados más maduros, lo que aumenta su palatabilidad y podría explicar su consumo por parte de los animales (Committee on Toxicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment, 2008).

Los valores obtenidos en el análisis bromatológico concuerdan, según Borges et al. (2013), con los valores bromatológicos de un helecho *Pteridium* en estado fenológico joven, quienes obtuvieron valores de MS=35,60% y PC=14,41%. Estos resultados refuerzan la teoría de que los animales consumen helecho en épocas de escasez de forraje, ya que, como se mencionó previamente, es una especie muy resistente a condiciones adversas.

Los contenidos de ptaquilósido encontrados en este estudio (Cuadro 4) coinciden con el rango reportado por Rincón et al. (2016) en Colombia (23-1194 mg/Kg). El contenido de ptaquilósido en la planta puede variar según la especie de helecho en consideración, las condiciones nutricionales del suelo, o incluso, dada la inestabilidad del compuesto, a la forma química en que este se encuentre (ptaquilósido, pterosina B, o dienona) (Rincón et al., 2016). La altitud puede influir sobre el contenido del ptaquilósido, mostrando concentraciones menores en las frondas del helecho a medida que aumenta este parámetro, especialmente por encima de los 1700 m.s.n.m. (Alonso-Amelot et al., 1998).

Debido a que en estados juveniles el contenido de ptaquilósido fue mayor (Figura 3), el control del helecho debe realizarse antes de que la planta alcance su etapa juvenil. La composición nutricional del helecho *Pteridium* varía considerablemente en términos de materia seca y proteína cruda de acuerdo con su estado fenológico, aumentando el primero y disminuyendo el segundo según pasa del estado de rebrote (MS=16%; PC=21,44%) a plántula joven (MS=35,6%; PC=14,41%) y planta

adulto (MS=43,30%; PC=12,3%) (Borges et al., 2013). Los mismos autores indican que el extracto etéreo (1%-2%) y la energía metabolizable (3,3 Mcal/Kg MS) son muy poco variables.

El consumo de helecho encontrado en ambas fincas puede atribuirse al contenido nutricional de los rebrotes (mayor contenido de PC), debido a que ambas fincas producen suficiente biomasa para llenar los requerimientos de materia seca de animales en producción. Asimismo, la preferencia por el rebrote también se puede atribuir a su alta palatabilidad por su bajo contenido de taninos y a que está menos lignificado que los estados maduros (Borges et al., 2013); lo que concuerda con el comportamiento de alimentación selectivo visto en el campo.

A nivel de literatura, las concentraciones de PTA (mg/L) en leche reportadas suelen ser muy variables. Autores como Calderón et al. (2014) obtuvieron en Ecuador concentraciones de ptaquilósido significativamente elevadas en comparación con las obtenidas en el presente estudio (1790 mg/L), que también difieren de los 250 mg/L reportadas por Reis et al. (2014) en Dinamarca. En el espectro inferior, Fisher et al. (2011) reportaron 22 mg/L en un estudio realizado en Suiza, mientras Bonadies et al. (2011) informaron de 1,5 mg/L en pruebas efectuadas en Italia.

El tiempo transcurrido desde el momento de la ingesta hasta la excreción de ptaquilósido en leche indica que éste se puede detectar 38 horas post ingestión, alcanzándose un pico alrededor de las 96 horas en ingestas sostenidas, o bien empezando a decrecer 86 horas después de realizada la última ingestión (Alonso-Amelot et al., 1998). Existe además una correlación lineal significativa ($r^2=0,98$) entre la biomasa de helecho consumida y la cantidad que se manifiesta posteriormente en la leche, al alcanzarse el pico máximo (Aranha et al., 2014).

Los resultados de ptaquilósido en leche obtenidos en esta investigación son bajos en comparación a las concentraciones obtenidas por otros investigadores. Si bien en este estudio no se estimó el consumo de helecho por los animales, su presencia en los potreros debe controlarse para evitar el posible consumo que está ocurriendo, demostrado por el contenido de ptaquilósido en leche y su potencial toxicológico.

CONSIDERACIONES FINALES

El presente estudio refleja que en fincas en las que el manejo de pasturas no incluye el control del helecho *Pteridium* en los potreros, puede haber consumo de este por el ganado, principalmente en épocas de escasez de forraje. La mayor ingesta se da en estados fenológicos juveniles del helecho, durante los cuales el contenido de ptaquilósido es mayor.

Se detectó el ptaquilósido en leche de vacas que consumen el helecho *Pteridium* en bajas concentraciones de 0,39mg/L hasta 0,91 mg/L, por lo que se debe concientizar a los productores de áreas rurales sobre los peligros del consumo de este tipo de malezas por parte de sus animales. Su consumo representa un problema de salud animal y un riesgo para la salud pública por su transferencia del ptaquilósido a productos de consumo humano y su potencial efecto toxicológico.

Debido a la detección de ptaquilósido en leche, se recomienda que las empresas encargadas de su recolección empleen métodos de detección de este compuesto como medida de prevención, así como la evaluación de la invasión de esta maleza en los potreros.

LITERATURA CITADA

Association of Officiating Analytical Chemists(AOAC). 2019. Official methods of Analysis (OMA). Edición N° 21.

Alonso-Amelot, M.E., Castillo, U., Smith, B.L., y Lauren, D. 1998. Excreción, a través de la leche, de ptaquilósido en vacas alimentadas con helechos. Una evaluación cuantitativa (en inglés). Le Lait, INRA Editions, 78(4): 413–423.

Alonso-Amelot, M.E., y Avendaño, M. 2002. Carcinogénesis humana y helecho macho: una revisión de la evidencia (en inglés). Sexta Edición, Volumen 9, Current Medicinal Chemistry, 9: 675–686.

- Álvarez, A., Herrera, R.S., Diaz, L., y Noda, A. 2013. Influencia de las precipitaciones y la temperatura en la producción de biomasa de clones de *Pennisetumpurpureum*. Revista Cubana de Ciencia Agrícola, 47(4): 413–417.
- Andrade, M. 2006. Evaluación de técnicas de manejo para mejorar la utilización del pasto kikuyo (*Pennisetumclandestinum*Hochst. ex Chiov) en la producción de ganado lechero de Costa Rica. Tesis Licenciatura. Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.
- Aranha, P. C., Rasmussen, L. H., Hansen, H. C. B., Strobel, B. W., y Friis, C. 2014. Determinación de ptaquilósido y pterosina B derivados de helechos (*Pteridiumaquilinum*) en plasma, orina y leche de ganado (en inglés). Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, (1): 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.01.022>
- Aranha P. C., Rasmussen, L. H., Wolf, G.A., Jensen, H., Hansen H.C., y Friis, C. 2019. Destino del ptaquilósido, una toxina del helecho macho, en el ganado (En Inglés). PLoS ONE 14(6): <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218628>
- Avella, L. 2017. Análisis de la composición nutricional de *Brachiariahumidicola* y *Brachiariatoledo* en el pie de Monte Llanero. Participación en proyecto de investigación "Implementación de un modelo de partos estacionales en un sistema de cría/doble propósito bovino en el Piedemonte Llanero". Universidad de La Salle. Bogotá, Colombia.
- Bertsch, F. 1998. La fertilidad de los suelos y su manejo. Primera Edición. Asociación Costarricense de la Ciencia del Suelo. San José, Costa Rica. 157p.
- Blanco, F.J. 2012. Valores analíticos de ganado vacuno en régimen extensivo expuesto al consumo de helechos. Tesis. Doctorado. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.
- Bonadies, F., Berardi, G., Nicoletti, R., Romolo, F., De Giovanni, F., Marabelli, R., Santoro, A., Raso, C., Tagarelli, A., Roperto, F., Russo, V., y Roperto S. 2011. Un nuevo método muy sensible de evaluación de ptaquilósido, el principal carcinógeno de helechos en la leche de animales de granja (en inglés). FoodChemistry, 124: 660–665. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.059>

- Borges, A., Domínguez, L., Camacaro, O., y Graterol, A. 2013. Composición bromatológica de *Pteridiumaquilinum* subs. *Arachnoideum* colectado en el municipio Bolívar, estado Yaracuy, Venezuela. *Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)*, 30: 431–440.
- Cáceres, Y., Naya, M., Calcagno, M., y Alonso, M. 2012. Influencia del pretratamiento de helecho (*Pteridiumcaudatum* L. Maxon) sobre el rendimiento de extracción de glicósidos y pterosinas de Illudane (en inglés). *Phytochemical Analysis*, 24: 290–295. <https://doi.org/10.1002/pca.2409>
- Calderón, A., Sánchez, L., Mancebo, B., Marrero, E., Chiriboga, X., y Silva, J. 2014. Residualidad del ptaquilósido en la leche procedente de granjas bovinas en tres cantones de la provincia Bolívar, Ecuador. *Revista de Salud Animal*, 36(1): 23–24.
- Castro, H., y Munevar, O. 2013. Mejoramiento químico de suelos ácidos mediante el uso combinado de materiales encalantes. *Revista U.D.C.A. Actualidad & Divulgación Científica*, 16(2): 409–416. <https://doi.org/10.31910/rudca.v16.n2.2013.913>
- Chávez, R. 2015. Comparación de dos métodos de determinación de la capacidad de intercambio catiónico en suelos de la región central de Honduras. Tesis Licenciatura, Universidad del Zamorano. Zamorano, Honduras.
- Cherney, D. J. R., Cherney, J. H., y Lucey, R. F. 1993. Cinética de la digestión in vitro y calidad de los pastos perennes según la influencia de la madurez del forraje (en inglés). *Journal of Dairy Science*, 76(3), 790–797. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77402-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77402-0)
- Committee on Toxicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment. 2008. Declaración sobre el riesgo para los consumidores de ingerir alimentos derivados de animales que han comido helecho (en inglés). <https://cot.food.gov.uk/sites/default/files/cot/cotstatementbracken200805.pdf> (Consultado 2 de abril, 2018).

- Cubero, D. 2015. Suelos de Costa Rica Orden Andisol: boletín técnico. <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/Av-1828.PDF> (Consultado 15 de marzo, 2020).
- Da Silva, C. 2017. Contribución a la caracterización del sistema agrícola de la isla de Faial, Archipiélago de las Azores (en Portugués). Tesis Maestría. Universidad de Lisboa. Lisboa, Portugal.
- Escalante, M.A. 2015. Estado de degradación de las pasturas de la asociación de ganaderos de Aucayacu-La Morada. Tesis Licenciatura, Universidad de La Selva. Perú.
- Escobar, M., y Rúa, M. 2017. Ficha técnica de *Brachiariahumidicola*. En: Catálogo de Gramíneas. Herbario de Cultura Empresarial Ganadera (CEG) Internacional. Colombia. <https://culturaempresarialganadera.files.wordpress.com/2017/01/ft-brachiaria-humidicola-ceg-2017.pdf> (Consultado 13 de septiembre, 2019).
- Eslava, F., Jiménez, K., Estrada, M., y Muñiz, M. 2019. Morfo-anatomía del ciclo de vida del helecho *Pteridiumaquilinum*(*Dennstaedtiaceae*) en cultivo in vitro. Rev. Biol. Trop., 68(1): 12–22.
- Fischer, W.J., Schilter, B., Tritscher, A.M., y Stadler, R.H. 2011. Contaminantes de la leche y los productos lácteos: Contaminantes ambientales (en Inglés). <https://kundoc.com/pdf-contaminants-of-milk-and-dairy-products-environmental-contaminants-.html> (Consultado 30 de septiembre, 2019).
- García, R., Quiles, A., Hevia, M., y Míguez, M. 2017. Agentes causales de intoxicaciones mortales en ganado bovino en España. Información Técnica Económica Agraria, 20: 1–16.
- Gomes, J., Magalhaes, A., Michel, V., Amado, I., Aranha, P., Ovesen, R., Hansen, H., Gartner, F., Reis, C.A., y Touati, E. 2012. *Pteridiumaquilinum* su toxina ptaquiloside inducen una respuesta al daño del ADN en las células epiteliales gástricas, un vínculo con la carcinogénesis gástrica (en inglés). Toxicological Sciences, 126(1): 60–71. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr329>

- González, I., Betancourt, M., Fuenmayor, A., y Lugo, M. 2011. Producción y composición química de forrajes de dos especies de pasto Elefante (*Pennisetum* sp.) en el Noroccidente de Venezuela. *Zootecnia Tropical*, 29(1): 103–112.
- Hernández, S. 2010. Importancia de la fibra en la alimentación de los bovinos. Tesis Licenciatura, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Michoacán, México.
- Holm, L., Schmidt, B., y Sheffield, E. 2013. Ptaquilósido en esporas de helechos de Gran Bretaña (En Inglés). *Chemosphere*, 90: 2539–2541. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.10.092>
- Jarma, A., Maza, L., Pineda, A., Ciodaro, y J. 2012. Aspectos fisiológicos y bromatológicos de *Brachiariahumidicola*. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 7(1): 88-99.
- Jean, A. 2017. Efecto de la invasión de *Pteridiumaquilinum* (L.) Kuhn (helecho), sobre las propiedades físico-químicas del suelo y la diversidad vegetal en el estado de Quintana Roo. Tesis. El Colegio de la Frontera Sur. México.
- López, Y.A. 2010. Diagnóstico de hematuria enzoótica bovina en ganado de agostadero en el norte del estado de Durango. Tesis Licenciatura, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Coahuila, México.
- Lourenço, M.S., Messana, J.D., Sader, A.P., Canesin, R.C., Malheiros, E.B., Castagnino, P.S., y Berchielli, T.T. 2017. Comparación de métodos de laboratorio para evaluar el contenido de fibra en los piensos (en inglés, con resumen en Español). *Rev.Colomb.Cienc.Pecu.*, 30:21–29.
- Marrero, E., y Calderón, A. 2012. Plantas tóxicas e inocuidad alimentaria: Hematuria Enzoótica Bovina por *Pteridium* spp. un problema relevante de salud. *Rev. Salud Anim*, 34(3): 137–143.
- Méndez, J.C. 2012. Estudio de la fertilidad de los suelos de Costa Rica con base en los registros de los análisis de los laboratorios de suelos y foliares del CIA/UCR durante el periodo 2006-2010. Tesis Licenciatura, Universidad de Costa Rica. San Pedro, Costa Rica.

- Milligan, G., Booth, K.E., Cox E.S., Pakeman, R.J., Le Duc, M.G., Connor, L., Blackbird, S., y Marrs, R.H. 2018. Cambio de las propiedades del ecosistema cambiando la dominante especie: Impacto de *Pteridium aquilinum*-control y brezales tratamientos de restauración en propiedades de suelo seleccionadas (en Inglés). *Journal of Environmental Management*, 207:1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.11.013>
- Milton, T. 2016. Manejo de suelos ácidos de las zonas altas de Honduras: conceptos y métodos. Primera Edición. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). Honduras.
- National Research Council (NRC). 2001. Requerimientos de nutrientes del ganado lechero (en inglés). Séptima Edición. The National Academies Press. Washington, Estados Unidos.
- Oliveros, A., Calcagno, M., Naya, J.L., Ávila, M., y Alonso, M. 2015. Cáncer gástrico humano, carcinógenos de *Helicobacter pylori* y helechos: una hipótesis de conexión (en Inglés). *Medical Hypothesis*, 1–36. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2015.11.007>
- Oliveros, A., y Alonso, M. 2010. Polimorfismo cianógeno en brackens, *Pteridium arachnoideum* y *P. caudatum*, de los Andes del Norte. *Quim. Nova*, 33(7): 1520–1524.
- Peters, M., Horacio, L., Schmidt, A., e Hincapié, B. 2010. Especies forrajeras multipropósito: Opciones para productores del trópico americano. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Colombia.
- Ramírez de la Ribera, J., Zambrano, D.A., Campuzano, J., Verdecia, D.M., Chacón, E., Arceo, Y., Labrada, J., y Uvidia, H. 2017. El clima y su influencia en la producción de los pastos. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 18(6): 1–12.
- Ramwell, C. T., Beinum, W. Van, Rowbotham, A., Parry, H., Fera, C. R., Rowbotham, A., Parson, S. 2010. Ptaquilósido y otras toxinas de helechos: una evaluación preliminar del riesgo (en Inglés). The Food and Environment Research Agency. El Reino Unido.

- Reis P.C., Bruun, H.C., y Rasmussen, L. 2014. Determinación de ptaquilósido y pterosina B derivados de helechos *Pteridiumaquilinum* en plasma, orina y leche de ganado (en Inglés). *Journal of Chromatography B*, 952: 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.01.022>
- Rincón, D., Díaz, G., y Gardner, D. 2016. Detección de ptaquilósido en diferentes estados fenológicos de "helecho macho" (*Pteridiumaquilinum*) y análisis de muestras de leche en granjas con hematuria en Tolima, Colombia. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 11(1): 72–77.
- Rodríguez, K. 2017. Identificación y genotipificación de los tipos de virus de papiloma bovino en sangre periférica u orina de animales afectados por Hematuria Vesical Enzoótica Bovina. Tesis Licenciatura. Universidad de Cuenca. Cuenca, Ecuador.
- Salazar, M. 2015. Calibración de dos métodos de diagnóstico de la fertilidad de suelos cultivados con yuca (*Manihotesculentacrantz*) en el trópico húmedo de Costa Rica. Tesis Licenciatura, Instituto Tecnológico de Costa Rica. San Carlos, Alajuela, Costa Rica.
- Schweizer, S. 2011. Muestreo y análisis de suelo para diagnóstico de fertilidad. Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria y Ministerio de Agricultura y Ganadería. Costa Rica.
- Senyanzobe, J.M., Mulei, J., Bizuru, E., Nsengumuremyi, C. 2021. Datos sobre muestreo de vegetación en áreas dominadas por *Pteridiumaquilinum* en el bosque de Nyungwe, provincia occidental de Ruanda (en inglés). *Data in Brief*, 34: 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2021.106772>
- Tourchi, M. 2014. Múltiples efectos del helecho macho en condiciones in vivo e in vitro (En Inglés). *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15: 7507–7509. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.18.7505>
- Verde, G., García, M., Chavera, A., Gonzáles, C., y Falcón, N. 2017. Diagnóstico Clínico de la Hematuria Vesical Enzoótica Bovina por Uroanálisis de la Provincia de Oxapampa, Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 28(3): 522–529. <https://doi.org/10.15381/rivep.v28i3.13286>

Villalobos, L y WingChing, R. 2019. Remoción mecánica del material senescente para la recuperación de pasturas. *Agronomía Mesoamericana*, 30(3): 821-840. <https://doi.org/10.15517/am.v30i3.36625>