

**UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA**

**Facultad de Ciencias y Humanidades**



**Tamizaje fitoquímico de tres extractos del líquen *Usnea barbata* distribuido en el departamento de Quiché, Guatemala.**

*Trabajo de graduación presentado por Yailin Karina Velásquez Rivera para optar al grado académico de Licenciada en Química Farmacéutica.*

***Guatemala***

***2023***



**TAMIZAJE FITOQUÍMICO DE TRES EXTRACTOS DEL LIQUEN *Usnea barbata*  
DISTRIBUIDO EN EL DEPARTAMENTO DE QUICHÉ, GUATEMALA.**

**UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA**

**Facultad de Ciencias y Humanidades**



**Tamizaje fitoquímico de tres extractos del líquen *Usnea barbata* distribuido en el departamento de Quiché, Guatemala.**

*Trabajo de graduación presentado por Yailin Karina Velásquez Rivera para optar al grado académico de Licenciada en Química Farmacéutica*

***Guatemala***

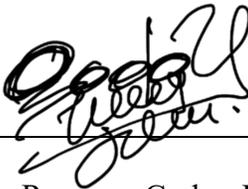
***2023***

Vo. Bo.:

(f)   
MSc. Rosmery Godoy Javier

Tribunal examinador:

(f)   
Dr. Élfego Rolando López García

(f)   
MSc. Rosmery Godoy Javier

(f)   
Lic. Felipe Alejandro Ramírez Caravantes

Fecha de aprobación: Guatemala, 06 de diciembre de 2023.

## PREFACIO

La elaboración de la presente tesis surgió del interés personal de profundizar en el estudio farmacológico de líquenes en el departamento de Quiché, región situada en el noroccidente de Guatemala, caracterizada por su rica biodiversidad y un entorno propicio para el crecimiento y desarrollo de dichos organismos. A lo largo de mi carrera profesional, mi interés por el aprovechamiento de recursos naturales para fines farmacoterapéuticos ha ido incrementando, principalmente por las limitantes que diversas regiones del país presentan en cuanto al acceso de recursos.

En Guatemala, principalmente en el departamento de Quiché, la medicina natural desempeña un papel significativo en la población, respaldado en gran manera por la herencia cultural y conocimiento tradicional. Esto impulsó la idea de un estudio más acentuado de organismos de uso medicinal menos común, tales como los líquenes. El principal desafío de esta investigación fue demostrar la posibilidad del uso del líquen *Usnea barbata* distribuido en el municipio de Nebaj, como una alternativa viable para el tratamiento de diversas afecciones en una comunidad en específico. Dado que no se tiene registro del uso farmacológico de este líquen por los residentes de la aldea Chuatuj, este proyecto abre paso a las primeras investigaciones de líquenes distribuidos en esta región, para la obtención de información mucho más detallada acerca de su composición química.

Gracias a la Universidad del Valle de Guatemala, a los departamentos de Química y Biología. Agradezco especialmente al Dr. Élfego López por su inquebrantable compromiso y orientación a lo largo de este proyecto; a mis asesores, MSc. Rosmery Godoy y Lic. Felipe Ramírez, porque desempeñaron un papel fundamental en cada etapa de esta investigación, por su profundo conocimiento y su generosidad al compartirlo conmigo. Por último, agradezco a Dios, mis padres, hermanas, compañeras de promoción y todos aquellos que me alentaron a seguir adelante.

## TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE CUADROS .....	I
LISTA DE ILUSTRACIONES .....	II
RESUMEN .....	III
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO CONCEPTUAL .....	2
A. Antecedentes.....	2
B. Justificación .....	4
C. Planteamiento del problema .....	5
D. Alcances y límites.....	5
III. MARCO TEÓRICO .....	6
A. Recursos naturales .....	6
1. Importancia y usos.....	6
2. Conocimiento y cultura .....	6
3. Recursos maderables y no maderables .....	7
B. Líquenes.....	7
1. Definición .....	7
2. Morfología .....	8
3. Distribución y hábitat .....	9
4. Importancia ecológica.....	9
5. Etnoliquenología.....	10

C.	Liquen <i>Usnea barbata</i> .....	14
1.	Descripción.....	14
2.	Distribución en Guatemala .....	14
D.	Sustancias liquénicas .....	15
1.	Metabolitos principales de interés farmacéutico .....	15
2.	Metabolitos secundarios del género <i>Usnea</i> .....	19
IV.	MARCO METODOLÓGICO .....	21
A.	Objetivos.....	21
1.	Generales .....	21
2.	Específicos.....	21
B.	Hipótesis.....	21
C.	Variables.....	22
D.	Población .....	22
E.	Muestra .....	23
F.	Procedimiento.....	23
G.	Diseño de investigación.....	29
H.	Análisis estadístico .....	29
V.	MARCO OPERATIVO.....	30
A.	Recolección y tratamiento de datos .....	30
B.	Recursos.....	30
1.	Humanos.....	30

2.	Materiales .....	31
	C. Aspectos económicos .....	33
VI.	RESULTADOS .....	34
VII.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	35
VIII.	CONCLUSIONES.....	41
IX.	RECOMENDACIONES .....	42
X.	BIBLIOGRAFÍA.....	43
XI.	ANEXOS .....	53

## LISTA DE CUADROS

Cuadro No. 1: Géneros comúnmente utilizados en medicina tradicional. ....	13
Cuadro No. 2: Variables de estudio.....	22
Cuadro No. 3: Diseño posprueba establecido para el estudio. ....	29
Cuadro No. 4: Solventes empleados en la preparación de extractos de <i>Usnea barbata</i> . ....	31
Cuadro No. 5: Ensayos preliminares considerados dentro de la metodología. ....	31
Cuadro No. 6: Equipo, cristalería y materiales considerado dentro de la metodología. ....	32
Cuadro No. 7: Costo estimado de servicios y materiales para el desarrollo del estudio. ....	33
Cuadro No. 8: Familias de metabolitos secundarios presentes en líquen <i>Usnea barbata</i> ....	34

## LISTA DE ILUSTRACIONES

Figura No. 1. Morfología de líquenes y proceso de formación.....	8
Figura No. 2. Líquen <i>Usnea barbata</i> .....	14
Figura No. 3. Atranorina, dépsido de $\beta$ -orcinol.....	16
Figura No. 4. Depsidona Pannarin.....	16
Figura No. 5. Numeración y clasificación de dibenzofuranos .....	17
Figura No. 6. Estructuras químicas de Hipericina y Naftazarina .....	18
Figura No. 7. Hirtusneanosida, xantona .....	18
Figura No. 8. Isopreno, unidad fundamental de terpenos y derivados .....	19

## RESUMEN

En esta investigación se busca identificar y caracterizar las principales familias de metabolitos secundarios presentes en tres diferentes extractos del líquen *Usnea barbata*, el cual se encuentra distribuido en el Departamento de Quiché, Guatemala. Esto con la finalidad de contribuir tanto a los estudios enfocados al conocimiento de líquenes en Guatemala como al esclarecimiento experimental de la etnobotánica de *Usnea barbata* distribuida en este departamento y su posible uso como fuente de aislamiento de compuestos con actividad farmacológica en un futuro. La metodología considerada para este estudio involucra la recolección e identificación de la especie líquénica, la preparación de extractos del líquen *Usnea barbata* utilizando tres solventes con distinta polaridad y el tamizaje fitoquímico mediante diversas pruebas de laboratorio.

Se caracterizaron parcialmente las características fitoquímicas de *Usnea barbata*. Para ello se realizaron pruebas preliminares de coloración y precipitación a tres extractos de diferente polaridad (acuoso, etanólico y de acetato de etilo). Para esta especie líquénica se evidenció la posible presencia de compuestos fenólicos, taninos, esteroides, polisacáridos, y sustancias líquénicas de tipo dibenzofuranos, dépsidos y depsidonas. La presencia de estos metabolitos en los diferentes extractos da indicios sobre el posible potencial de *Usnea barbata* como fuente de compuestos con actividad farmacológica. Por ello, se recomienda dar seguimiento a la investigación fitoquímica de este líquen, incluyendo el análisis de otras familias de metabolitos secundarios, con énfasis en la detección y caracterización de sustancias líquénicas.

## I. INTRODUCCIÓN

Los líquenes son una de las fuentes más importantes de compuestos biológicamente activos, están extendidos por todo el mundo y constituyen una asociación simbiótica entre hongos, algas o cianobacterias (Honegger, 1991). El género *Usnea* representa un potencial grupo de líquenes que ha sido objeto de estudio debido a sus propiedades medicinales y sus usos tradicionales en la medicina herbal. El líquen *Usnea barbata* es un ejemplo del potencial farmacológico observado, ya que ha presentado actividad antibiótica, antimicobacteriana, antivírica, analgésica, antipirética y citotóxica (Engel *et al.*, 2007).

Aunque la diversidad de líquenes está recibiendo cada vez más atención, la flora líquénica de Guatemala es todavía muy poco conocida por lo que no se cuenta con suficientes estudios que justifiquen su uso farmacológico. Conocer la biodiversidad de una región y el potencial farmacológico de los recursos naturales, permite generar alternativas de uso medicinal o propuestas de fuentes de aislamiento de compuestos con actividad biológica (Boom, *et al.*, 2007).

El propósito fundamental de esta investigación es identificar y comparar las principales familias de metabolitos secundarios presentes en tres extractos del líquen *Usnea barbata* distribuido en el departamento de Quiché, Guatemala. Además, se busca evidenciar la existencia de una diferencia significativa en la composición química de los extractos acuoso, etanólico y de acetato de etilo con la finalidad de contribuir a los estudios enfocados al conocimiento de líquenes en Guatemala y al esclarecimiento experimental de la etnobotánica de *Usnea barbata*. Con esta finalidad se efectuará un proceso sistemático de recolección, identificación, extracción y tamizaje fitoquímico de los talos de *Usnea barbata*.

## II. MARCO CONCEPTUAL

### A. Antecedentes

Particularmente en Guatemala, el estudio de líquenes ha sido limitado. Se han reportado estudios respecto al uso de líquenes como bioindicadores de contaminación realizados en la Universidad San Carlos de Guatemala (Cohn, 2014), mas no específicamente estudios fitoquímicos. Además, no se encuentra información específica de *Usnea barbata*, salvo de forma general como su taxonomía, ecología y distribución en el país (Portal de Biodiversidad de Guatemala, 2020).

En la Universidad Nacional de Ingeniería de Perú, Diana Martino (2015) desarrolló el estudio químico del liquen *Flavopunctelia flaventior* (Stirt.) Hale, en donde a través del uso del método de cromatografía en columna, cromatografía en placa preparativa y cromatografía en capa fina, además de otras técnicas de identificación, aisló las tres sustancias liquénicas ácido úsnico, ácido lecanórico y  $\beta$ -orcinol carboxilato de metilo. El análisis se llevó a cabo en un extracto acetónico y también logró cuantificar la concentración de ácido úsnico por espectrofotometría.

Enfoque similar han tenido otras investigaciones, como la efectuada por Castro en los años 2004 y 2011, donde se emplearon extractos acetónicos y metanólicos de *Psiloparmelia distincta* (Nyl.) para la identificación, aislamiento y estudio de sustancias liquénicas como ácido fumarprotocetrárico, atranorina, ácido úsnico y ácido 2-hidroxi-3-formil-4-etoxi-6-metilbenzoico mediante espectroscopía. Además, a través de un análisis cualitativo por HPLC se lograron identificar otros compuestos como cloroatranorina, ácido salazínico, ácido guaesítico, ácido protocetrárico, ácido succinprotocetrárico y ácido fumárico (Castro, 2004; Castro, 2011).

Así mismo, en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Ecuador, Chicaiza (2015) evaluó la actividad antimicrobiana *in vitro* de extractos liquénicos de *Parmelina tiliacea*. Para ello trabajó un tamizaje fitoquímico de cuatro extractos de polaridades distintas, seguido de cromatografía en capa fina. Para este estudio, sustancias de naturaleza grasa, triterpenos y compuestos fenólicos fueron mayoritarios en los extractos trabajados (Chicaiza, 2015).

En cuanto al género *Usnea* sp., los estudios han sido mayormente enfocados al aislamiento y cuantificación de ácido úsnico, metabolito principal y de gran interés por sus propiedades bioactivas (Valencia y Choque, 2022). Sin embargo, también se han reportado diversos estudios que buscan delucidar la composición química de líquenes pertenecientes a este género como los efectuados por Sepahvand *et al.* (2021) y Paliya *et al.* (2016).

Un ejemplo es el estudio fitoquímico del extracto etanólico del líquen *Usnea antarctica*, desarrollado en el 2015 por Viteri en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, en donde se logró identificar cinco familias de metabolitos principales: esteroides, triterpenos, fenoles, taninos y azúcares reductores. Además se aislaron una depsidona y tres dibenzofuranos, entre ellos el ácido úsnico y se logró el primer reporte que identifica la presencia de ácido cetrárico en *Usnea antarctica* (Viteri, 2015).

Otro estudio evaluó la composición química del extracto etanólico de 4 especies del género *Usnea*, entre ellas *U. barbata*. A partir de ellos se identificaron por primera vez un total de 73 metabolitos utilizando la técnica de hibridación UHPLC- ESI- MRM-MS/MS, incluidos 34 compuestos en *U. barbata*, 21 en *U. antarctica*, 38 en *U. rubicunda* y 37 en *U. subfloridana* (Salgado *et al.*, 2017).

## B. Justificación

El conocimiento y uso de los recursos naturales forma parte de la cultura de muchos pueblos alrededor del mundo. En Guatemala, el aprovechamiento de estos recursos es dirigido a la satisfacción de necesidades de subsistencia (Midence y Ramirez, 2012), tales como alimentación, salud, económicas y de ocio, convirtiéndose en una fuente de vida y desarrollo para las comunidades.

En comparación con otros grupos de organismos, como plantas superiores u hongos de vida libre, el conocimiento de las propiedades farmacológicas de los líquenes y sus metabolitos bioactivos es escaso. A pesar de que la diversidad de líquenes en el Neotrópico está recibiendo cada vez más atención, la comprensión de la flora liquénica de Guatemala en el ámbito farmacológico sigue siendo limitada debido a que la mayoría de estudios de medicina natural y tradicional son enfocados en plantas. La evaluación de plantas medicinales utilizadas en zona de influencia del Parque Nacional Laguna Lachuá por Cleaves (2000), y el Vademécum nacional de plantas medicinales por Cáceres (2009) son ejemplos claros de esta preferencia.

Los residentes de la aldea Chuatuj, localizada en la Sierra de los Cuchumatanes y parte del municipio de Nebaj, Quiché, Guatemala; enfrentan múltiples desafíos en lo que respecta al acceso a recursos esenciales para su vida cotidiana, incluyendo la adquisición de medicamentos para el tratamiento de enfermedades. Una de las principales dificultades es la necesidad de recorrer largas distancias diariamente para llegar a comunidades más cercanas y abastecerse de ciertos insumos. A raíz de esto, surge la idea de un estudio sobre los recursos

naturales que se encuentran en las proximidades de la aldea y que poseen propiedades terapéuticas potencialmente beneficiosas para la población local, tales como los líquenes.

Por ello, se llevó a cabo un tamizaje fitoquímico del líquen *Usnea barbata* distribuido en Nebaj, Quiché, Guatemala; para determinar su composición química y generar información relevante sobre compuestos con actividad farmacológica que pueda ser de utilidad para los residentes del lugar. Se realizó la colecta e identificación de la especie líquénica, la preparación de extractos del líquen utilizando tres solventes con distinta polaridad y el tamizaje fitoquímico mediante diversas pruebas de laboratorio. Conocer la etnobotánica del líquen *Usnea barbata* permitirá generar alternativas de uso medicinal para el tratamiento de diversas afecciones, emplear los líquenes como fuente de aislamiento de compuestos con actividad biológica y contribuir a los estudios enfocados a líquenes importantes distribuidos en el país.

#### C. Planteamiento del problema

Con los recursos de laboratorio disponibles en la Universidad del Valle de Guatemala, ¿puede efectuarse un tamizaje fitoquímico para identificar metabolitos secundarios en tres extractos de diferente polaridad del líquen *Usnea barbata* proveniente de Quiché, Guatemala?

#### D. Alcances y límites

Los resultados de caracterización fitoquímica se aplican exclusivamente a los líquenes de la especie *Usnea barbata*, distribuidos en la aldea Chuatuj, Nebaj, Quiché, Guatemala.

### III. MARCO TEÓRICO

#### A. Recursos naturales

##### 1. Importancia y usos

Se conoce como recursos naturales a aquellos bienes materiales que son proporcionados por la naturaleza sin una alteración previa por parte del ser humano (Cabral, 2011). Con los años, se han convertido en una fuente fundamental de vida y desarrollo para las sociedades; ya que contribuyen de forma directa a la satisfacción de las necesidades de subsistencia como la alimentación, salud y ocio. Además, pueden ser explotados para lograr un bien económico (Martínez, 2010).

##### 2. Conocimiento y cultura

A lo largo de los años, los ecosistemas han sido explotados desconsiderando sus límites de regeneración y capacidad para producir recursos y asimilar desechos. Según Orellana y Lalvay (2018), los recursos naturales pueden claramente ser considerados como importantes generadores de ingresos para una población, pero el poco conocimiento de las personas acerca de la riqueza de los mismos conlleva a un escaso nivel de valoración y deficiente manejo para su utilización. Como consecuencia genera un impacto negativo al medio ambiente y al desarrollo del lugar. En este caso, la cultura cumple un rol importante dado que se reconoce como mediadora de las políticas y prácticas de manejo sustentable de los recursos humanos (Leff y Carabías, 2016). A pesar del incorrecto uso de los recursos naturales, actualmente se ha observado un aumento del involucramiento de distintos grupos étnicos y diversas comunidades a nivel mundial en programas que se enfocan en la conservación

ambiental; así como en un mejor aprovechamiento y conocimiento de los posibles usos que se les puede dar a los recursos naturales (Midence, y Ramirez, 2012).

### 3. Recursos maderables y no maderables

Cuando se habla de bosques, con frecuencia se tiende a pensar únicamente en árboles y los bienes que pueden ser extraídos de ellos, principalmente la madera. Sin embargo, estos albergan gran diversidad de otras plantas y organismos que incluyen diferentes beneficios con aplicaciones específicas dentro de las comunidades (Cabral, 2011). Los productos proporcionados por los bosques son clasificados en: recursos forestales maderables (RFM), los cuales están constituidos por aquellas especies vegetales leñosas susceptibles de aprovechamiento o uso, y recursos forestales no maderables (RFNM), los cuales agrupan todos aquellos productos no leñosos de la vegetación del ecosistema; incluyendo plantas medicinales, líquenes, musgos, hongos, resinas, gomas, aceites, semillas, suelos, entre otras (Limonés, *et al.*, 2015; Tapia y Reyes, 2008).

#### B. Líquenes

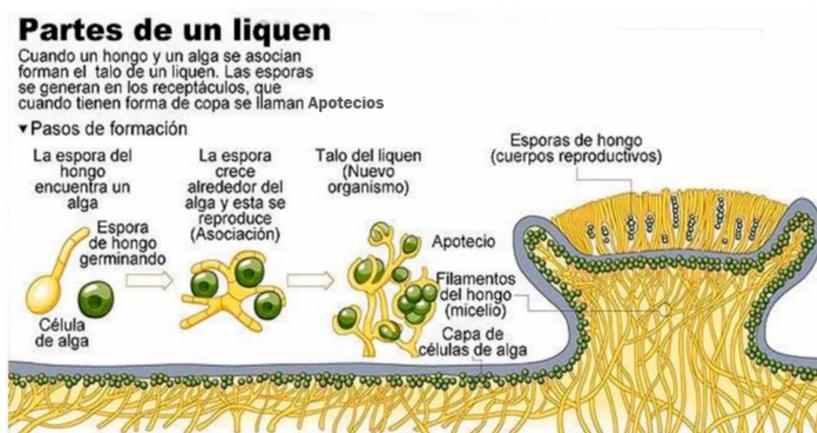
##### 1. Definición

Los líquenes, por definición, constituyen formas de vida compuestas por dos o tres organismos distintos en una asociación simbiótica estable (Drouin, 2017). Esta asociación involucra un hongo (micobionte) y uno o dos organismos que pueden ser algas; en algunos casos cianobacterias (fotobiontes), dando lugar a una unidad morfofisiológica distinta (Barrales-Cureño, *et al.*, 2017).

## 2. Morfología

Los talos liquénicos generan diversidad de estructuras vegetativas, formas de crecimiento, de reproducción y biotipos especiales. En la actualidad, tanto la anatomía como morfología de estos organismos son interpretados como pequeñas adaptaciones a características ecofisiológicas de la relación simbiótica; además estos constituyen un carácter taxonómico de suma importancia (Barreno y Pérez, 2003).

De forma general, el cuerpo de estos organismos esta compuesto de hifas fúngicas encargadas de la fijación del líquen al sustrato y de evitar la desecación. Entre estas se encuentran las células del organismo fotobionte, alga o cianobacteria, las cuales aportan compuestos de carbono y en ocasiones compuestos de nitrógeno (Nabors, 2006). Algunas características particulares de los líquenes son la carencia de raíz y de sistema de conducción. Por otro lado, no poseen estructuras selectivas como cutícula o epidermis que proporcionen protección frente al medio externo; razón por la que son susceptibles a las variaciones ambientales (Lijteroff, Lima y Prieri, 2009).



**Figura No. 1.** Morfología de líquenes y proceso de formación (Martino, 2015).

### 3. Distribución y hábitat

Los líquenes muestran una amplia distribución que abarca desde los polos hasta ecuador, desarrollándose sobre diversidad de superficies de sustratos inertes u orgánicos (Lijteroff, Lima y Prieri, 2009). Actualmente más de diecisiete mil especies de líquenes han sido identificados, y cuentan con una distribución cosmopolita, pudiendo ser encontrados en regiones desérticas, bosques, zonas polares, en los trópicos e incluso en el mar. Estos organismos muestran una elevada capacidad de adaptación a distintos habitats, por lo que existen diferentes tipos de líquenes según Coutiño y Montañez (2000):

- a. Líquenes cortícolas: considerados epífitas debido a su crecimiento sobre la corteza de los árboles en crecimiento o caídos.
- b. Líquenes saxícolas o rupícolas: estos emplean como sustrato las rocas.
- c. Líquenes terrícolas: los cuales se encuentran sobre el suelo.
- d. Líquenes zoobióticos: desarrollados sobre tejido muerto de ciertos animales o sobre el exoesqueleto de insectos.

### 4. Importancia ecológica

A pesar de que los líquenes constituyen la menor parte de la biomasa, juegan un papel importante dentro del ecosistema forestal (Estrabou y Rodriguez, 2012). Para algunos animales como arañas, nemátodos, moluscos y polillas sirven de refugio; para topillos, caribúes y otros ungulados son alimento. Además, contribuyen a la regulación de microclimas y a mantener constantes los niveles de humedad en el ambiente a través de la absorción de agua de la niebla, el rocío y la lluvia; para posteriormente liberarla dentro del dosel del bosque (Drouin, 2017). Otra de las principales funciones es la degradación de

superficies de las rocas y la formación de suelos; esto debido a que pueden establecerse como pioneros en aquellos lugares carentes de vegetación y tienen la capacidad de preparar el sustrato para el posterior desarrollo de diversas especies vegetales (Coutiño y Montañez, 2000).

En el caso específico de los líquenes que involucran cianobacterias, representan una importancia ecológica relacionada a la fijación de nitrógeno. Las cianobacterias se representan en los líquenes por quince géneros aproximadamente, en donde algunas de ellas fijan el nitrógeno atmosférico y permiten un flujo de compuestos nitrogenados al micobionte. De esta forma, estos organismos aportan dichos nutrientes esenciales para todos los seres vivos, sobre todo en aquellos ambientes de escasez (Carballal, Porcel, Gutiérrez y Rowe, 2006).

## 5. Etnoliquenología

La etnoliquenología es una de las especialidades de la etnobotánica que se encarga del estudio de los usos que el hombre realiza de los líquenes (Illana, 2009). Desde hace algunas décadas, las tendencias relacionadas con el uso sustentable de los recursos naturales han advertido un creciente interés por generar mayor investigación dirigida a estos organismos; dado que han presentado aplicaciones en distintos ámbitos que podrían desarrollarse para potenciar sus beneficios (Coutiño y Montañez, 2000).

### a. Uso alimenticio

Los líquenes representan una parte importante en la dieta de diferentes especies animales y en una menor proporción para los humanos, debido a que son mayormente consumidos en

época de escases de alimento. Estos se han empleado como aditivos en la fabricación de varias recetas; por ejemplo, la adición de *Aspicilia jussufii* y *Evernia prunastri* al pan para proporcionar sabor u olor. También se han empleado los extractos de diversos líquenes para retrasar el deterioro de ciertos alimentos, como la adición de *Cetraria islandica* a la carne enlatada. En pueblos nativos de Norteamérica también existe gran diversidad de referencias de uso de líquenes como alimento individual o cocinados con otras plantas por el valor nutritivo que estos presentan. Cabe mencionar que muchas de las especies de líquenes consumidas presentan sustancias liquénicas que pueden ser irritantes o bien tóxicas, por lo que se requiere eliminar dichos compuestos antes de su ingestión (Illana, 2009).

#### b. Industria cosmética

Otras especies de líquenes presentan variedad de aplicaciones desde un punto de vista industrial, principalmente en la fabricación de perfumes como fijadores y prolongadores de esencias aromáticas; permitiendo así una mayor durabilidad de la fragancia. Los compuestos fijadores de perfumes más empleados alrededor del mundo son extraídos de *Evernia prunastri* y *Pseudevernia furfuracea*. Así mismo, dado el potencial microbicida de algunos líquenes, sus extractos son empleados en varios productos cosméticos como neutralizantes de bacterias que se alojan en el cuerpo. Algunos ejemplos son *Usnea barbata* usado en desodorantes, *C. islandica* en dentífricos y *Cetraria nivalis* en cremas rejuvenecedoras (Illana, 2016).

#### c. Bioindicadores

Recientemente, una de las aplicaciones desarrolladas para los líquenes es como indicadores y biomonitores de algunos contaminantes urbanos o industriales. Esto debido a

que obtienen la mayor parte de los nutrientes del aire, lo que les confiere una mayor sensibilidad a cambios medioambientales (Estrada y Najera, 2016). El dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>) es el factor influyente principal del crecimiento, distribución y salud de los líquenes; sin embargo, otros compuestos como amoníaco, fluoruros, metales radioactivos, entre otros, así como la lluvia ácida y eutrofización pueden ser detectados y monitoreados por estos organismos. Cabe mencionar que estos organismos son relativamente longevos, pueden permanecer expuestos a efectos nocivos atmosféricos por largos periodos de tiempo, por lo que brindan una imagen de estados crónicos y no de variaciones puntuales (Barrales-Cureño, *et al.*, 2017).

#### d. Medicina tradicional

Los líquenes acumulan diversos compuestos químicamente complejos, en donde muchos de ellos cuentan con propiedades antibióticas y antimicóticas, razón principal por la que han sido empleados por diferentes culturas a lo largo del tiempo como remedios naturales frente a diversas afecciones (Illana, 2012). En diversas partes del mundo, especies del género *Cladonia* son empleadas comúnmente para el tratamiento de la tuberculosis pulmonar, el género *Usnea* se emplea para controlar la fiebre y aliviar diversos dolores musculares, *U. longissima* se usa como expectorante, extractos de *U. barbata* forman parte de la formulación de cosmética y preparados farmacéuticos, y *Ramalina thrausta* se usa ampliamente para el tratamiento de heridas (Ingólfssdóttir, 2002). En la Tabla 2.1 muestra los géneros de líquenes utilizados habitualmente en la medicina tradicional según el área.

**Cuadro No. 1:** Géneros comúnmente utilizados en medicina tradicional.

Género de Líquen	Área principal de uso
<i>Usnea</i>	Todo el mundo (excepto Australia)
<i>Evernia</i> y <i>Pseudevernia</i>	Europa y África del Norte
<i>Letharia</i>	América del Norte
<i>Lethariella</i>	China
<i>Cetraria</i>	Europa
<i>Parmotrema</i> y <i>Everniastrum</i>	India
<i>Xanthoparmelia</i>	América del Norte y África
<i>Cladonia</i> y <i>Cladina</i>	América del Norte, Europa y Asia
<i>Thamnolia</i>	Asia
<i>Ramalina</i>	América del Norte, Europa y Asia
<i>Lobaria</i> and <i>Peltigera</i>	América del Norte, Europa y Asia
<i>Umbilicaria</i>	América del Norte y Asia

Fuente. Crawford (2015, p. 29).

En Guatemala, existe una práctica tradicional de usos diversos de plantas medicinales. Se cuenta con un Programa Nacional de Medicina Tradicional, además de la disponibilidad de un manual denominado *Vademécum Nacional de Plantas Medicinales*, que brinda información con suficiente evidencia científica respecto a diversas plantas medicinales (Cruz, 2016). Sin embargo, Boom *et al.* (2007) menciona que la flora liquénica de Guatemala es todavía muy poco conocida y por ende, muy poco estudiada en relación con el área farmacológica.

## C. Líquen *Usnea barbata*

### 1. Descripción

*Usnea* es un gran género de la familia Parmeliaceae, con más de 350 especies que están ampliamente distribuidas en regiones polares, templadas y tropicales. El género se reconoce por el talo fruticoso, las ramas con un eje central cartilaginoso y la presencia de ácido úsnico en la corteza; es conocido comúnmente como "barba de viejo" debido a su apariencia colgante y filamentosa (Truong y Clerc, 2012).



**Figura No. 2.** Líquen *Usnea barbata* (CONABIO, 2023).

### 2. Distribución en Guatemala

Los registros de ocurrencias de líquenes del género *Usnea* en Guatemala predominan en cuatro departamentos, siendo estos Alta Verapaz, Quiché, Huehuetenango y Guatemala. Sin embargo, su distribución puede ser bastante variable e influenciada por diversos factores,

como el clima, el tipo de sustrato y las condiciones ambientales locales (Portal de Biodiversidad de Guatemala, 2020).

#### D. Sustancias liquénicas

Los líquenes, son productores de gran variedad de metabolitos secundarios, de los cuales muchos son exclusivos a la simbiosis representada por estos organismos. De esta manera, cerca de 60 metabolitos secundarios, de los más de 200 conocidos, se restringen a los hongos liquenizados (Rundel, 1978).

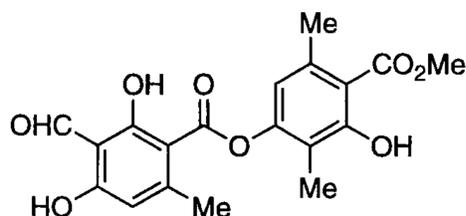
##### 1. Metabolitos principales de interés farmacéutico

El reto de la industria farmacéutica actual reside en el descubrimiento y desarrollo de nuevas moléculas farmacológicas activas. Estos organismos producen metabolitos secundarios y muchos de ellos son conocidos por presentar actividades biológicas y/o farmacológicas. Los líquenes son organismos de crecimiento lento y sus metabolitos secundarios son principalmente depsidos, depsidonas, dibenzofuranos, compuestos relacionados a las quinonas, xantonas y derivados terpénicos (Ali, Nihal, Zuhail y Ali, 2009; Müller, 2001).

##### a. Depsidos

Este tipo de compuestos se forman por condensación de dos o más ácidos hidroxibenzoicos mediante los cuales el grupo carboxilo de una molécula se esterifica con un grupo hidroxilo fenólico de una segunda molécula. Existen dos tipos diferentes, con una fracción de orcinol, como el ácido orsellínico, o una fracción  $\beta$ -orcinol, como el ácido  $\beta$ -

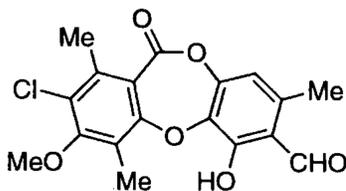
orsellínico, atranorina, ácido difractaico y ácido bárbático. De estos últimos se ha estudiado su propiedad inhibidora de la araquidonato 5-lipoxigenasa, enzima productora de leucotrienos que desempeñan un papel en diversas afecciones, como el asma, la colitis ulcerosa, la artritis reumatoide y la psoriasis (Müller, 2001).



**Figura No. 3.** Atranorina, dépsido de  $\beta$ -orcinol.

#### b. Depsidonas

Las depsidonas tienen un enlace éter además del enlace éster de los dépsidos, lo que da lugar a un sistema policíclico rígido. Se ha demostrado que esta característica química es importante para la actividad inhibidora de esta clase de metabolitos de líquenes frente a la integrasa del VIH-1 (Neamati , *et al.*, 1997).

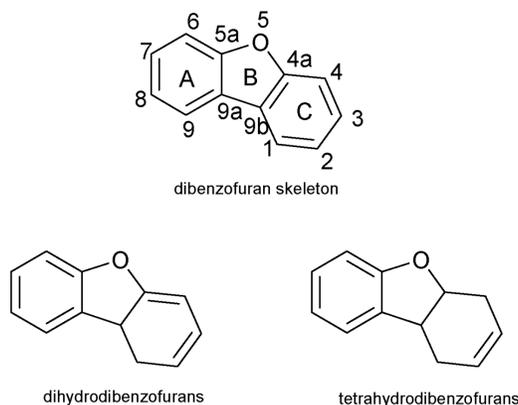


**Figura No. 4.** Depsidona Pannarin.

#### c. Dibenzofuranos

Los dibenzofuranos son compuestos de bajo peso molecular biosintetizados por los líquenes para evitar el ataque y la degradación por parte de insectos y herbívoros. Según sus características estructurales, esta familia se divide en dos categorías: dibenzofuranos

monómeros y dímeros, las cuales a su vez, se subclasifican en función del nivel de oxidación del anillo C del esqueleto dibenzofurano: totalmente aromáticos, dihidrodibenzofuranos y tetrahidrodibenzofuranos. La mayoría de los estudios publicados sobre las actividades biológicas de los dibenzofuranos se refieren a sus actividades citotóxica y antibacteriana (Milot, Dieu y Tomasi, 2016).

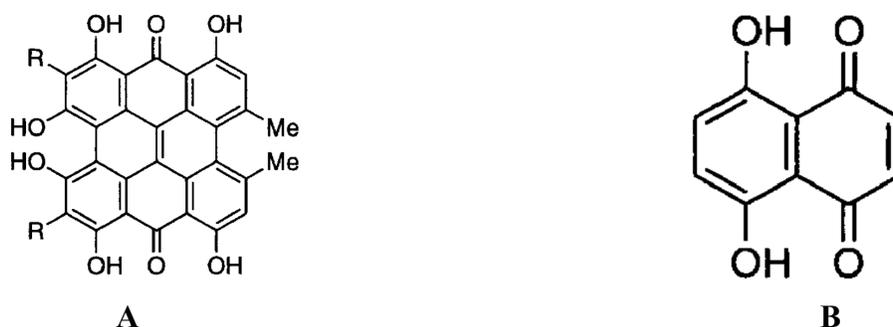


**Figura No. 5.** Numeración y clasificación de dibenzofuranos.

#### d. Quinonas y compuestos relacionados

Las antraquinonas y naftaquinonas son compuestos pertenecientes a las clases antracénicas y naftalénicas, estas pueden tener diversas propiedades y actividades biológicas. Los derivados de la antraquinona están muy extendidos en la naturaleza y se han aislado de plantas superiores, insectos, hongos y líquenes. Los líquenes de color amarillo-anaranjado a rojo anaranjado suelen contener derivados de la hidroxiantraquinona, lo que les confiere propiedades tintóreas. Las antraquinonas también son de interés como agentes antivirales contra el VIH, en particular, la hipericina es de relevancia farmacéutica debido a su espectacular actividad antirretroviral. Así mismo, la naftoquinona naftazarina, cuyos derivados se han aislado de *Cetraria islandica*, resultó tener actividad citotóxica contra células de carcinoma

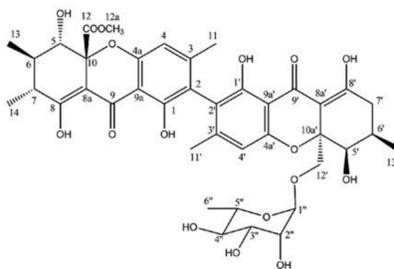
epidérmico humano y también fue un potente inhibidor de una línea celular de queratinocitos humanos, que se utilizó como modelo de psoriasis (Müller, 2001).



**Figura No. 6.** Estructuras químicas de Antraquinona Hipericina (A) y Naftoquinona naftazarina (B).

#### e. Xantonas

Las xantonas son compuestos polifenólicos ubicuos que presentan un andamiaje común de 9H-xanteno-9-ona. La bioactividad de estos compuestos depende de su núcleo tricíclico, así como de la naturaleza y/o posición de sus muy diversos sustituyentes, lo que los convierte en una "estructura privilegiada" que puede unirse a una gran variedad de dianas. Para esta familia de compuestos se han descrito una amplia actividad biológica como antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatoria; y otras más nuevas como la actividad antiangiogénica, neuroprotectora y citotóxica. Hirtusneanosida es un ejemplo de un nuevo dímero de xantona aislado de *Usnea hirta* (Le Pogam y Boustie, 2016).

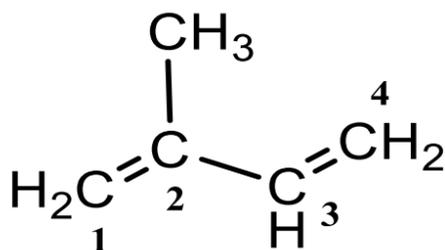


**Figura No. 7.** Hirtusneanosida, xantona.

## f. Derivados terpénicos

Los terpenos, o terpenoides, constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios (más de 40,000 moléculas diferentes). Se sintetizan mediante la ruta del ácido mevalónico por la unión de dos o más unidades de isopreno (figura 7). Según la cantidad de unidades, estos pueden clasificarse en diterpenos, triterpenos, etc. Permitiendo constituir estructuras lineales, cíclicas o mixtas (García y Carril, 2011). Estos son reconocidos por presentar diversas propiedades medicinales como función antimicrobiana, antioxidante, antiinflamatorio y otras de mayor interés como efectos anticancerígenos y sobre el sistema nervioso (Singh, Sharma, y Arora, 2015).

Los diterpenos son raros en los líquenes, aun no se reportaron sesquiterpenos en líquenes. Pero los triterpenos son abundantes, el Zeorin es el triterpeno más común en diferentes especies liquénicas (Castañeta, 2020).



**Figura No. 8.** Isopreno, unidad fundamental de terpenos y derivados.

## 2. Metabolitos secundarios del género *Usnea*

El líquen *Usnea* sp. es uno de los géneros de líquenes que produce metabolitos secundarios que se sabe que tienen muchas actividades farmacológicas, incluida la medicina tradicional y el mantenimiento de la salud de la comunidad local que se aplica como medicina para las heridas, enfermedades de la piel, trastornos respiratorios y digestivos (Maulidiyah *et*

*al.*, 2023). La fitoquímica de las especies de *Usnea* ha revelado la presencia de casi 60 compuestos, distribuidos entre depsidonas, depsidos, depsonas, lactonas, quinonas, polifenólicos polisacáridos, ácidos grasos y dibenzofuranos (Paliya, *et al.*, 2016).

El metabolito más estudiado es el ácido úsnico, para el que varios investigadores han informado de su actividad antimicrobiana, antiviral, antibiótica, antiinflamatoria, analgésica y de otros tipos; razón por la que es empleado en cosmética, odontología y otras áreas de la medicina (Polovinka *et al.*, 2012). Este es un compuesto derivado del dibenzofurano que se conoce en varias especies de líquenes epífitos y terrestres. Sin embargo, es el constituyente más abundante de varias especies de líquenes, incluyendo los géneros *Usnea*, *Cladonia* y *Cetraria* (Smeds y Kytöviita, 2010).

Para el caso específico de *Usnea barbata*, en un estudio efectuado por Salgado, *et al.* (2017), detectaron por primera vez 44 compuestos en un extracto metanólico, de los cuales 34 eran principalmente depsidos, depsidonas, lípidos, derivados de difeniléteres y dibenzofuranos.

## IV. MARCO METODOLÓGICO

### A. Objetivos

#### 1. Generales

- a. Identificar las familias de los metabolitos secundarios presentes en tres extractos del líquen *Usnea barbata* distribuido en el departamento del Quiché, Guatemala.
- b. Generar información científica que contribuya al conocimiento de los especímenes de tipo vegetal en Guatemala, para su posterior evaluación y aplicabilidad terapéutica.

#### 2. Específicos

- a. Identificar la presencia de metabolitos secundarios en tres extractos de diferente polaridad del líquen *Usnea barbata*.
- b. Comparar la composición química entre tres diferentes extractos del líquen *Usnea barbata*.
- c. Clasificar los metabolitos encontrados por familia, del líquen *Usnea barbata*.

### B. Hipótesis

Existen metabolitos secundarios de interés farmacológico en los extractos acuoso, etanólico y de acetato de etilo del líquen *Usnea barbata*.

## C. Variables

**Cuadro No. 2:** Variables de estudio.

Tipo de variable	Variables	Definición conceptual	Definición operacional
Dependiente	Metabolitos secundarios	Compuestos químicos orgánicos sintetizados a partir de excedentes del metabolismo primario, por lo que no tienen rol directo en el crecimiento o reproducción de la planta, sino de defensa y acciones complementarias.	Componentes químicos que se extraerán del líquen <i>Usnea barbata</i> y se clasificarán en familias según sus características estructurales.
Independiente	Extracto acuoso	Mezcla compleja, con multitud de compuestos químicos, obtenible a través de diversos procesos a partir de una fuente natural y el <b>uso de agua como solvente (13% p/v)</b> .	Sustancias que serán sometidas al estudio fitoquímico para identificar la presencia de metabolitos secundarios y clasificarlos en las principales familias de metabolitos secundarios que pueden ser extraídos del líquen <i>Usnea barbata</i> .
Independiente	Extracto etanólico	Mezcla compleja, con multitud de compuestos químicos, obtenible a través de diversos procesos a partir de una fuente natural y el <b>uso de etanol al 98% como solvente (8% p/v)</b>	
Independiente	Extracto acetato de etilo	Mezcla compleja, con multitud de compuestos químicos, obtenible a través de diversos procesos a partir de una fuente natural y el <b>uso del solvente de polaridad intermedia acetato de etilo (7% p/v)</b> .	

## D. Población

Líquenes de la especie *Usnea* sp. que de forma silvestre se encuentran distribuidos en la aldea Chuatuj, localizada en la Sierra de los Cuchumatanes y parte del municipio de Nebaj, Quiché, Guatemala.

## E. Muestra

Tres extractos de talos secos del líquen *Usnea barbata* obtenidos con solventes de distinta polaridad, recolectados en la aldea Chuatuj, parte del municipio de Nebaj, Quiché, Guatemala. Para este estudio se trabajó con una muestra dirigida (no probabilística).

## F. Procedimiento

### 1. *Revisión bibliográfica*

Recopilación y análisis exhaustivo y riguroso de literatura científica y académica existente relacionada con el tema de investigación

### 2. *Elaboración de plan de investigación*

Una guía detallada de cómo se llevó a cabo la investigación. Asegurando que todos los aspectos importantes del estudio fueron considerados.

### 3. *Muestreo y obtención de las mismas*

Las muestras del líquen *Usnea barbata* fueron recolectadas al azar del 14 al 16 de abril del 2023 en la aldea Chuatuj, un pequeño poblado de aproximadamente 30 familias que se re-establecieron en el lugar después del conflicto armado. Está localizada en la Sierra de los Cuchumatanes a una altura de 3,121 msnm, con coordenadas N15°24'38.2'' y es parte del municipio de Nebaj, Quiché, Guatemala. La aldea es accesible únicamente a pie y en el sendero de su recorrido desde la aldea Xexucab se pueden observar varias comunidades vegetales que van desde bosque mixto (pino-encino) hasta vegetación de tundra alpina.

Las muestras se recolectaron de la manera más cuidadosa posible, sin tomar porciones de otros materiales vegetales, para evitar problemas de contaminación cruzada debido a compuestos que no pertenecen al líquen en el análisis. Se recolectó cerca de 90 g de material vegetal total.

#### *4. Identificación y acondicionamiento*

Cada una de las muestras recolectadas fueron almacenadas en bolsas ziploc, identificadas y transportadas a la ciudad de Guatemala, al Herbario UVAL para su acondicionamiento instantáneo. Tanto la colecta como la identificación del espécimen (ver anexo 3) se llevó a cabo con el apoyo del M.Sc., MEd, Javier Aju, Coordinador del Herbario UVAL, Investigador Botánico y Profesor de los cursos de Botánica I y II impartidos en el Departamento de Biología.

El secado de los talos del líquen se llevó a cabo en un horno a 37 °C por 5 días para ayudar a la evaporación del agua sin exponer el material vegetal a cambios bruscos de temperatura. Posteriormente, se almacenaron a temperatura ambiente en bolsas tipo ziploc con sobres de silica gel hasta el momento de su utilización para resguardar el material vegetal de la humedad. El molido de los talos se llevará a cabo en una licuadora/trituradora para lograr la homogenización de la muestra.

#### *5. Análisis de muestras*

Partiendo de 20 g de líquen seco y triturado para cada extracto, se procedió a realizar extracciones sucesivas en reflujo y calor (60 °C x 2 h) con acetato de etilo (280 mL), etanol al 98% (250 mL) y agua (150 mL). Los tres extractos obtenidos se filtraron y concentraron a

sequedad en un rotavapor a presión reducida y se almacenaron a una temperatura de  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su utilización (Kosanic, *et al.*, 2012).

A cada uno de los extractos filtrados de *Usnea barbata* se les realizaron las respectivas pruebas de coloración y precipitación para la identificación de las diferentes familias químicas, tomando reactivos de procedencia conocida que formen parte de la familia de metabolitos analizada como controles positivos, y agua como control negativo. Se realizó siguiendo la guía de Química de Productos Vegetales descrita por Chiquín y Reyes (2002).

#### **a. Compuestos fenólicos y taninos**

Se empleó el ensayo de cloruro férrico y de gelatina. El control positivo para ambas pruebas fue una solución de ácido tánico al 10%. Se midió un volumen equivalente a 10 mL del extracto concentrado y se adicionó 25 mL de agua desmineralizada caliente. Se mezcló completamente con una varilla de agitación y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se agregaron de 3 a 4 gotas de solución de cloruro de sodio al 10% al extracto enfriado a modo de eliminar cualquier test “falso-positivo” para taninos. Se filtró por gravedad y se trasvasaron 3 mL del filtrado a cada tubo de ensayo.

##### 1) Cloruro férrico:

Se adicionaron 3 gotas de una solución acuosa de  $\text{FeCl}_3$  al 5%. El ensayo se consideró positivo al observar un cambio de coloración: rojo-vino para compuestos fenólicos en general; verde intenso para taninos del tipo pirocatecólicos; y azul para taninos del tipo pirogalotánicos.

## 2) Gelatina:

Se adicionaron 4 a 5 gotas de solución de gelatina al 1%. El ensayo se consideró positivo al observar formación de precipitado.

*\*Nota:* Para el control positivo, se emplearon 2.5 g de ácido tánico y se procedió de igual forma que la muestra. Se evaluaron resultados posteriormente.

### **b. Quinonas**

Se empleó el ensayo de Borntrager. Para esta prueba no se contó con un control positivo. Se evaporó el equivalente de 1 gramo de extracto vegetal a sequedad utilizando un baño de vapor. Se disolvió el residuo en 30 mL de agua desmineralizada y se filtró. Se agitó con 10 mL de benceno en una ampolla de decantación y se permitió que la mezcla se separara. Se transfirió la capa de benceno a un tubo de ensayo y se añadieron 5 mL de solución de Test de amonio a la capa de benceno. La producción de un color rojo se consideró como prueba positiva para compuestos de antraquinonas.

### **c. Esteroles**

Se emplearon los ensayos de Liebermann-Burchard y Salkowsky. El control positivo para ambas pruebas fue una solución de colesterol al 10%. Se evaporó el equivalente de 10 gramos del extracto vegetal a sequedad en un baño de vapor. Se removió y se dejó enfriar a temperatura ambiente hasta que el extracto quedó seco. Se añadieron 10 mL de éter de petróleo al residuo. Se permitió que se asentara por unos minutos y luego se decantó para descartar el sobrenadante, repitiendo el proceso hasta que el éter de petróleo eliminó la mayoría de los pigmentos vegetales. Se añadieron 20 mL de benceno y se agitó por unos

minutos. Se decantó en un tubo de ensayo apropiado y se agregaron alrededor de 100 mg de sulfato de sodio anhidro. Se agitó y se filtró.

1) Liebermann-Burchard:

A una alícuota del extracto se le agregaron tres gotas de anhídrido acético al tubo con la muestra y se mezcló suavemente. Se añadió una gota de ácido sulfúrico concentrado y se mezcló. La formación de colores rojo, rosado, púrpura o violeta indicó una prueba positiva.

2) Salkowsky:

Se utilizó ácido sulfúrico para realizar un ensayo de anillo. Si en la interfaz del extracto y ácido hubo un cambio de color y se observó algo similar al color cereza, la prueba se consideró positiva. En caso de no generarse este color cereza, se mezcló y se esperó el cambio durante una hora.

*\*Nota:* Para el control positivo, se emplearon 2.5 g de colesterol y se procedió de igual forma que la muestra. Se evaluaron resultados posteriormente.

#### **d. Polisacáridos**

Se empleó el ensayo de Fehling. El control positivo para esta prueba fue una solución de almidón al 10%. A una alícuota del extracto disuelto en agua (1 mL), se le adicionaron 2 mL del reactivo y la mezcla se calentó en un baño de agua durante 5-10 minutos. El ensayo se consideró positivo si la solución se coloreó de rojo o apareció un precipitado rojo.

*\*Nota:* Para el control positivo, se emplearon 2.5 g de almidón y se procedió de igual forma que la muestra. Se evaluaron resultados posteriormente.

Las pruebas de coloración para la identificación específica de sustancias liquénicas se realizaron tomando como referencia los estudios descritos por Robles, Morales y Pastor, 1992; Santesson, 1973 y Castro, 2011.

#### e. Sustancias liquénicas

Se empleó el ensayo de KOH y cloruro férrico. Se introdujeron 3 mL del extracto seco a cada tubo de ensayo.

##### 1) KOH:

Se adicionaron 3 a 4 gotas de una solución acuosa de KOH al 10%. El ensayo se consideró positivo al observar un cambio de coloración:

*Dépsidos y depsidonas*: rojo/marrón.

*Ácido úsnico*: amarillo.

##### 2) Cloruro férrico:

Se adicionaron 3 a 4 gotas de una solución acuosa de FeCl<sub>3</sub> al 1%. El ensayo se consideró positivo al observar un cambio de coloración:

*Dépsidos y depsidonas*: violeta

*Ácido úsnico*: rojo-pardo.

#### 6. *Análisis y discusión de resultados*

Se evaluaron e interpretaron los datos obtenidos a partir de las pruebas de detección y se resumieron las principales observaciones y conclusiones del análisis fitoquímico, destacando los compuestos más relevantes presentes en la muestra y su posible importancia desde el punto de vista farmacológico o terapéutico.

## G. Diseño de investigación

**Cuadro No. 3:** Diseño posprueba establecido para el estudio.

<b>GRUPOS</b>	<b>CONDICIÓN EXPERIMENTAL</b>	<b>MEDICIÓN</b>	<b>OBSERVACIÓN</b>
RG <sub>1</sub>	X <sub>1</sub> (extracto acuoso)	0 <sub>1</sub>	Comparaciones en familias de metabolitos presentes
RG <sub>2</sub>	X <sub>2</sub> (extracto etanólico)	0 <sub>2</sub>	
RG <sub>3</sub>	X <sub>3</sub> (extracto acetato de etilo)	0 <sub>3</sub>	
RG <sub>4</sub>	---- control (extracto en cuestión)	0 <sub>4</sub>	

### NOMENCLATURA:

R = asignación al azar

G = grupo de sujetos

X = tratamiento o condición experimental

0 = medición de los sujetos

## H. Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados mediante estadística descriptiva y se presentaron en cuadros.

## V. MARCO OPERATIVO

### A. Recolección y tratamiento de datos

#### 1. Registro de observaciones

Se registrará cuidadosamente las observaciones realizadas en cada ensayo, incluyendo cambios de color, formación de precipitados u otras reacciones notables.

#### 2. Identificación de grupos de compuestos

Se procederá a identificar los grupos de compuestos presentes en la muestra líquénica en función de las observaciones registradas, donde cada reacción química sugiere la presencia de un grupo de metabolitos secundarios específicos.

#### 3. Discusión de resultados

Se discuten los hallazgos obtenidos en el tamizaje fitoquímico en relación con la composición química de la muestra líquénica. Se resaltan los grupos de compuestos presentes y su posible relevancia desde el punto de vista farmacológico.

### B. Recursos

#### 1. Humanos

- a. Autora: Yailin Karina Velásquez Rivera
- b. Asesora: MSc. Rosmery Godoy Javier
- c. Revisor: Lic. Felipe Alejandro Ramírez Caravantes
- d. Clasificador botánico: MSc. Luis Javier Ajú Torres

## 2. Materiales

**Cuadro No. 4:** Solventes empleados en la preparación de extractos de *Usnea barbata*.

<b>Etapa de análisis</b>	<b>Extracto 1</b>	<b>Extracto 2</b>	<b>Extracto 3</b>
Extracción	Agua desmineralizada	Etanol 98%	Acetato de etilo

**Cuadro No. 5:** Ensayos preliminares considerados dentro de la metodología.

<b>Etapa de análisis</b>	<b>Metabolitos</b>	<b>Ensayo</b>
Tamizaje fitoquímico	Compuestos fenólicos / taninos	Cloruro Férrico
		Gelatina
	Depsidonas	KOH
	Quinonas	Borntrager
		Liebermann - Burchard
	Esteroles	Salkowsky
	Polisacáridos	Fehling
	Ácido úsnico	KOH

**Cuadro No. 6:** Equipo, cristalería y materiales considerado dentro de la metodología.

<b>Cristalería</b>	<b>Equipo</b>	<b>Materiales</b>
Beackers		Soporte universal
Probetas		Aros de metal
Pipetas Pasteur	Balanza analítica	Mangueras de vacío
Balones aforados	Estufa	Parafilm
Ampolla de decantación	Licuada	Rotulador
Tubos de ensallo	Equipo de reflujo	Agitador magnético
Vidrios de reloj	Refrigerador	Gradilla
Varillas de agitación	Termómetro	Papel filtro
Embudo de vidrio		Espátula

### C. Aspectos económicos

**Cuadro No. 7:** Costo estimado de servicios y materiales para el desarrollo del estudio.

<b>Servicio/ Material</b>	<b>Costo</b>
Costo de Guía Comunitario	Q170
Hospedaje en Hotel Ilebal Tenam, Nebaj	Q70
Hospedaje en Aldea Chuatuj	Q30
Transporte Gira de Colecta	Q360
Gasolina	Q2,000
Alimentación	Q500
<b>Costo Total Estimado:</b>	<b>Q3,130</b>

Todos los materiales y equipos considerados dentro de la metodología, para el proceso de extracción y para el análisis fitoquímico se encuentran dentro de las instalaciones de la Universidad Del Valle de Guatemala. Además, los reactivos empleados para los extractos y pruebas de coloración/precipitación son de uso común, lo cual hace que el presupuesto sea más accesible para la ejecución del proyecto.

## VI. RESULTADOS

**Cuadro No. 8:** Familias de metabolitos secundarios presentes en líquen *Usnea barbata*.

Metabolitos secundarios	Ensayo	Tipo de extracto		
		Acuoso	Etanólico	Acetato de Etilo
Compuestos fenólicos y taninos	FeCl <sub>3</sub> al 5%	+++	+++	+++
	Gelatina	+	+++	-
Quinonas	Borntrager	-	-	-
Esteroles	Liebermann-Burchard	-	++	+++
	Salkowsky	-	++	+++
Polisacaridos	Fehling	++	+	-
Sustancias líquénicas	KOH al 10%	+	+++	++
	FeCl <sub>3</sub> al 1%	+	+++	++

**Leyenda:**

(+++) Alta presencia.

(++) Presencia.

(+) Baja presencia.

(-) Ausencia.

## VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El tamizaje fitoquímico fue llevado a cabo con el fin de identificar de forma cualitativa la presencia de cinco familias de metabolitos secundarios específicas en cada uno de los extractos. A menudo se discute el impacto del ambiente, situación nutricional del sustrato y edad del material liquénico en el metabolismo y química secundaria de los líquenes (Brunauer *et al.*, 2007). Por esta razón, los resultados obtenidos a partir de este estudio son aplicables únicamente para los líquenes de la especie *Usnea barbata* que de forma silvestre se encuentran distribuidos en la aldea Chuatuj, Nebaj, Quiché, Guatemala.

En el contexto particular de la aldea Chuatuj, el líquen se halló y colectó exclusivamente en la corteza de Pinos (ver Anexo 8). Se tomó el cuidado de recolectar la muestra sin tomar porciones de otros materiales vegetales, en este caso la corteza, para evitar problemas de contaminación cruzada. Por esta razón, el tipo de sustrato puede no ser considerado como un factor influyente en los resultados de caracterización.

En el Cuadro No. 8 se puede observar los resultados obtenidos del tamizaje fitoquímico de *Usnea barbata* para tres extractos de diferente polaridad. Se revela la presencia de compuestos fenólicos, taninos, esteroides, polisacáridos, y sustancias liquénicas de tipo dibenzofuranos, dépsidos y depsidonas; no se logró evidenciar la presencia de quinonas con ninguno de los solventes empleados. El mejor comportamiento se obtuvo en el extracto etanólico, con concentraciones detectables en cuatro familias de metabolitos secundarios de las cinco analizadas. Esto puede asociarse a una mayor afinidad de los metabolitos secundarios evaluados a solventes polares.

Las pruebas de adición de disolución de gelatina para taninos se fundamentan en la capacidad de estos compuestos para provocar la precipitación de proteínas. Se observó un resultado positivo en el caso del extracto etanólico, aunque en menor medida en el extracto acuoso. No obstante, la prueba de cloruro férrico indica la presencia de compuestos fenólicos en los tres extractos, lo que sugiere la posibilidad de la existencia de otro grupo de sustancias, como los flavonoides y antocianinas (Cartaya y Reynaldo, 2001). En el caso del extracto de acetato de etilo, el resultado negativo en la prueba de gelatina y positivo en la prueba de cloruro férrico es interpretado como ausencia de taninos y presencia de otro tipo de compuestos fenólicos. En consecuencia, se sugiere llevar a cabo ensayos específicos orientados a la detección de flavonoides con el propósito de fortalecer el fundamento de los resultados obtenidos en esta experimentación.

Entre la fitoquímica del género *Usnea*, se han revelado cerca de 60 compuestos, los cuales se distribuyen en diversas familias de metabolitos, entre ellas las quinonas (Salgado *et al.*, 2017). Sin embargo, en este estudio no se logró evidenciar la presencia de estos metabolitos, ya que la prueba de Borntrager fue negativa para los tres extractos evaluados.

En cuanto a las pruebas de Liebermann-Burchard y Salkowsky, las pruebas indican la posible presencia de esteroides en el extracto de acetato de etilo y etanólico, mientras que para el extracto acuoso ambas pruebas fueron negativas. Estos resultados concuerdan con lo esperado, ya que las características estructurales del núcleo de los esteroides les confiere una naturaleza apolar, permitiendo una mayor solubilidad en solventes orgánicos apolares y menor solubilidad en alcoholes de bajo peso molecular (Martinez, 2002).

Para los extractos acuoso y etanólico de *Usnea barbata*, la prueba de Fehling indica la posible presencia de polisacáridos, principalmente en el extracto acuoso donde los cambios fueron más evidentes. En líquenes comestibles, los polisacáridos son el componente mayoritario, alcanzando proporciones de hasta 83.5% en *Usnea barbata* (Illana, 2009), por lo que los resultados son concordantes. Sin embargo, debe considerarse que diversos aspectos influyen en la extracción de polisacáridos, tales como el peso molecular, grado de ramificación, presencia de grupos ionizables, tipos de enlaces glicosídicos, incluso la matriz que los rodea (Synytsya *et al.*, 2009), lo cual podría explicar la reducida respuesta ante la prueba.

Las pruebas realizadas para detección de sustancias líquénicas fueron positivas en los tres extractos analizados. En primer lugar, la prueba de hidróxido de potasio reveló un cambio de coloración rojo/marrón en los extractos etanólico y de acetato de etilo, indicando la posible presencia de dépsidos y depsidonas. En el extracto acuoso se observó un leve cambio de coloración a amarillo intenso, la cual suele ser relacionada a la presencia de ácido úsnico, principal metabolito del género *Usnea*. Aunque se ha logrado extraer concentraciones mínimas de ácido úsnico con agua como solvente (Popovici *et al.*, 2020), la solubilidad de este compuesto es mayor en solventes orgánicos o no polares, por lo que se descarta dicha interpretación (Castro *et al.*, 2011). En este sentido, la reacción podría sugerir la posible presencia de otras sustancias líquénicas, tales como dépsidos (atranorina o pseudocifelarina A), los cuales son detectados bajo la misma reacción y con capacidad de extracción en solventes de cierta polaridad (Robles, Morales y Pastor, 1992).

Además, la prueba de cloruro férrico reveló la posible presencia de dépsidos y depsidonas en el extraco etanólico, presentandose como un cambio de coloración violeta, característico para este tipo de compuestos (Castro, 2011). En el caso del extracto acuoso y de acetato de etilo, los cambios detectados fueron menores, con coloraciones rojo/marrones, interpretandose como posible presencia de ácido úsnico (Robles, Morales y Pastor, 1992). Es importante mencionar que, esta prueba no se considera específica para un solo tipo de sustancias liquénicas ya que algunos algunos compuestos depsídicos también son identificados bajo la misma coloración, además de que la reacción presenta coloraciones similares a la prueba de cloruro férrico para taninos (anexo 27). Por esta razón, se sugiere el uso de pruebas adicionales, esencialmente de tipo cromatográficas, para detecciones específicas de ácido úsnico.

La presencia de estos metabolitos en los diferentes extractos de *Usnea barbata* da indicios de los usos y propiedades que podría presentar. La presencia de taninos y compuestos fenólicos podría indicar una posible actividad antioxidante. Esta propiedad se ha evaluado en diversos líquenes, incluido el género *Usnea*, reportando porcentajes de captación de radicales entre 18.3% y 34.7% para diferentes extractos (Rodríguez *et al.*, 2014).

La presencia de esteroides podría indicar una posible actividad antibacteriana y antifúngica, dado que en otros estudios, han identificado esteroides importantes, como ergosterol, en extractos etanólicos de líquenes del género *Usnea*, caracterizado por presentar actividad antiestafilocócica y antibacteriana en conjunto con otro tipo de compuestos (Jaramillo, 2020). En los últimos 30 años, las investigaciones han demostrado que los polisacáridos de líquenes poseen otro tipo de actividad biológica como inmunomoduladora

y anticoagulante, además de un bajo nivel de toxicidad (Olafsdottir y Ingólfssdottir, 2001). En líquenes como *Usnea barbata*, se han identificado como principales polisacáridos la liquenina e isoliquenina, confiriéndole así importantes propiedades terapéuticas, entre ellas como emoliente en afecciones de las vías respiratorias y diarreas crónicas, además de un alto valor nutritivo (Illana, 2009; Serres, 1916).

Finalmente, las sustancias liquénicas han sido aisladas en diferentes partes del mundo y han reportado importantes actividades biológicas y ecológicas. La presencia de diversos compuestos de tipo depsidos y depsidonas se ha asociado a un significativo potencial antioxidante, además de actividades antifúngica y antiprotozoaria (Schmeda *et al.* 2008; Fernández, Gómez y Crespo, 2016). Adicionalmente, la presencia de dibenzofuranos en *Usnea barbata*, principalmente el ácido úsnico, supone actividades de gran importancia farmacológica como antibióticas, antifúngicas, anti-VIH, antiprotozoarias y antibacterianas (Salgado *et al.*, 2017). Una de las propiedades de mayor interés en la actualidad respecto a este compuesto es su potencial anticancerígeno. Se ha evaluado el efecto citotóxico de diversos extractos de *Usnea barbata*, revelando una intensa respuesta sobre células CAL 27 luego de 24 horas, inducidos por apoptosis y alto estrés oxidativo. En estos estudios se demostró un comportamiento directamente proporcional a las concentración de ácido úsnico (Popovici *et al.*, 2020). Dado a la poca especificidad que pueden presentar las pruebas colorimétricas y de precipitación en compuestos tan complejos como las sustancias liquénicas, se recomienda el uso de técnicas cromatográficas para confirmar los resultados obtenidos en este estudio.

Los resultados preliminares de esta investigación resaltan la necesidad imperativa de continuar con estudios más profundos de la fitoquímica del liquen *Usnea barbata* distribuido en el departamento de Quiché, Guatemala. Los posibles beneficios farmacológicos que este organismo podría ofrecer a la sociedad, principalmente a los residentes de la aldea Chuatuj, evidencian la importancia de llevar a cabo investigaciones adicionales.

Asimismo, realizar ajustes en los parámetros temporales de recolección y en el estado de madurez del material liquénico resultaría de relevancia en el contexto de esta investigación. Esto facilitaría la comprensión de la correlación entre dichos factores y la biosíntesis de metabolitos, contribuyendo a la identificación del momento óptimo de colecta para maximizar los rendimientos.

## VIII. CONCLUSIONES

Se logró obtener los extractos acuoso, etanólico y de acetato de etilo del líquen *Usnea barbata* distribuido en Nebaj, en el departamento de Quiché, Guatemala.

El análisis fitoquímico preliminar realizado en el extracto acuoso, etanólico y de acetato de etilo del líquen *Usnea barbata*, evidenció la posible presencia de varias familias de metabolitos secundarios, como compuestos fenólicos, taninos, esteroides, polisacáridos, y sustancias líquénicas de tipo dibenzofuranos, dépsidos y depsidonas.

El compuesto de mayor interés en el género *Usnea*, ácido úsnico, fue detectado con mayor respuesta en el extracto de acetato de etilo, lo que sugiere que el líquen *Usnea barbata* distribuido en Nebaj, Quiché, Guatemala, podría emplearse como posible fuente de aislamiento de dicho compuesto.

De acuerdo con los resultados fitoquímicos preliminares y revisión bibliográfica, se infiere la posibilidad de que el líquen *Usnea barbata*, pueda considerarse como un candidato idóneo para futuras investigaciones orientadas a la determinación de su potencial como fuente significativa de compuestos con actividad farmacológica. Esto con la finalidad de evaluar su viabilidad como alternativa para aplicaciones medicinales en la población residente de la aldea Chuatuj, parte del municipio de Nebaj, Quiché, Guatemala.

## IX. RECOMENDACIONES

Continuación de la investigación fitoquímica de los extractos de *Usnea barbata*, incluyendo el análisis de otras familias de metabolitos secundarios, con énfasis en la detección y caracterización de sustancias liquénicas.

Implementación de un análisis por cromatografía de capa fina como técnica de confirmación de los resultados obtenidos en este estudio.

Realización de estudios adicionales empleando otro tipo de solventes para comparar el rendimiento de extracción de metabolitos secundarios, con un enfoque particular en la identificación de sustancias liquénicas.

Reevaluación del estudio con variaciones controladas de parámetros temporales de colecta y estado de madurez del material liquénico, para determinar la interrelación e influencia que tienen en la biosíntesis de metabolitos secundarios. Esto con el fin de conocer las condiciones óptimas de colecta que maximicen los rendimientos de extracción.

Generación de ensayos de cuantificación de los componentes identificados en este estudio, para determinar con precisión las concentraciones de los metabolitos secundarios presentes en las muestras analizadas.

Evaluación de la actividad antimicrobiana y antioxidante de los extractos acuoso, etanólico y de acetato de etilo de *Usnea barbata*, ya que la presencia de metabolitos secundarios como taninos, dépsidos, depsidonas y ácido úsnico, suponen este tipo de potencial farmacológico.

## X. BIBLIOGRAFÍA

1. Ali, K. Z., Nihal, D. Z., Zuhail, Z., y Ali, A. (2009). *Antibacterial activity of some lichen extracts*. Journal of Medicinal Plants Research, 3(12), 1034-1039.
2. Barrales-Cureño, H. J., Reyes-Reyes, C., Díaz-Bautista, M., Sánchez-Herrera, L. M., Cortés-Ruiz, J. A., Gómez-de Jesús, A., y López-Valdez, L. G. (2017). *Importancia De Los Líquenes Como Bioindicadores Ambientales Y Fuente Promisoria De Compuestos Anticáncer*. Agroproductividad, 10(10), 85–90.
3. Barreno, E. y Pérez, S. (2003). *Líquenes de la reserva natural de Muniellos, Asturias*. Consejería de Medio Ambiente, Ordenación del Territorio e Infraestructuras del Principado de Asturias. KRK ediciones.
4. Boom, P., Elix, J. y Sipman, H. (2007). *New or interesting lichen records from Guatemala I*. Willdenowia 37(1): 363-375. <https://doi.org/10.3372/wi.37.37126>
5. Brunauer, G., Hager, A., Grube, M., Türk, R., y Stocker-Wörgötter, E. (2007). *Alterations in secondary metabolism of aposymbiotically grown mycobionts of Xanthoria elegans and cultured resynthesis stages*. Plant physiology and biochemistry : PPB, 45(2), 146–151. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.01.004>
6. Cabral, J. (2011). *Conocimiento del recurso líquénico como fuente de sustancias antibióticas en El Salto, Pueblo nuevo, Durango*. [Tesis de maestría, Instituto Politécnico Nacional]. Repositorio Institucional - Instituto Politécnico Nacional.
7. Cáceres, A. (2009). *Vademécum nacional de plantas medicinales*. Colección Monografías, editorial universitaria. Ministerio de Salud y Asistencia Social. Guatemala.

8. Carballal, R., Porcel, M. C., Gutiérrez, L., y Rowe, J. G. (2006). *Introducción a los líquenes*. Capítulo 7, pag. 163. Recuperado de [https://www. researchgate.net/publication](https://www.researchgate.net/publication).
9. Cartaya, O., y Reynaldo, I. (2001). *Flavonoides: Características químicas y aplicaciones Cultivos Tropicales*, vol. 22, núm. 2, 2001. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas La Habana, Cuba, 5-14.
10. Castañeta Condori, G. (2020). *Sustancias líquénicas: Aislamiento, semisíntesis y perfil metabolómico de cinco líquenes (Doctoral dissertation)*. Universidad Mayor de San Andrés, Bolivia.
11. Castro Mandujano, O. N. (2004). *Estudio fitoquímico del líquen Psiloparmelia distincta (Nyl.) Hale*. Recuperado de: <http://hdl.handle.net/20.500.12404/93>
12. Castro, M., Olivio, Pastor, A. y Collantes, I. (2011). *Aislamiento de ácido úsnico y parietina de Caloplaca saxicola Hoffm.* Revista de la Sociedad Química del Perú, 77(2), 152-161. Recuperado de: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1810-634X2011000200008&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2011000200008&lng=es&tlng=es).
13. Castro, O. (2011). *Contribución al estudio fitoquímico de la Psiloparmelia distincta (Nyl.) Hale*. Revista de la Sociedad Química del Perú, 77(1), 56-65. Recuperado en 08 de junio de 2023, de [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1810-634X2011000100006&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2011000100006&lng=es&tlng=es).
14. Chicaiza, M. (2015). *Evaluación de la actividad antimicrobiana in Vitro de diferentes extractos del líquen Parmelina tiliacea* [Tesis de pregrado, Escuela Superior

- Politécnica de Chimborazo]. Repositorio Institucional - Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
15. Chiquín, C. y Reyes, K. (2002). *Guía de Química de Productos Vegetales*. Universidad del Valle de Guatemala, Guatemala.
  16. Cleaves, C. (2000). *Plantas medicinales utilizadas en zona de influencia del Parque Nacional Laguna Lachuá*. INAB/ UICN. Guatemala.
  17. Cohn, G. (2014). *Líquenes como bioindicadores de contaminación aérea en el corredor metropolitano Hipódromo del Norte-Hipódromo del Sur, en la ciudad de Guatemala*.
  18. CONABIO. (2023). <https://enciclovida.mx/especies/1882>
  19. Coutiño, B., y Montañez, A. L. (2000). *Los líquenes*. Ciencias, (059). Recuperado de <https://repositorio.unam.mx/contenidos/27492>
  20. Crawford D. (2015). *Lichens Used in Traditional Medicine Stuart*. Springer International Publishing Switzerland B. Rankovic (ed.), Lichen Secondary Metabolites.
  21. Cruz, S. M. (2016). *Medicina tradicional y fitoterapia una alternativa para el mejoramiento de la salud en Guatemala*. Ciencia, Tecnología y Salud, 3(1), 81-90
  22. Drouin, R. (2017). *A Lift for Lichens*. Scientific American, 316(4), 22. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0417-22>
  23. Estrabou, C., y Rodríguez, J. M. (2012). *Diversidad y ecología de líquenes en la Reserva Vaquerías*. Editorial Universitaria UNC.
  24. Estrada, V. y Najera, J. (2016). *El uso de líquenes como bioindicadores para evaluar el estado de la contaminación atmosférica a nivel mundial*. Biocenosis, 25(1-2).

Recuperado a partir de  
<https://revistas.uned.ac.cr/index.php/biocenosis/article/view/1188>

25. Engel, K., Schmidt, U., Reuter, J., Weckesser, S. y Simon, B. (2007). *Usnea barbata extract prevents ultraviolet-B induced prostaglandin E2 synthesis and COX-2 expression in HaCaT keratinocytes.* , 89(1), 9–14. doi:10.1016/j.jphotobiol.2007.08.002
26. Fernández, C., Gómez, M. y Crespo, A. (2016). *Antioxidant potential of lichen species and their secondary metabolites. A systematic review.* *Pharmaceutical biology*, 54(1), 1–17. <https://doi.org/10.3109/13880209.2014.1003354>
27. García, A. Á., y Carril, E. P. U. (2011). *Metabolismo secundario de plantas.* *Reduca (biología)*, 2(3).
28. Honegger, R (1991). *Functional Aspects of the Lichen Symbiosis.* *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42(1), 553-578. doi:10.1146/annurev.pp.42.060191.003005
29. Illana, C. (2009). *Líquenes comestibles.* *Bol. Soc. Micol*, 33, 273-282.
30. Illana, C. (2012). *Líquenes usados en medicina tradicional.* *Bol. Soc. Micol. Madrid*, 36, 163-174.
31. Illana, C. (2016). *Líquenes usados en perfumería.* *Boletín de La Sociedad Micologica de Madrid*, 40, 217-223.
32. IBUNAM Departamento de Botánica, Instituto de Biología. (1964) "*Cladonia furcata*" (Huds.) Schrad., *ejemplar de: Herbario Nacional de México (MEXU), Líquenes.* En "Portal de Datos Abiertos UNAM" (en línea), México, Universidad Nacional Autónoma de México.

33. Ingólfssdóttir K. (2002). *Usnic acid*. *Phytochemistry*, 61(7), 729–736.  
[https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(02\)00383-7](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(02)00383-7)
34. Jaramillo, C. (2020). *Actividad antifúngica y antibacteriana in vitro del extracto etanólico de Usnea laevis frente a Candida albicans, Staphylococcus aureus y Pseudomonas aeruginosa*. *Revista Medica Herediana*, 31(3), 169-174. <https://dx.doi.org/10.20453/rmh.v31i3.3806>
35. Kosanić, M., Ranković, B., Stanojković, T., Rančić, A., y Manojlović, N. (2014). *Cladonia lichens and their major metabolites as possible natural antioxidant, antimicrobial and anticancer agents*. *LWT - Food Science y Technology*, 59(1), 518–525. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.04.04>
36. Le Pogam, P., y Boustie, J. (2016). *Xanthones of Lichen Source: A 2016 Update*. *Molecules* (Basel, Switzerland), 21(3), 294.  
<https://doi.org/10.3390/molecules21030294>
37. Leff, E. y Carabías, J. (2016). *Cultura y manejo sustentable de los recursos naturales*. Volume 1. Centro de Investigaciones Interdisciplinarias en Humanidades UNAM. México. URI: <http://ru.iis.sociales.unam.mx/jspui/handle/IIS/5077>
38. Lijteroff, R., Lima, L. y Prieri, B. (2009). *Uso de líquenes como bioindicadores de contaminación atmosférica en la ciudad de San Luis, Argentina*. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 25(2), 111-120. Recuperado en 20 de septiembre de 2022, de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0188-49992009000200006&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992009000200006&lng=es&tlng=es).

39. Limones, D. Aguirre, E., Fonseca, J., Muro, G. y Sánchez, Y. (2015). *Aprovechamiento de los recursos maderables y no maderables de la zona semiárida de Durango*. RECTOR DE LA UJED, 93.
40. López, A. (2015). *El mundo de los líquenes: Naturaleza y utilización de unos organismos únicos*. Biol. on-line: Vol. 4, Núm. 1
41. López, M. D. C. (2014). *Modificación y síntesis de polímeros de Isopreno vía polimerización radicalica controlada*.
42. Martinez, M. (2002). *Esteroles*. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.
43. Martínez, R. (2010). *La importancia de la educación ambiental ante la problemática actual*. Revista Electrónica Educare, 14(1), 97-111. <https://doi.org/10.15359/ree.14-1.9>
44. Martino, D. (2015). *Estudio Químico del liquen Flavopunctelia Flaventior (Stirt.) Hale*. (Tesis de pregrado). Universidad nacional de ingeniería Lima, Perú.
45. Maulidiyah, M., Rachman, F., Mulkiyan, L. et al. (2023). *Antioxidant Activity of Usnic Acid Compound from Methanol Extract of Lichen Usnea sp.* J. Oleo Sci. 72, (2) 179-188.
46. Midence, L. A. S., y Ramirez, L. V. (2012). *La interculturalidad y la protección de los recursos naturales en guatemala: Interculturalism and the protection of natural resources in guatemala*. Revista Latinoamericana De Estudios Educativos, 42(3), 65.
47. Millot, Marion; Dieu, Amandine; Tomasi, Sophie (2016). *Dibenzofurans and derivatives from lichens and ascomycetes*. Nat. Prod. Rep., (), 10.1039/C5NP00134J–. doi:10.1039/C5NP00134J

48. Müller K. (2001). *Pharmaceutically relevant metabolites from lichens*. Applied microbiology and biotechnology, 56(1-2), 9–16.  
<https://doi.org/10.1007/s002530100684>
49. Nabors, M. (2006). *Introducción a la Botánica*. Pearson Educación, Madrid, pag. 475.2
50. Neamati, N., Hong, H., Mazumder, A., Wang, S., Sunder, S., Nicklaus, M. C., Milne, G. W., Proksa, B., y Pommier, Y. (1997). *Deposides and depsidones as inhibitors of HIV-1 integrase: discovery of novel inhibitors through 3D database searching*. Journal of medicinal chemistry, 40(6), 942–951.  
<https://doi.org/10.1021/jm960759e>
51. Olafsdottir, E. y Ingólfssdottir, K. (2001). *Polysaccharides from lichens: structural characteristics and biological activity*. Planta medica, 67(3), 199–208.  
<https://doi.org/10.1055/s-2001-12012>
52. Orellana, J. y Lalvay Portilla, T. (2018). *Uso e importancia de los recursos naturales y su incidencia en el desarrollo turístico*. Caso Cantón Chilla, El Oro, Ecuador. Revista interamericana de ambiente y turismo, 14(1), 65-79.  
<https://dx.doi.org/10.4067/S0718-235X2018000100065>
53. Paliya, B.S.; Bajpai, R.; Jadaun, V.; Kumar, J.; Kumar, S.; Upreti, D.K.; Singh, B.R.; Nayaka, S.; Joshi, Y.; Singh, B.N.; et al. (2016). *The genus Usnea: A potent phytomedicine with multifarious ethnobotany, phytochemistry and pharmacology*. RSC Adv. 2016, 6, 21672–21696.
54. Polovinka, M., Komarova, N., Korchagina, D., Sokolov, D., Luzina, O., Vlasenko, N., Malyuga, A., Romanova, E., y Salakhutdinov, N. (2012). *Secondary metabolites*

- of the lichen Cladonia stellaris*. Chemistry of Natural Compounds, 48(3), 392–395.  
<https://doi.org/10.1007/s10600-012-0259-4>
55. Popovici, V., Bucur, L. A., Schröder, V., Gherghel, D., Mihai, C. T., Caraiane, A., Badea, F. C., Vochița, G., y Badea, V. (2020). *Evaluation of the Cytotoxic Activity of the Usnea barbata (L.) F. H. Wigg Dry Extract*. Molecules (Basel, Switzerland), 25(8), 1865. <https://doi.org/10.3390/molecules25081865>
56. Portal de Biodiversidad de Guatemala. (2020). *Líquenes de Guatemala*. Recuperado en 24 de septiembre de 2022. Disponible en: <https://tinyurl.com/liquenesgt>
57. Robles Caycho, J., Morales Bueno, P., y Pastor de Abram, A. (1992). *Líquenes y sustancias líquénicas*. Revista De Química, 6(1), 65-76. Recuperado a partir de <https://revistas.pucp.edu.pe/index.php/quimica/article/view/4620>
58. Rodríguez, O., Díaz, F., Andrade, W., y Moncada, B. (2014). *Actividad antioxidante de líquenes de la cuenca alta del rio Bogotá*. Revista de Tecnología (Archivo), 13(2), 61-66.
59. Rundel, P. W. (1978). *The ecological role of secondary lichen substances*. Biochemical Systematics and Ecology, 6(3), 157-170.
60. Salgado, F., Albornoz, L., Cortéz, C., Stashenko, E., Urrea-Vallejo, K., Nagles, E., ... y Areche, C. (2017). *Secondary metabolite profiling of species of the genus Usnea by UHPLC-ESI-OT-MS-MS*. Molecules, 23(1), 54.
61. Santesson, J. (1973). *Identification and isolation of lichen substances*. Lichens. V. Ahmadjian y ME Hale, eds.
62. Schmeda, G. *et al.* (2008). *A new antifungal and antiprotozoal depside from the Andean lichen Protousnea poeppigii*. Phytotherapy Research: An International

- Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives, 22(3), 349-355.
63. Sepahvand, A., Studzińska-Sroka, E., Ramak, P., y Karimian, V. (2021). *Usnea sp.: Antimicrobial potential, bioactive compounds, ethnopharmacological uses and other pharmacological properties*; a review article. *Journal of Ethnopharmacology*, 268, 113656.
64. Serres, J. (1916). *Notas breves de materia médica, farmaco-química y farmacia galénica*. *Revista de la Facultad de Agronomía y Veterinaria*, 12.
65. Singh, P., Sharma, A., y Arora, R. (2015). *Terpenes: sources, applications and emerging role in modern drug discovery*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 5(3), 93-99.
66. Smeds, A. I., y Kytöviita, M.-M. (2010). *Determination of usnic and perlatolic acids and identification of olivetoric acids in Northern reindeer lichen (Cladonia stellaris) extracts*. *Lichenologist*, 42(6), 739–749.  
<https://doi.org/10.1017/S002428291000037X>
67. Synytsya, A., et al. (2009). *Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms Pleurotus ostreatus and Pleurotus eryngii: Structure and potential prebiotic activity*. *Carbohydrate Polymers*, 2009. 76(4): p. 548-556.
68. Tapia, E., y Reyes, R. (2008). *Productos forestales no maderables en México: Aspectos económicos para el desarrollo sustentable*. *Madera y bosques*, 14(3), 95-112. Recuperado en 21 de septiembre de 2022, de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-04712008000300005&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-04712008000300005&lng=es&tlng=es).

69. Truong, C., y Clerc, P. (2012). *The lichen genus Usnea (Parmeliaceae) in tropical South America: Species with a pigmented medulla, reacting C yellow*. *The Lichenologist*, 44(5), 625-637. doi:10.1017/S0024282912000400
70. Valencia, M. y Choque, M. (2022). *Evaluación de la citotoxicidad y cuantificación del ácido úsnico de los extractos acuosos y etanólicos al 70% de dos especies de líquenes (Usnea sp. y Ramalina) de la comunidad de Pacca, distrito de Anta-Cusco*.
71. Viteri, R. (2015). *Estudio Fitoquímico del extracto etanólico del líquen Usnea antarctica, procedente de la Antártida* [Doctoral dissertation, Tesis de Maestría]. San Antonio de los Altos, Venezuela: Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas).
72. Yoshimura I, Kurokawa T, Kinoshita Y, Yamamoto Y, Miyawaki H. (1994). *Lichen substances in cultured lichens*. *Journal of the Hattori Botanical Laboratory*, 76: 249-261.

## XI. ANEXOS

### Anexo No. 1. Glosario de terminos.

- **Actividad biológica:** capacidad inherente de una sustancia, como puede ser un fármaco o una toxina, para alterar una o más funciones químicas o fisiológicas de una célula, tejido, órgano u organismo.
- **Antibiótico:** Sustancia química capaz de paralizar el desarrollo de ciertos microorganismos patógenos, por su acción bacteriostática, o de causarles la muerte, por su acción bactericida, y que es producida por un ser vivo o fabricada por síntesis.
- **Antimicótico:** Medicamento o sustancia que se utiliza para combatir las infecciones por hongos.
- **Antioxidante:** Sustancia que evita la oxidación.
- **Antraquinonas:** sustancias fenólicas derivadas de la dicetona del antraceno.
- **Bioindicador:** Organismo vivo que se utiliza para determinar y evaluar el índice de contaminación de un lugar, especialmente de la atmósfera o del agua.
- **Biomasa:** Materia total de los seres que viven en un lugar determinado, expresada en peso por unidad de área o de volumen.
- **Biosíntesis:** Síntesis de compuestos orgánicos realizada por seres vivos o in vitro mediante enzimas.
- **Cianobacteria:** Microorganismo procarionte, provisto de clorofila y otros pigmentos que le proporcionan un color verde azulado, capaz de realizar la fotosíntesis.
- **Citotóxico:** Que destruye las células vivas.
- **Cromatografía en capa fina:** Método de afinidad empleado para separar los compuestos de una mezcla mediante una fase móvil y una fase estacionaria.

- **Cromatografía en columna:** Método cromatográfico de separación basado en la adsorción usado para aislar un único compuesto químico de una mezcla.
- **Depsidonas:** Compuestos derivados de los dépsidos que tienen un enlace éter además del enlace éster, lo que da lugar a un sistema policíclico rígido.
- **Dépsidos:** Compuestos formados por condensación de dos o más ácidos hidroxibenzoicos mediante los cuales, el grupo carboxilo de una molécula se esterifica con un grupo hidroxilo fenólico de una segunda molécula.
- **Dibenzofuranos:** Grupo de compuestos heterocíclicos constituido por un anillo de furano con dos anillos de benceno fusionados en los enlaces b y d.
- **Dímero:** Molécula formada por dos unidades que pueden ser iguales o diferentes.
- **Enzima:** Proteína que cataliza específicamente una reacción bioquímica del metabolismo.
- **Epífita:** Que vive sobre otra planta, sin alimentarse a expensas de esta.
- **Espectrofotometría:** Procedimiento analítico para medir la cantidad de luz absorbida por una sustancia con respecto a una longitud de onda determinada.
- **Esterificar:** Formar un éster mediante la unión de un ácido y un alcohol o un fenol.
- **Esterol:** Cada uno de los esteroides con uno o varios grupos alcohólicos, muy abundantes en los reinos animal y vegetal y en microorganismos.
- **Etnobotánica:** Disciplina que estudia las relaciones entre el ser humano y las plantas.
- **Etnoliquenología:** Una de las especialidades de la etnobotánica que se encarga del estudio de los usos que el hombre realiza de los líquenes.
- **Eutrofización:** Incremento de sustancias nutritivas en aguas dulces de lagos y embalses, que provoca un exceso de fitoplancton.

- **Extracto:** Producto sólido o espeso obtenido por evaporación de un zumo o de una disolución de sustancias vegetales o animales.
- **Fenoles:** Compuestos orgánicos aromáticos que contienen el grupo hidroxilo (OH-) como grupo funcional.
- **Fitoquímica:** La ciencia que se encarga del estudio de los productos químicos que producen o forman parte estructural de los vegetales.
- **Fotobionte:** Alga o cianobacteria que forma parte de un líquen y cumple la función principal de realizar la fotosíntesis.
- **Hifa:** Filamento del micelio de los hongos.
- **Lactonas:** Ésteres cíclicos que se obtienen mediante esterificación intramolecular a partir de moléculas que contienen grupos ácido y alcohol.
- **Liebermann – Burchard:** reactivo que se utiliza en una prueba colorimétrica basado en la formación de compuestos coloreados por acción de ácido sulfúrico concentrado sobre los esteroides en medio anhidro.
- **Líquen:** Organismo resultante de la simbiosis de hongos con algas unicelulares, que crece en sitios húmedos, extendiéndose sobre las rocas o las cortezas de los árboles en forma de hojuelas o costras grises, pardas, amarillas o rojizas.
- **Metabolito:** Producto del metabolismo.
- **Micobionte:** Hongo que forma parte de un líquen.
- **Microbicida:** Que mata los microbios.
- **Microclima:** Clima local de características distintas a las de la zona en que se encuentra.
- **Monómero:** Dícese de lo constituido por una sola parte

- **Naftoquinona:** Pigmentos naturales, caracterizados por poseer dos grupos carbonilo en las posiciones 1,4 y con menor frecuencia en 1,2 ó 1,3 en el anillo del naftaleno.
- **Polaridad:** propiedad de las moléculas que representa la desigualdad de las cargas eléctricas en la misma.
- **Quinonas:** grupo de compuestos dicetónicos cíclicos conjugados, derivados de uno de los isómeros de la ciclohexanodiona.
- **Recursos forestales maderables:** Productos que provienen del cuerpo de las plantas que producen tejido leñoso.
- **Recursos forestales no maderables:** Productos que se produzca naturalmente en los bosques que no provienen de cuerpos leñosos.
- **Reflujo:** Técnica de laboratorio que implica la condensación de vapores y el retorno de este condensado al sistema del que se originó.
- **Rotavapor:** Instrumento para evaporar sustancias mediante destilación y luego volver a condensarlas para separar los componentes básicos unos de otros.
- **Salkowsky:** reactivo que se utiliza en una prueba colorimétrica utilizando ácido sulfúrico para realizar un ensayo de anillo de color.
- **Sesquiterpenos:** Compuestos terpénicos formados por 15 carbonos a partir de tres unidades de isoprenoides.
- **Simbiosis:** Asociación de individuos animales o vegetales de diferentes especies, sobre todo si los simbiosistas sacan provecho de la vida en común.
- **Sustancias líquénicas:** conjunto heterogéneo de sustancias específicas presentes en los líquenes.
- **Sustrato:** Lugar que sirve de asiento a una planta o un animal fijo.

- **Talo liquénico:** Cuerpo de las talofitas, equivalente al conjunto de raíz, tallo y hojas de otras plantas.
- **Tamizaje fitoquímico:** Identificación de los metabolitos secundarios presentes en los extractos de productos naturales, a través de reacciones y análisis químicos bien descritos en la literatura.
- **Terpenos:** Hidrocarburos que se encuentra en los aceites volátiles obtenido de las plantas, principalmente de las coníferas y de los frutos cítricos.
- **Xantonas:** Grupo de compuestos carbónicos que consisten en un heterociclo de xanteno oxidado en la posición 9.

**Anexo No. 2.** Clasificación taxonómica de espécimen liquénico utilizado.

---

Taxonomía	
Reino	Fungi
División	Ascomycota
Clase	Lecanoromycetes
Orden	Lecanorales
Familia	Parmeliaceae
Género	<i>Usnea</i>
Especie	<i>Usnea barbata</i>

---

*Fuente.* IBUNAM (1964).

### Anexo No. 3. Certificado de curación e identificación del líquen *Usnea barbata*.

PBX: 2507-1500  
Ext. 21530



CENTRO DE ESTUDIOS  
AMBIENTALES Y BIODIVERSIDAD  
· CEAB ·

#### **HERBARIO UVAL** CENTRO DE ESTUDIOS AMBIENTALES Y BIODIVERSIDAD (CEAB) UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

18 Av. 11-95, Zona 15, V.H. III  
Apartado Postal No. 82, 01901  
Guatemala, Guatemala, C.A.

Guatemala, 25 de julio de 2023

A quien interese  
Presente

Le saludo cordialmente esperando que sus actividades estén desarrollándose con éxito.

El motivo de la siguiente comunicación es para certificar que la estudiante YAILIN KARINA VELASQUEZ RIVERA con carné no. 191533 ha asistido y utilizado las instalaciones del Herbario UVAL para el proceso de curación e identificación del líquen *Usnea barbata* perteneciente a la familia Parmeliaceae. Sus colectas han sido registradas en la colección del Herbario UVAL bajo los registros 23,025 y 23,026.

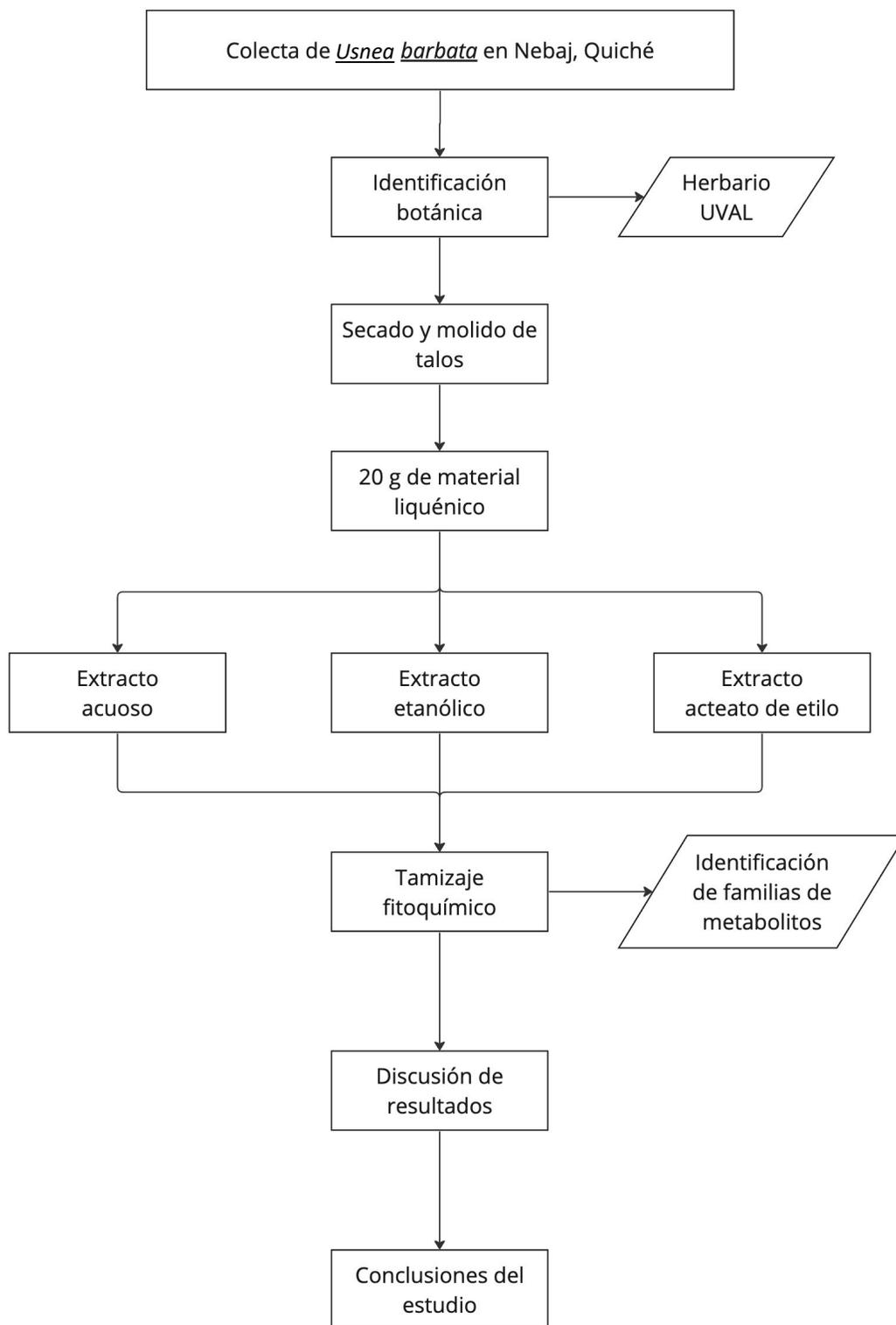
Para llevar a cabo el proceso de curación, Yailin realizó las colectas de sus especímenes bajo la licencia de colecta del Herbario UVAL aprobada por CONAP. Además, realizó el secado, montaje, identificación, cuarentena y registro de accesiones voucher que servirán de referencia para los especímenes que ella empleará en su trabajo de tesis.

Extendemos el certificado para los fines que al interesado convenga.

Quedo a las órdenes,

Javier Aju, M.Sc.  
Colegiado activo No. 5299  
Coordinador Herbario UVAL  
Centro de Estudios Ambientales y Biodiversidad (CEAB)  
Universidad del Valle de Guatemala

**Anexo No. 4.** Diagrama de flujo de metodología de investigación.



**Anexo No. 5.** Listado de reactivos utilizados en proyecto.

<b>Reactivo</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Código</b>
Acetato de etilo	Merck	1.09623.2500
Ácido sulfurico concentrado	J.T.Baker	-
Ácido tánico	J.T.Baker	-
Anhídrido acético	Merck	1.000.42.1000
Benceno	Merck	-
Cloruro de sodio	Química Reitzel S.A.	00-2100
Colesterol	J.T.Baker	57-88-5
Etanol 98%	-	-
Éter de petróleo	Merck	1.01769.5000
Gelatina	Merck	-
Hidróxido de amonio 30%	Merck	AX1303-3
Hidróxido de Potasio	Merck	1.05033.1000
Hierro (III) cloruro	Merck	8.03945.1000
Sulfato de sodio anhidro	Merck	1.06649.1000
Almidón soluble	Merck	-
Hidróxido de sodio	Merck	1.06498.1000
Cobre (II) sulfato pentahidratado	Merck	1.02790.1000
Potasio-sodio tartrato tetrahidratado	Merck	1.08087.1000

**Anexo No. 6.** Listado de equipo utilizado en proyecto.

<b>Equipo</b>	<b>Especificaciones</b>
Licuadaora	Marca Oaster
Balanza analítica	Marca Precisa, serie 320XB. Max: 320g - Min: 0.02g
Estufa agitadora	Marca IKA C-MAG HS7
Sistema de reflujo	Kimble Kontes Kem-Kit Semi-Macro 19/22 Serie 9269800-000
Rotavapor	Brinkmann Buchi KRvr 65/45 V: 110 - Hz: 60

**Anexo No. 7.** Reactivos empleados según ensayo preliminar para detección de metabolitos.

<b>Etapa de análisis</b>	<b>Ensayo</b>	<b>Reactivos</b>
Tamizaje fitoquímico	Cloruro Férrico	NaCl 10% FeCl <sub>3</sub> al 5%
	Gelatina	NaCl 10% Sol. Gelatina 1%
	KOH	KOH al 10% FeCl <sub>3</sub> al 5%
	Borntrager	Benceno Hidróxido de amonio
	Liebermann - Burchard	Éter de petróleo Benceno Sulfato de sodio anhidro Anhídrido acético Ácido sulfúrico conc.
	Salkowsky	Éter de petróleo Benceno Sulfato de sodio anhidro Ácido sulfúrico conc.
	Fehling	Agua desmineralizada Reactivo de Fehling
	KOH	KOH al 5% FeCl <sub>3</sub> al 5%

**Anexo No. 8.** Colecta de líquen *Usnea barbata* en la aldea Chuatuj, Nebaj, Quiché, Guatemala. Crédito: Fransisco Obregón.



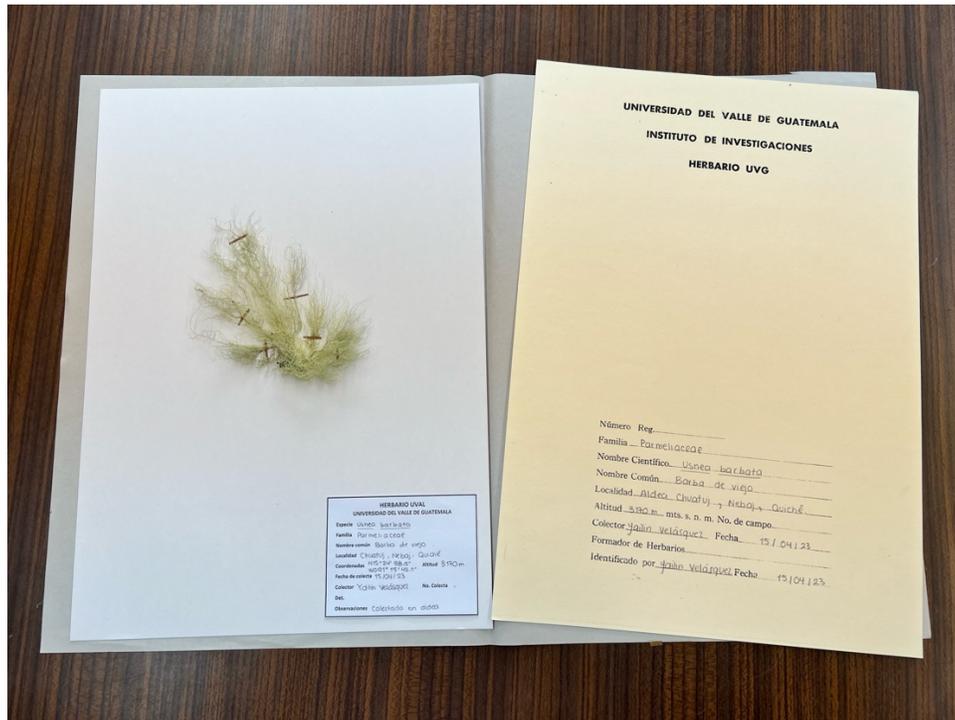
**Anexo No. 9.** Equipo de apoyo para Gira geográfica y colecta, integrantes de la carrera de Biología de la Universidad del Valle de Guatemala.



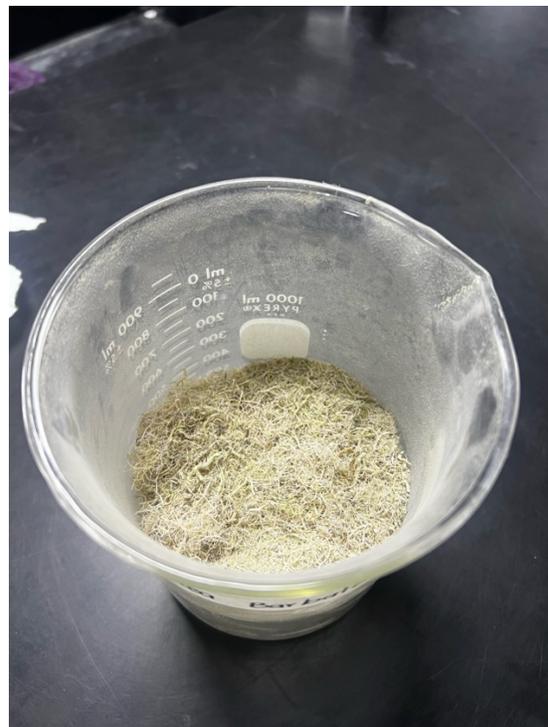
Anexo No. 10. Acondicionamiento de muestras en Herbario UVAL.



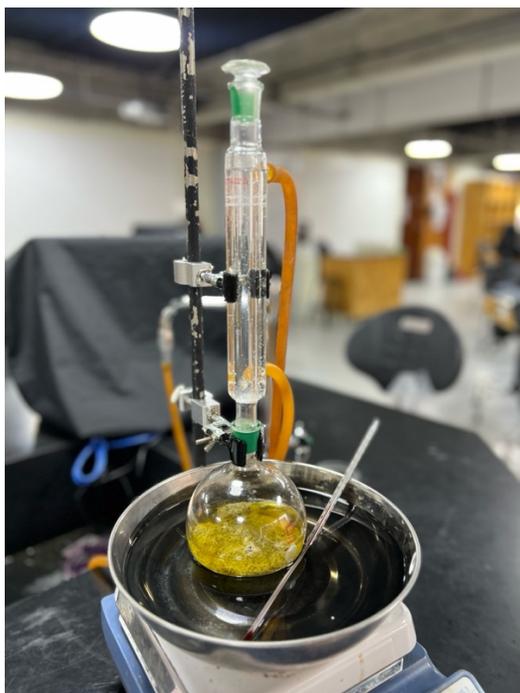
Anexo No. 11. Identificación y montaje de espécimen para registro en Herbario UVAL.



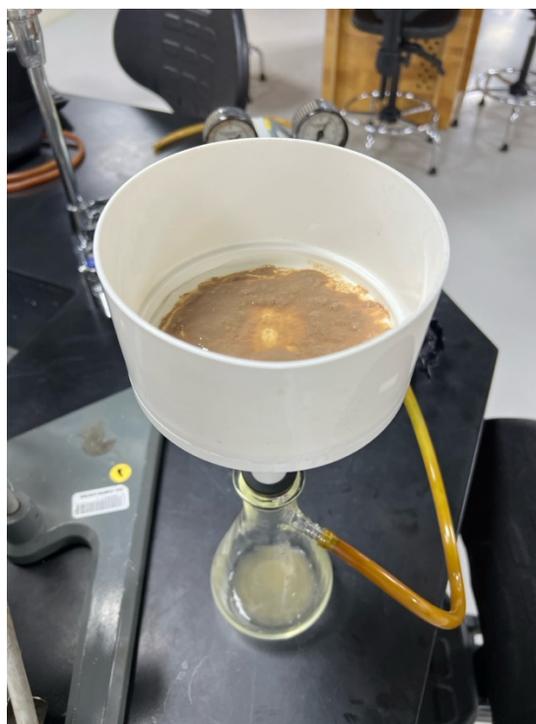
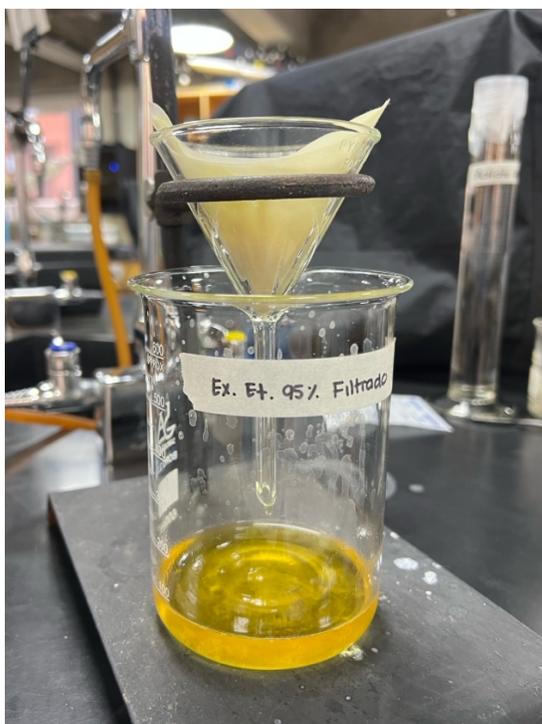
Anexo No. 12. Molido de talos secos de *Usnea barbata*.



**Anexo No. 13.** Montaje de equipo de reflujo para extracción de metabolitos.



**Anexo No. 14.** Filtrado de extractos por gravedad (etanólico y acetato de etilo) y vacío (acuoso).



**Anexo No. 15.** Extractos a) acuoso, b) etanólico y c) acetato de etilo.



a)

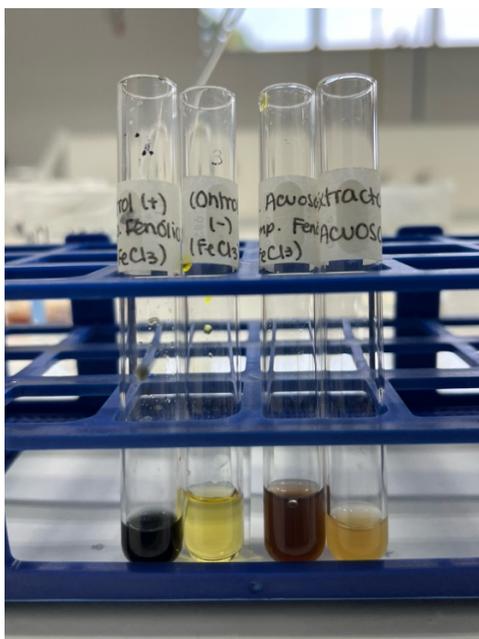
b)

c)

**Anexo No. 16.** Concentración de extractos en rotavapor.



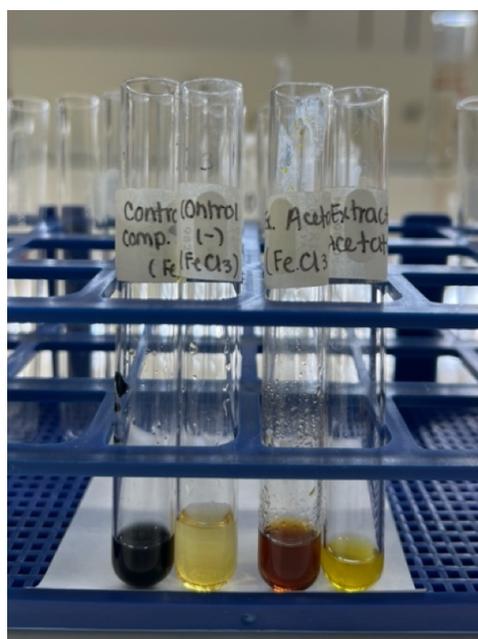
**Anexo No. 17.** Ensayo de  $\text{FeCl}_3$  al 5% para compuestos fenolicos en: a) extracto acuoso, b) extracto etanólico y c) extracto de acetato de etilo.



a)



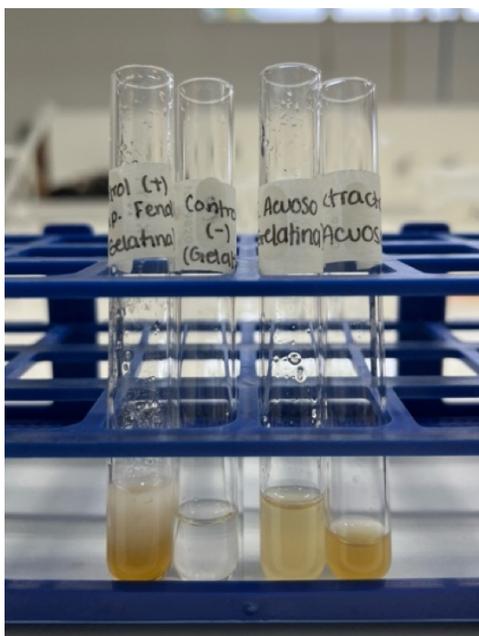
b)



c)

*\*Tubos de izquierda a derecha: 1) control positivo (ácido tánico), 2) control negativo (agua desmineralizada), 3) extracto sometido a prueba, 4) extracto puro.*

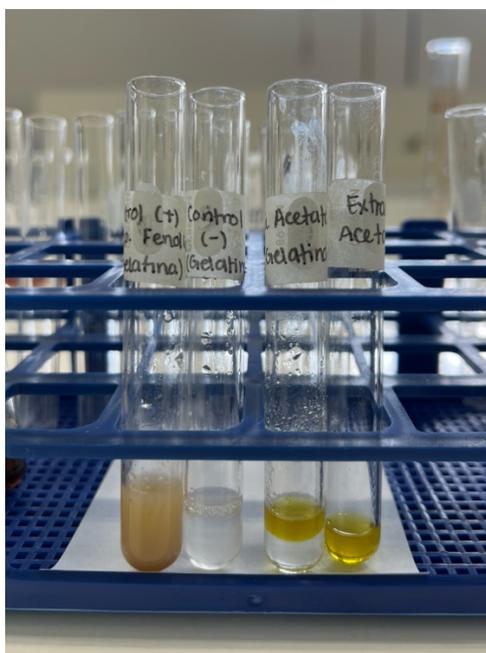
**Anexo No. 18.** Ensayo de Gelatina para taninos y compuestos fenolicos en: a) extracto acuoso, b) extracto etanólico y c) extracto de acetato de etilo.



a)



b)



c)

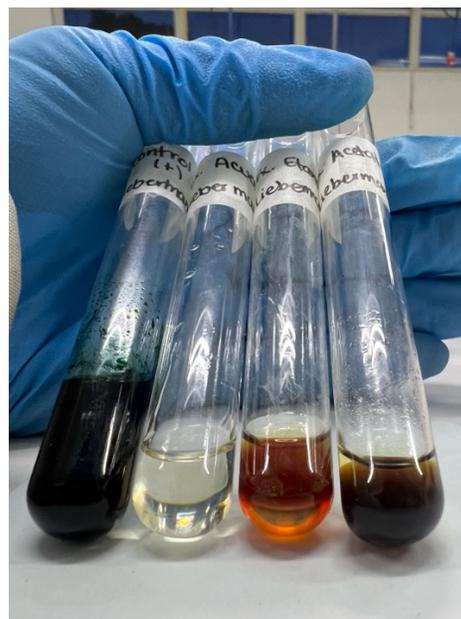
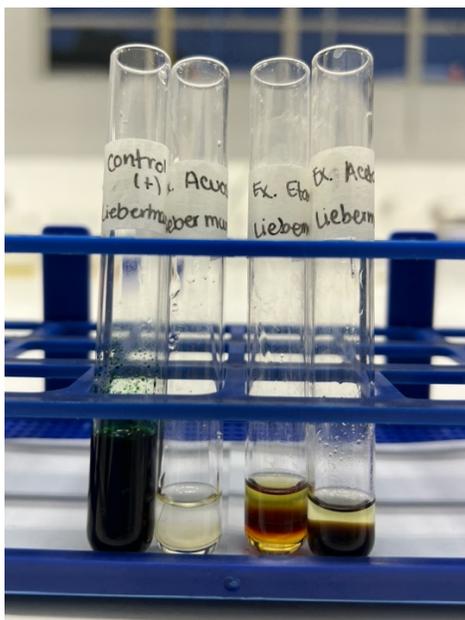
*\*Tubos de izquierda a derecha: 1) control positivo (ácido tánico), 2) control negativo (agua desmineralizada), 3) extracto sometido a prueba, 4) extracto puro.*

**Anexo No. 19.** Ensayo de Borntrager para quinonas en diferentes extractos.



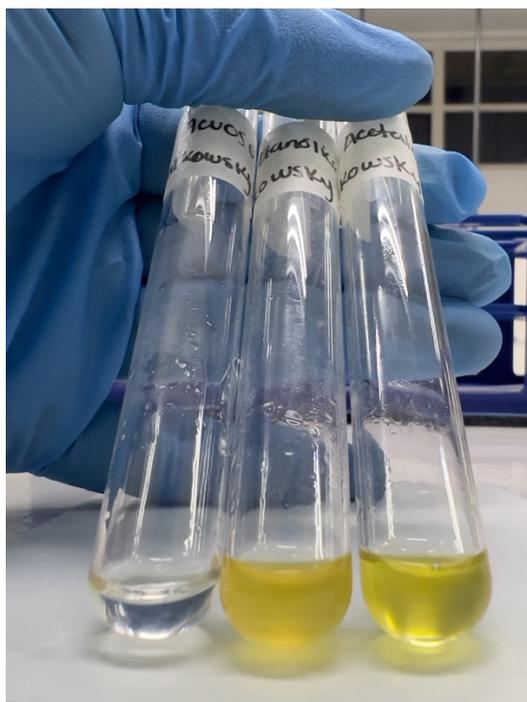
*\*Tubos de izquierda a derecha: 1) extracto acuoso sometido a prueba, 2) extracto etanólico sometido a prueba, 3) extracto de acetato de etilo sometido a prueba.*

**Anexo No. 20.** Ensayo de Liebermann-Buchard para esteroides en diferentes extractos.

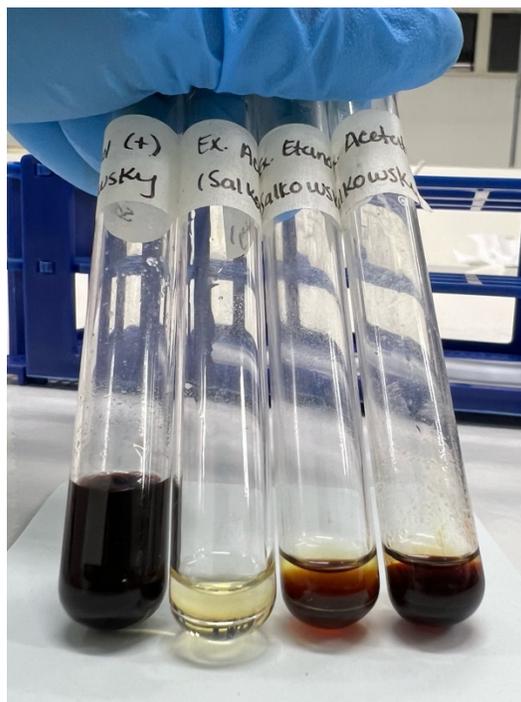


*\*Tubos de izquierda a derecha: 1) control positivo (colesterol), 2) extracto acuoso sometido a prueba, 3) extracto etanólico sometido a prueba 4) extracto de acetato de etilo sometido a prueba.*

**Anexo No. 21.** Ensayo de Salkowsky para esteroides en diferentes extractos.



**a)**



**b)**

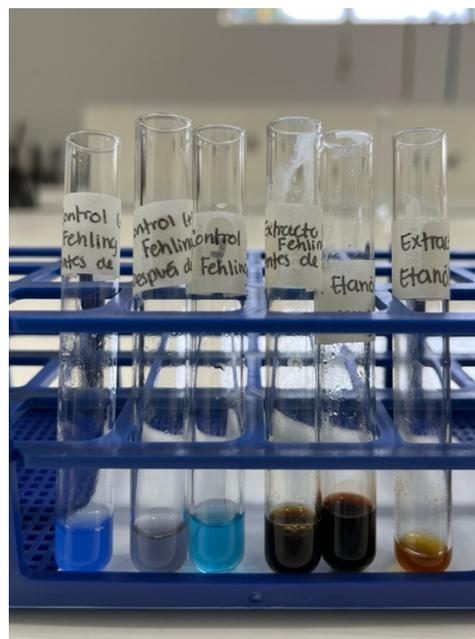
\* Tubos de izquierda a derecha imagen a): 1) extracto acuoso, 2) extracto etanólico, 3) extracto de acetato de etilo, todos posterior de extracción con benceno.

\*\*Tubos de izquierda a derecha imagen b): 1) control positivo (colesterol), 2) extracto acuoso sometido a prueba, 3) extracto etanólico sometido a prueba 4) extracto de acetato de etilo sometido a prueba.

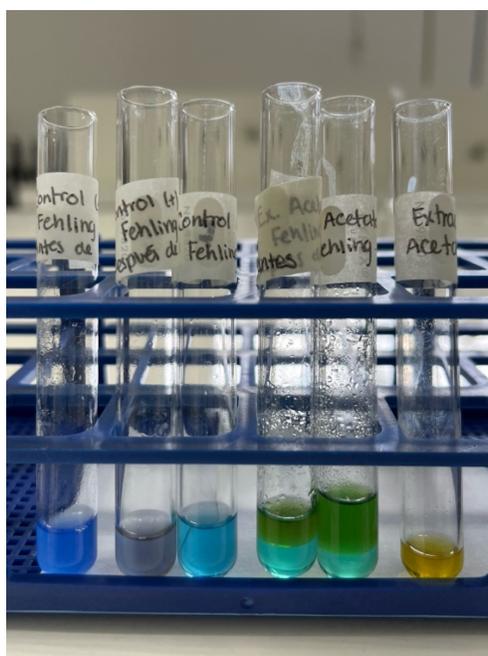
**Anexo No. 22.** Ensayo de Fehling para polisacáridos en: a) extracto acuoso, b) extracto etanólico y c) extracto de acetato de etilo.



a)



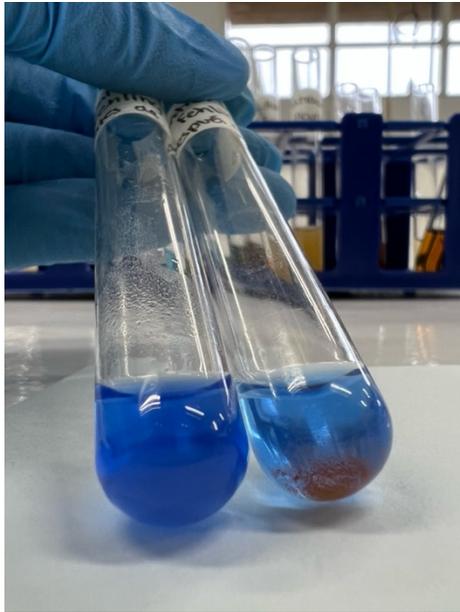
b)



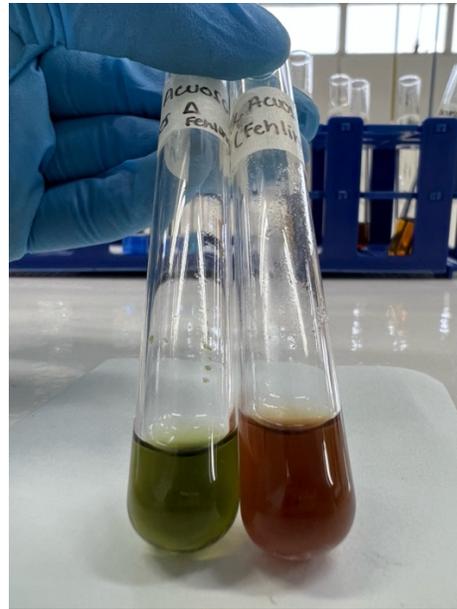
c)

*\*Tubos de izquierda a derecha: 1) control positivo (almidón) antes de calentamiento, 2) control positivo (almidón) después de calentamiento, 3) control negativo (agua desmineralizada), 4) extracto sometido a prueba antes de calentamiento, 5) extracto sometido a prueba después de calentamiento, 6) extracto puro.*

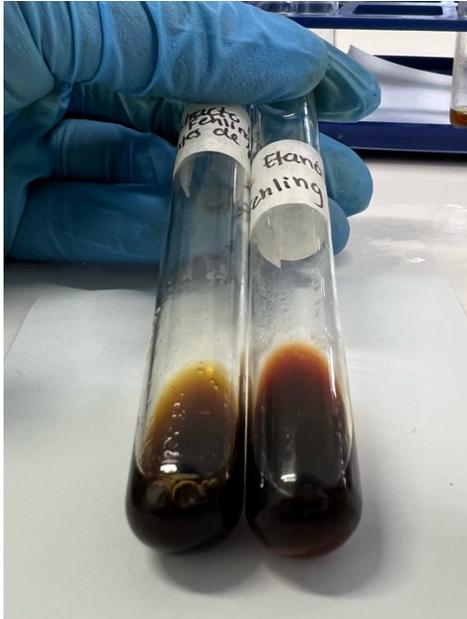
**Anexo No. 23.** Cambios observados en ensayo de Fehling para polisacáridos posterior a calentamiento en baño maría para: a) control positivo (almidón), b) extracto acuoso, c) extracto etanólico y c) extracto de acetato de etilo.



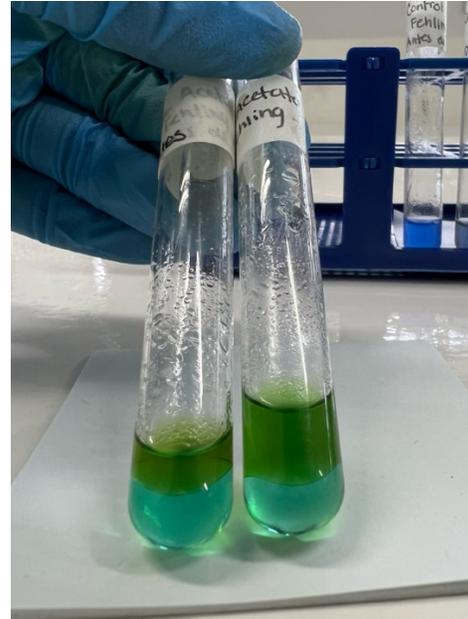
a)



b)



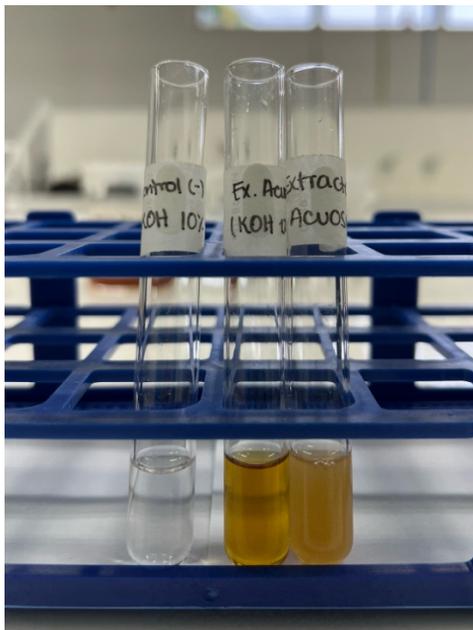
c)



d)

*\*Tubos de izquierda a derecha: 1) Resultados antes de calentamiento, 2) Resultados después de calentamiento.*

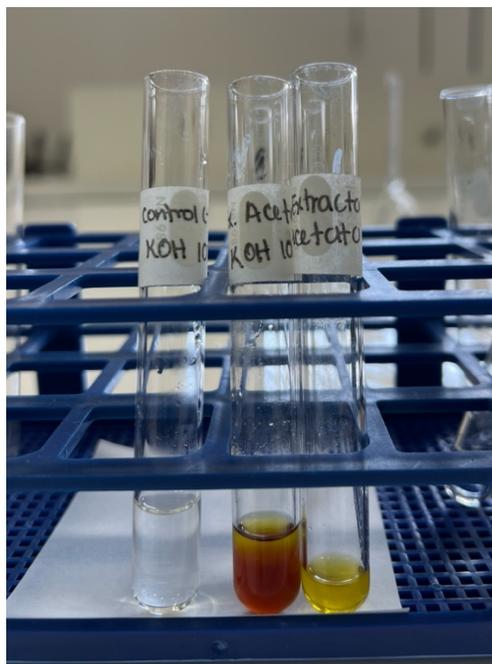
**Anexo No. 24.** Ensayo de KOH al 10% para sustancias líquénicas en: a) extracto acuoso, b) extracto etanólico y c) extracto de acetato de etilo.



a)



b)



c)

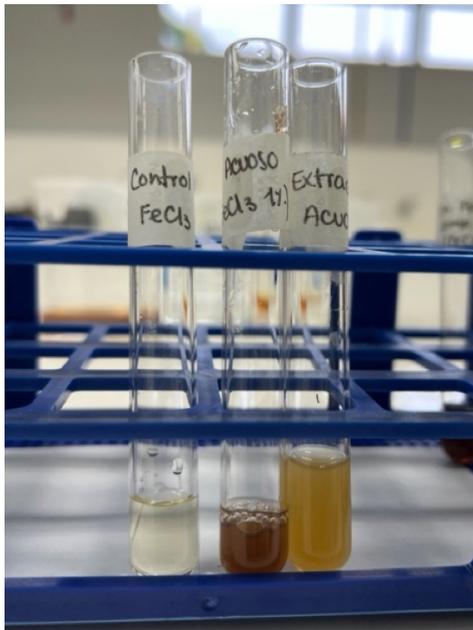
*\*Tubos de izquierda a derecha: 1) control negativo (agua desmineralizada), 2) extracto sometido a prueba, 3) extracto puro.*

**Anexo No. 25.** Cambios observados en ensayo de KOH al 10% para sustancias liquénicas en extracto acuoso.



*\*Tubos de izquierda a derecha: 1) extracto sometido a prueba, 2) extracto puro.*

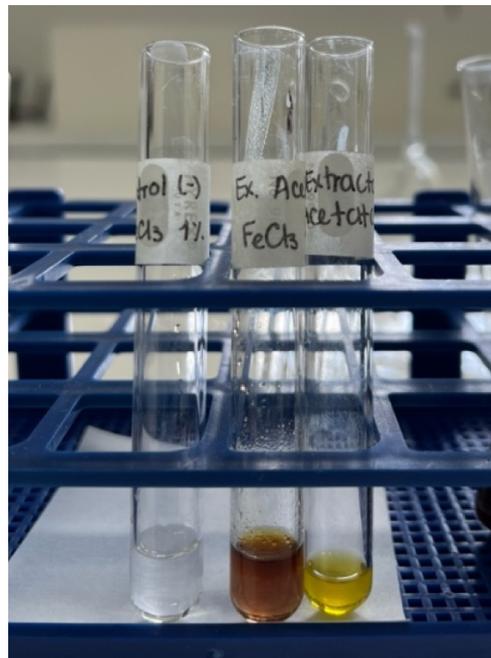
**Anexo No. 26.** Ensayo de  $\text{FeCl}_3$  al 1% para sustancias liquénicas en: a) extracto acuoso, b) extracto etanólico y c) extracto de acetato de etilo.



a)



b)



c)

*\*Tubos de izquierda a derecha: 1) control negativo (agua desmineralizada), 2) extracto sometido a prueba, 3) extracto puro.*

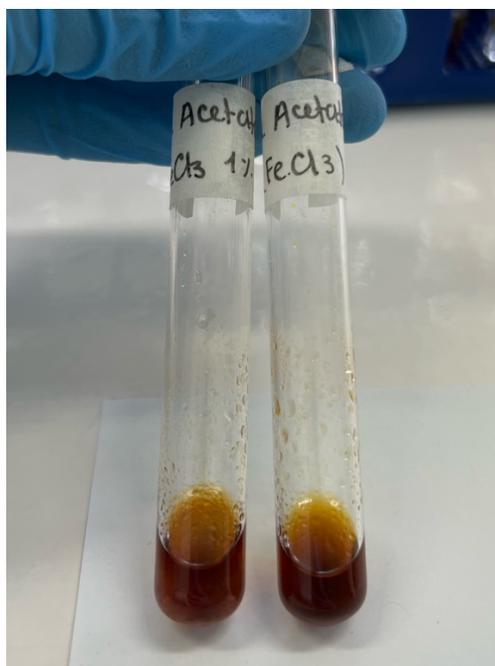
**Anexo No. 27.** Comparación entre cambios observados en ensayo de  $\text{FeCl}_3$  al 5% para taninos/compuestos fenólicos y  $\text{FeCl}_3$  al 1% para sustancias liquénicas en: a) extracto acuoso, b) extracto etanólico y c) extracto de acetato de etilo.



a)



b)



c)

*\*Tubos de izquierda a derecha: 1) extracto sometido a  $\text{FeCl}_3$  al 1% , 2) extracto sometido a  $\text{FeCl}_3$  al 5%.*