



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA

Cuantificación de compuestos fenólicos y evaluación de la actividad tóxica aguda y analgésica del extracto etanólico de *Thamnia vermicularis* en ratones Balb/c y ratas Holtzman

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado en Biología

Autor:

Wendy Gabriela Chinchá Arias

Asesor:

Leon Faustino Villegas Vilchez

Lima-Perú

2025

Jurado calificador

Presidente: Dr. Cesar Yoshi Lopez Matayoshi

Vocal: Dr. Manuel Enrique Gasco Tantachuco

Secretario: Mg. Ruth Liliana Cristobal Delgado

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Los egresados:

N°	APELLIDOS Y NOMBRES
1.	CHINCHA ARIAS WENDY GABRIELA

Pertencientes al programa de la CARRERA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA, autores del trabajo titulado: **Cuantificación de compuestos fenólicos y evaluación de la actividad tóxica aguda y analgésica del extracto etanólico de *Thamnia vermicularis* en ratones Balb/c y ratas Holtzman**, el cual ha sido elaborado, sustentado y aprobado, según corresponda, para optar por el TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA bajo la modalidad de TESIS.

En calidad de docentes asesores de la Universidad Peruana Cayetano Heredia:

N°	APELLIDOS Y NOMBRES DEL DOCENTE	FACULTAD	NIVEL DE ASESORÍA
1.	VILLEGAS VILCHEZ LEON FAUSTINO	FACI	ASESOR

Declaramos que el contenido del presente documento es original y que las citas y referencias a otros autores cumplen con las normas académicas establecidas. En ese sentido, hacemos constar que:

- El documento presenta un porcentaje de similitud de 4%, según el reporte emitido por el software Turnitin® (identificador de entrega: 3356856155; fecha de entrega: 30/09/2025).
- Tras una revisión detallada del reporte y del contenido del trabajo en cuestión, no se han identificado indicios de plagio.
- Se certifica que el documento respeta los principios de integridad académica y cumple con los requisitos institucionales de originalidad.

Lugar y fecha: Lima, 30 de septiembre de 2025



Firma del asesor

N° DNI: 07042189

ORCID: 0000-0001-6030-2877

DEDICATORIA

A la memoria de mi abuelito José Eleazar Arias, quien estuvo presente durante todos mis años de universidad acompañándome hasta en los momentos más difíciles provocados por mi salud. Me hubiera gustado tenerlo presente en este momento que cumpla mis sueños, sin embargo, sé que desde el cielo está felicitándome y sintiéndose orgulloso de la profesional que se está formando.

Gracias por la motivación dada a través de los años y los recuerdos otorgados.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por permitirme cumplir parte de mis metas propuestas y darme la fuerza para realizarlo a pesar de las dificultades presentadas por mi salud.

Agradezco a mis padres por los esfuerzos realizados para poder culminar mis estudios y formarme como profesional dentro de mi carrera.

Agradezco a mi pareja por motivarme a pesar del cansancio y el desánimo por mi salud para poder continuar con este proyecto y culminarlo.

Agradezco a mi asesor, el Mag. León F. Villegas Vélchez por el apoyo brindado y paciencia en la presente tesis de investigación.

Finalmente agradezco a mi mentora la Dra. Magdalena Pavlich por inculcarme el deseo de investigación en el área poco estudiada de los hongos y por estar detrás en el desarrollo de la tesis

Índice

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
I. INTRODUCCIÓN.....	3
II. HIPÓTESIS.....	7
III. OBJETIVOS.....	7
IV. MATERIALES.....	8
V. MÉTODOS.....	10
VI. RESULTADOS.....	16
VII. DISCUSIÓN.....	22
VIII. CONCLUSIONES.....	28
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29
ANEXOS Y TABLAS.....	37

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Análisis del número de contorsiones y el porcentaje de actividad analgésica

Tabla 2. Periodo de Latencia en segundos, con relación al tiempo de experimentación, de los individuos empleados.

Tabla 3. Registro de efectos evaluados durante 14 días en la aplicación del extracto de *Thamnia vermicularis*.

LISTA DE FIGURAS

Imagen 1. Vista satelital del distrito de Puños

Imagen 2. Vista del panorama de la zona de estudio (Departamento de Huánuco, distrito de Puños, Perú).

Imagen 3. Lique *Thamnia vermicularis* secado.

Gráfico 1. Concentración de ácido gálico (AG) en mMol Vs Absorbancia a 765nm

Gráfico 2. Análisis del número de contorsiones según el tratamiento aplicado.

Gráfico 3. Comparación del promedio del tiempo de duración de los individuos con relación a 15 segs. establecidos. (N= 30 ratones)

Gráfico 4. Comparación del aumento del porcentaje del tiempo de duración de los individuos con relación al tiempo establecido.

Figura 1. Flujograma indicando procedimiento de la prueba de toxicidad aguda a dosis de 2.00 g/kg de peso de animal (guía n°423 de la OECD)

LISTA DE ANEXOS

- Carta de Aprobación del comité de ética
- Carta de certificación del espécimen identificado

RESUMEN

El género *Thamnolia*, es un género críptico, conocido en la medicina tradicional china, por poseer actividad antiinflamatoria, antioxidante, anticancerígena, entre otras; en ello radica la importancia de ampliar los estudios sobre los metabolitos que pueda tener este líquen.

El propósito de la investigación realizada fue cuantificar los compuestos fenólicos totales, evaluar la actividad analgésica y la toxicidad aguda, presentes en el extracto etanólico del líquen *Thamnolia vermicularis*, el cual fue recolectado en la provincia de Huánuco. Para los ensayos biológicos se emplearon ratones BALB/c en la evaluación de la actividad analgésica mediante el modelo de contorsiones inducidas por ácido acético y ratas Holtzman para la determinación de la toxicidad aguda. El extracto presentó un contenido de compuestos fenólicos de 181.56 mg de AG/g de extracto, la administración del extracto etanólico por vía oral no produjo mortalidad ($DL_{50} > 5000$ mg/kg), el efecto analgésico del líquen se evidenció partir de la primera dosis administrada (250 mg/kg) mostrando una respuesta creciente dependiente de la dosis en comparación con el diclofenaco sódico (10 mg/kg).

Este estudio demuestra que el extracto etanólico del líquen *Thamnolia vermicularis*, no presenta efecto tóxico agudo por vía oral y exhibe propiedades analgésicas en el modelo biológico ensayado.

PALABRAS CLAVES:

Líquén, Analgesia, Huánuco, Medicina natural, Toxicidad aguda, *Thamnolia vermicularis*

.

ABSTRACT

The *Thamnolia* genus is a cryptic genus, known in traditional Chinese medicine for having anti-inflammatory, antioxidant, and anticancer activity, among others; this is the reason for the importance of expanding studies on the metabolites that this lichen may have.

The purpose of the research carried out was to quantify the total phenolic compounds, and to evaluate the analgesic activity and the acute toxic activity present in the ethanolic extract of the lichen *Thamnolia vermicularis*, which was collected in the province of Huánuco. For the biological assays, BALB/c mice were used to assess analgesic activity through the acetic acid-induced writhing test, and Holtzman rats were used to determine the acute toxicity. The extract had a phenolic compound content of 181.56 mg of FA/g of extract. Oral administration of the ethanolic extract did not cause mortality (DL50 > 5000 mg/kg). The analgesic effect of the lichen extract was evident from the first administered dose (250 mg/kg) showing a dose-dependent increasing response, with greater efficacy compared to sodium diclofenac (10 mg/kg).

This study shows that the ethanolic extract of the lichen *Thamnolia vermicularis* contains phenolic, does not present an acute toxic effect when administered orally and exhibits analgesic properties in the biological model tested.

Keywords:

Liquen, Analgesia, Huánuco, Natural medicine, Acute toxicity, *Thamnolia vermicularis*

I. INTRODUCCIÓN

La medicina natural se define como el conjunto de expresiones concretas relacionadas a las culturas ancestrales y a los recientes descubrimientos que se han dado sin el uso de los insumos que comúnmente se emplean en la medicina convencional⁽¹⁾.

El ser humano ha interactuado constantemente con el uso de suministros naturales desde su origen. Se ha empleado principalmente las plantas por su disponibilidad y los diversos usos que tiene. El empleo de un espécimen en particular va a estar relacionado con la presencia de un determinado compuesto que se encuentre en su estructura y a la interacción con la fisiología humana ⁽²⁾. Entre los diversos ámbitos en los que se emplea, se ha dado gran importancia a la salud debido al bajo riesgo que representa su empleo y la alta accesibilidad en la economía a comparación a los medicamentos desarrollados de manera sintética⁽³⁾.

Los líquenes son organismos pertenecientes al reino Fungi, cuyo resultado proviene de la relación simbiótica de un organismo heterótrofo (hongo), conocido como micobionte, y otro fotosintético, denominado fotobionte. Estos pueden ser cianobacterias verde azulado o algas unicelulares, originando con su asociación talos liquénicos. Sin embargo, no todas las algas son capaces de formar esta asociación.

Estos organismos poseen gran originalidad morfológica, fisiológica, adaptativa, y diversos modos de vida que le permite adaptarse a diferentes tipos de sustrato inertes u orgánicos ⁽⁴⁾. Se ha estimado que existen aproximadamente 14 000 especies de líquenes identificadas distribuidas en una amplia variedad de ecosistemas desde la región polar hasta el Ecuador. Estas especies solo constituyen un 8% de la vegetación del planeta y son empleados como bioindicadores de las condiciones ambientales de su entorno ⁽⁴⁾.

Se ha determinado unas 700 sustancias bioactivas propias de los líquenes de los cuales se reportan depsidonas, compuestos lipídicos alifáticos, depsonas, éster bencílico, ácidos úsnicos, xantomas, dibenzofuranos, entre otros; los cuales son resultados de la simbiosis entre el micobionte y fitobionte. Al ser resultado de las simbiosis estas se acumulan en la capa exterior de las hifas medulares, otras

sustancias suelen estar acumuladas en el córtex, el cual permite su acumulación al ser una capa de grosor variable. Estas sustancias tienen un papel fundamental en la protección del organismo ante factores externos que puedan dañarlo. En el córtex se conoce la acumulación de: atranorina, ácido úsnicos, rizocárpico, algunas líquen-xantonas y vulpínico, distribuido en la médula se conoce los ácidos fumarprotocetrático, tamnólico, lecanórico, entre otros. Algunas de estas sustancias proporcionan los colores específicos de los líquenes⁽⁴⁾.

Los polifenoles, también llamados compuestos fenólicos, son aquellas moléculas orgánicas sintetizadas por las plantas relacionados con su interacción con el medio ambiente, sirviendo de moléculas de defensa de estas. Son parte de los denominados productos secundarios, son sintetizados en pequeñas cantidades y algunas sustancias están relacionadas a un determinado género, familia o especie^(5,6).

Tienen una estructura básica compuesta por un grupo hidroxilo unido a uno o más anillos aromáticos, los cuales son clasificados en: flavonoides y no flavonoides. Su clasificación también va a depender del grado de solubilidad de la molécula y el número de anillos fenólicos con sus respectivas estructuras unidas⁽⁷⁾. En los líquenes, dichas moléculas están relacionadas con la presencia de quinonas(antroquinas), terpenoides, depsidonas y depsidos⁽⁸⁾.

Tales compuestos poseen un interés farmacológico por sus propiedades antibacterianas, antivirales y anticancerígenas, analgésicas, antiinflamatorias, entre otras. Su eficacia es reconocida en el tratamiento de gripes, hematomas y hemorragias^(8,9). Sin embargo, es de importancia el uso de sus propiedades antibióticas y antivirales, como el uso de especies del género *Usnea* por la presencia principalmente del ácido Úsnico⁽¹⁰⁾. Otras sustancias son empleadas como antiinflamatorios no esteroideos en sustitución de las cortisonas al carecer de reacciones adversas. En el caso de la propiedad antitumoral se conoce el uso de algunos polisacáridos líquénicos como homoglucanos⁽⁴⁾.

Sin embargo, a pesar de las ventajas, es necesario mantener un riguroso control dado que se cree que la medicina natural no posee efectos tóxicos⁽¹¹⁾ y puede ser

usado sin supervisión, sin embargo, hay que tener presente que mucha de estas sustancias puede ser venenosas para el ser humano.

Los estudios farmacológicos son un conjunto de ensayos realizados para determinar el perfil toxicológico de la molécula justificando su uso en caso de emplearse para el consumo humano. Sin embargo, los efectos provocados por la ingesta crónica y elevada de polifenoles pueden resultar en efectos negativos para la salud. Un tipo de estudio para el efecto de toxicidad in vivo es el estudio de la toxicidad aguda, la cual se describe como la evaluación de un determinado compuesto bioactivo o fármaco administrado en elevadas dosis como dosis única o repetida en menos de 24 hrs^(7,8).

Existen diferentes modelos animales para la evaluación de los posibles efectos secundarios de nuevos fármacos que se desarrollan. En el ámbito de investigación con roedores, se emplea con frecuencia como modelo animal a la especie *Rattus rattus* de la cepa Holtzman debido a la amplia documentación que existe sobre efectos en el comportamiento^(12,13). Además de su amplio uso en investigaciones toxicológicas y farmacológicas^(14,15).

Una de las cepas más utilizadas para estudios de analgesia son los ratones Balb/C, debido a su amplia disponibilidad y su sensibilidad al dolor^(16,17). A pesar de la estabilidad genética que presentan, es importante destacar que cada individuo puede presentar una amplia variabilidad de respuesta, lo que permite un estudio más completo de la eficacia de los tratamientos⁽¹⁷⁾⁽¹⁸⁾⁽¹⁹⁾.

El género *Thamnolia*, es un género críptico para algunos liquenólogos debido a una peculiar morfología y al amplio rango de distribución encontrándose principalmente en el ártico, en zonas montañosas del hemisferio norte y en regiones de temperaturas frías del hemisferio sur. Además de presentar una aparente falta de reproducción sexual y variación química. Este género es conocido como gusanos blancos debido a su coloración blanquecina y al hallarse entre la hierba baja y musgos⁽²⁰⁻²²⁾. Entre las especies de este género se encuentra *Thamnolia vermicularis*, el cual se conoce su empleo dentro de la medicina tradicional china,⁽²³⁾ lo que ha provisto de múltiples estudios para describir su actividad farmacológica. Se ha encontrado que este liquen posee actividad

antiinflamatoria, antioxidante, anticancerígena, entre otras; por lo que se ha visto ampliar los estudios sobre los metabolitos que pueda tener este líquen⁽²⁴⁻²⁶⁾.

En el Perú, se ha registrado especies de *Thamnolia* en las provincias de Jauja, Huaraz, La Oroya, Tupatupa, entre otras⁽²⁷⁾. Dentro de las regiones donde se ha registrado su presencia se encuentra la provincia de Huánuco, lugar en el que algunos pobladores de la zona emplean este líquen al presenciar un dolor dental durante sus trayectos. Se comenta entre los pobladores que al “chactarlo” o masticarlo en la zona afectada el dolor desaparece por un periodo prolongado. Sin embargo, no se conoce en realidad si este líquen posee efecto analgésico o su eficacia se deba a un efecto placebo por las experiencias en la zona. Además, se desconoce su toxicidad.

El presente estudio se enfoca en cuantificar los componentes fenólicos presentes en el extracto etanólico del líquen *Thamnolia vermicularis* recolectado en la provincia de Huánuco y si este tiene actividad toxica aguda y analgésica en ratas y ratones de experimentación *in vivo*. Adicionalmente, está motivado en brindar a la población conocimiento fundamental sobre el uso adecuado y prevención de riesgos asociados al empleo de recuerdos medicinales naturales presentes en su entorno, además de dar alternativas ante la falta de medicamentos en la zona.

II. HIPÓTESIS

Ho: El líquen *Thamnolia vermicularis* presenta actividad biológica de acción analgésica y no tiene toxicidad aguda

Ha: El líquen *Thamnolia vermicularis* no presenta actividad biológica de acción analgésica y tiene toxicidad aguda

III. OBJETIVOS

a. Objetivo general

- Cuantificar los compuestos fenólicos y evaluar el efecto tóxico agudo y la actividad analgésica del extracto etanólico de *Thamnolia vermicularis* en ratones Balb/c y ratas Holtzman

b. Objetivos específicos

- Realizar la identificación y descripción taxonómica de la muestra primaria de *Thamnolia vermicularis*.
- Cuantificar en el extracto etanólico los compuestos fenólicos presentes en *Thamnolia vermicularis*
- Determinar la capacidad analgésica del extracto etanólico de *Thamnolia vermicularis* en dos modelos experimentales *in vivo*.
- Evaluar el efecto agudo tóxico del extracto etanólico de *Thamnolia vermicularis* por vía oral en animales de experimentación.

IV. MATERIALES

a. Materiales de laboratorio

Reactivos: Para el presente trabajo se utilizó: Etanol al 96% (Merck, Alemania), diclofenaco sódico (Genfar, Colombia), Dimetilsulfóxido (Supelco, Merk), Metanol (Supelco, Sigma Aldrich), Ácido acético (Merck, Sigma Aldrich), Reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma), Carbonato de sodio (Sigma, Kossodo), ácido gálico (Supelco, Sigma Aldrich).

Instrumentos o Equipos de Laboratorio: Jaulas para roedores (Orchid; SRP02, SRC01), botella de agua para roedores (Orchid, SI25C), Cánula de alimentación de roedores (Orchid, 22g), material de vidrio (pipetas (Pirex y Hirsman, Negociar S.A.C), fiola (Witeg, Negociar S.A.C), probetas (Pirex, Negociar S.A.C), vaso de precipitación (ISO LAB, Negociar S.A.C), capsulas de porcelana(ISO LAB, Negociar S.A.C), Balanza analítica (Mettler Toledo, Xs105; 1128022236), Espectrofotómetro (Thermo Scientific, USA), Sistema Hot plate (Agitador magnético con calentamiento digital, IKA, C-MAG H57 5000; 03429226), Rotavapor (BUCHI, Waterbath B-480; 0833466), Balanza (H.W Kassel S.A.C, AND GF-6100; t0365663).

Otros materiales: Caja de Jeringas de 1 ml (Family Doctor), Guantes de látex (Qualatex)

b. Animales de laboratorio

Para la experimentación se hizo uso de 69 animales en total, entre ratas y ratones, los cuales fueron separados según la prueba correspondiente:

Se utilizó 9 ratas macho Holtzman, de ocho semanas, con un peso corporal de 200 a 240 g, para evaluar el efecto toxico agudo oral ⁽²⁸⁾. El número empleado se basó en la bibliografía empleada sobre los protocolos para la evaluación del efecto tóxico agudo con un máximo de nueve animales.

Sesenta (60) ratones macho Balb/C, con una edad de ocho semanas, y con un peso corporal entre 20 – 25 gr se utilizaron para el estudio de la actividad analgésica en dos modelos experimentales: 30 animales por cada modelo. El número de animales de experimentación se calculó con la fórmula ⁽²⁹⁾:

$$n = \frac{N * Z^2 * p(1 - p)}{C^2 * (N) + Z^2 * p(1 - p)}$$

Donde:

- n = Número de animales requerido.
- N= tamaño poblacional.
- Z= parámetro estadístico con nivel de confianza (95%)
- p = probabilidad ocurrencia del evento
- C= error máximo de estimación aceptado

$$n = \frac{60 * (1.96)^2 * 0.5 * (1 - 0.5)}{(0.05)^2 * (60) + 1.96^2 * 0.5 * (1 - 0.5)}$$

$$n = \frac{30 * 3.8416 * 0.25}{0.0025 + 3.8416 * 0.25}$$

$$n = \frac{57.696}{1.9208}$$

$$n = 30$$

El número empleado de ratones para esta prueba es el óptimo para obtener resultados relevantes en un IC del 95% y con un error del 5%.

En este estudio se emplearon ambos modelos animales debido a sus diferencias fisiológicas, inmunológicas y farmacológicas permitiendo una evaluación más integral de los posibles efectos del compuesto en estudio ^(28,30). Además de la elección de especímenes según el protocolo evaluado en la investigación bibliográfica.

Los especímenes para la experimentación fueron adquiridos del animalario del Laboratorio de Investigación y Desarrollo (LID)-UPCH. Los animales tuvieron

un periodo de aclimatación de tres días y luego pasaron a un ambiente de luz: oscuridad (12h:12h), con una temperatura entre 20°- 25 °C, humedad relativa (HR) menor de 70% y se alojaron en grupos de seis (06) por jaula, teniendo agua y alimento balanceado *ad libitum*. Además, se realizó un chequeo de los animales previo a la experimentación para certificar su estado clínico saludable, sin signos de enfermedad ni alteraciones conductuales, lo cual permitió minimizar variables biológicas no controladas y asegurar que los efectos observados puedan atribuirse con mayor seguridad a la administración del extracto.

La alimentación, cuidado y manipulación de los animales de laboratorio estuvo a cargo del personal capacitado del laboratorio de Servicio de Control de Calidad-LID. El cuidado se realizó en los ambientes de las Áreas de modelos Biológicos y Toxicológico ubicados en el sótano de LID.

Fue imprescindible garantizar un manejo óptimo de las condiciones ambientales y aplicar técnicas apropiadas del cuidado del animal para obtener resultados relevantes. Es importante indicar que para los ensayos realizados se tuvo en cuenta lo indicado en la guía de las 3Rs⁽³¹⁾, por lo cual se empleó para esta investigación la reducción de los animales para la prueba de toxicidad según las guías internacionales de la OECD⁽²⁸⁾ (acute Oral Toxicity –Acute Toxic Class Method) así mismo el refinamiento en las pruebas por lo que se utilizó para la eutanasia una sobredosis de anestésico.

V. MÉTODOS

a. Recolección del líquen

La muestra del líquen completo fue colectada en el departamento de Huánuco, provincia Huamalíes, en la zona de Puños a 3839 msnm, en los meses de febrero y abril (**Imagen 1 y 2**). Esta región altoandina se caracteriza por un ecosistema de pastizales abiertos, bajas temperaturas y una marcada estacionalidad climática. El periodo de recolección coincidió con la época de lluvias en los Andes centrales, lo cual favoreció la disponibilidad del líquen

estudiado, debido a un incremento de su actividad metabólica y desarrollo, facilitando su recolección en óptimas condiciones^(32,33).

Por razones de índole personal, la recolección de las muestras fue delegada a pobladores locales previamente instruidos. Para este propósito, se contrató un servicio de transporte privado que facilitó el traslado de los colaboradores hasta el distrito de Puños, siguiendo la vía terrestre en dirección noreste. Una vez en el lugar, los recolectores se dirigieron a las zonas de crecimiento natural del líquen de interés, donde realizaron la recolección conforme a los lineamientos metodológicos establecidos previamente.

Durante la recolección, el material liquénico fue pesado in situ y posteriormente dispuesto para el secado inicial al aire libre, empleando papel Kraft como soporte, durante un periodo de 24 horas en la misma zona de colecta. Finalizado el proceso, las muestras fueron empacadas en papel Kraft y acondicionadas en bolsas plásticas para su transporte. El traslado se realizó de forma independiente y controlada. Una vez en Lima, el material fue sometido a un proceso de secado final en un ambiente controlado con temperatura de 25°C y humedad relativa (HR) del 60%, durante el periodo de una semana. El procedimiento de secado aplicado se basó en las buenas prácticas enseñadas durante la formación académica siguiendo los criterios aceptados para el manejo de muestras liquénicas.

b. Descripción y taxonomía del líquen

La identificación del líquen recolectado se realizó mediante el análisis morfológico y anatómico de las estructuras observadas en el espécimen, empleando claves taxonómicas especializadas. Se examinaron características macroscópicas como el color, forma y presencia de estructuras reproductivas, mediante lupa estereoscópica.

Adicionalmente se llevó a cabo la prueba química de coloración por reacción de hidróxido de potasio (KOH) aplicado directamente sobre el talo, con el objetivo de detectar la presencia de metabolitos secundarios característicos del género *Thamnolia*.

La identificación taxonómica del material liquénico fue realizada en compañía de la Dra. Rebeca Magdalena Pavlich, bióloga, micóloga y liquenóloga con

una amplia experiencia en el estudio de líquenes del Perú. Ha liderado investigaciones científicas sobre liquenobiota andina y ha sido presidenta de la Asociación Latinoamericana de Micología, lo que avala plenamente su idoneidad para la determinación taxonómica efectuada.

c. Preparación del extracto del liquen

La muestra de liquen luego de ser secado fue molida obteniéndose un total de 400 gr de liquen molido. La extracción se realizó mediante maceración etanólica durante un periodo de 7 días a temperatura ambiente, se filtró y se repitió esta extracción por otros 7 días^(34,35). Extrayéndose un total de 3 litros de extracto etanólico, el cual se concentró al vacío con el rotavapor hasta 100 ml. El extracto se dejó reposando en capsulas de porcelana a 35°C en baño maría en una atmosfera de nitrógeno durante un día hasta la evaporación de todo el solvente. Una vez concluido la evaporación total de todo el solvente, se obtuvo un total de 14,02 gr de extracto seco.

Para la administración del extracto, se pesó previamente según la dosis correspondiente al peso promedio de los animales. Posteriormente, el extracto fue disuelto inicialmente en dimetilsulfóxido (DMSO), en una cantidad mínima suficiente para facilitar su solubilidad, una vez disuelto, la mezcla fue completada con agua destilada⁽³⁶⁾.

d. Determinación de compuestos totales fenólicos

La determinación del contenido total de compuestos fenólicos se determinó utilizando el método de Folin-Ciocalteu siguiendo protocolos estandarizados. Para la preparación de la muestra se procedió a disolver en un vaso precipitado 10 mg de extracto seco etanólico de *Thamnia vermicularis* en 10 ml de metanol (60%) hasta disolverse por completo. En un tubo de ensayo se adicionó 100 uL del extracto disuelto con 500 ul del reactivo de Folin- Ciocalteu. La mezcla se dejó reposar por ocho (8) minutos a temperatura ambiente para permitir la reacción inicial.

Transcurrido el tiempo se agregó 400 uL de carbonato de sodio al 7,5 % favoreciendo la neutralización del medio y la formación del complejo

colorimétrico. Se incubo durante de 30 minutos en condiciones controladas para luego medir la absorbancia a 765 nm. Esta longitud de onda corresponde a la máxima absorción del complejo formado, siendo directamente proporcional a la concentración de compuestos fenólicos presentes en el extracto. Para la comparación se empleó como blanco una solución preparada bajo las mismas condiciones sin extracto.

La cantidad presente de compuestos fenólicos totales se determinó como mM de ácido gálico (AG) equivalente, utilizando para ello la curva de calibración de ácido gálico expresándose los resultados como mili moles equivalentes de ácido gálico (mM AG) por gramo de extracto seco^(37,38).

e. Actividad Analgésica: Ensayo de contorsiones inducidas mediante ácido acético

La actividad analgésica fue realizada a través de la inducción de contorsiones por inyección de ácido acético siguiendo el modelo experimental de Rafieian-kopaei M. et al (2017) y de Yimer T, Birru EM (2020). Esta prueba se basa en determinar la actividad analgésica a nivel peritoneal en base a la reducción del número de contorsiones producidas por la administración intraperitoneal de ácido acético al 3%.

Para el experimento se emplearon 30 ratones macho divididos aleatoriamente en cinco grupos de seis animales cada uno: un grupo control negativo CN (agua), un grupo control positivo CP (diclofenaco sódico 10 mg) y 3 grupos tratados con dosis crecientes del extracto etanólico seco de *Thamnia vermicularis* (250mg/kg, 500mg/kg, 1000 mg/kg).

Para la preparación de las soluciones, se pesó la cantidad correspondiente de extracto seco en función al peso promedio de los animales por grupo, y este fue disuelto inicialmente en dimetilsulfóxido (DMSO) para aumentar su solubilidad y facilitar su homogenización⁽³⁶⁾. Luego, la mezcla fue completada con agua destilada hasta alcanzar el volumen necesario para la administración oral, asegurando una distribución adecuada de la dosis. Finalmente, se empleó una solución de ácido acético al 3% de concentración y la inyección fue de 0.1ml en cada animal para la inducción de contorsiones^(37,39).

Para el conteo del número de contorsiones se colocó al animal dentro de una pecera transparente y se le evaluó durante 30 minutos. Se tomó en cuenta como 1 contorsión cuando el animal se estiraba completamente. La actividad analgésica fue medida de la siguiente manera:

$$\%Act. Analgésica = \frac{\text{Promedio de contorsiones (control-tratamiento)}}{\text{Promedio de contorsiones (control)}} * 100$$

f. Actividad Analgésica: Método de placa caliente

Para medir la capacidad analgésica se empleó protocolos previamente evaluados en otros estudios y siguiendo las pautas descritas por Rafieian-kopaei M. *et al* (2017), Yimer T, Birru EM *et al* (2020) y Singh A *et al* (2016). Esta prueba se realizó mediante la prueba Hot plate o prueba de placa caliente, donde se hizo uso de un agitador magnético con calentamiento digital. Se utilizó 30 ratones macho, divididos aleatoriamente en cinco grupos de seis animales cada uno: un grupo control negativo CN (agua), un grupo control positivo CP (diclofenaco sódico 10 mg) y 3 grupos con dosis diferentes del extracto etanólico (250mg/kg, 500mg/kg, 1000mg/kg).

Para la preparación de las soluciones, se pesó la cantidad correspondiente de extracto seco en función al peso promedio de los animales por grupo, y este fue disuelto inicialmente en dimetilsulfóxido (DMSO) para aumentar su solubilidad y facilitar su homogenización⁽³⁶⁾.

Cada animal fue colocado de manera individual sobre la placa del agitador magnético previamente calentado y a una temperatura constante de 52° C. Se esperó que el animal se lamiera o sacudiera las patas o saltara en respuesta al estímulo.

Se registró el tiempo de latencia hasta la primera respuesta a los 0, 30, 60 y 90 minutos en cada grupo luego de la aplicación del extracto o fármaco comercial. Para esta prueba se consideró un tiempo de corte de 15 segundos para evitar lesiones en el animal luego de una exposición constante^(37,39,40). Finalmente, se determinó el porcentaje de duración a través de la siguiente fórmula:

$$\%duración = \frac{(Latencia (prueba) - Latencia (control))}{(Latencia (prueba))} * 100$$

g. Estudio de Toxicidad aguda en ratas

La toxicidad aguda fue evaluada por vía oral y se realizó siguiendo el proceso estandarizado por la Guideline for testing of Chemicals de la OECD Test 423⁽²⁸⁾. La prueba incluyó un tratamiento de tres animales sanos con dosis límite de 2000 mg de extracto etanólico/Kg a un grupo de tres ratas macho, seguida de una segunda repetición con tres animales adicionales según el diagrama establecido por la guía (**figura 1**)^(41,42). El volumen de muestra administrado por vía oral en un volumen constante fue de 2 ml por individuo. Cada animal fue evaluado cuidadosamente durante las dos primeras horas de dosificación y evaluado posteriormente de manera diaria durante catorce días, registrando cualquier signo clínico adverso asociado a la administración del extracto. Los signos clínicos evaluados fueron:

- 1.- Comportamiento: Se observó la presencia o ausencia de agresión, episodios convulsivos, desplazamiento circular y de estado de letargia.
- 2.- Sistema Respiratorio: Se evaluó la presencia o ausencia de disnea o jadeo.
- 3.- Sistema Digestivo: Se evaluó la presencia o ausencia de estreñimiento y de heces líquidas (diarrea).
- 4.- Sistema Cardiovascular: Se evaluó la presencia o ausencia de cianosis y sangrado por aberturas naturales.
- 5.- Sistema Urogenital: Se evaluó presencia o ausencia de orina turbia.
- 6.- Piel y ojo: Se evaluó la presencia o ausencia de mucosas ictéricas, respuesta pilo motora y reacción pupilar lumínica, evidenciando midriasis o miosis.
- 7.- Estructura muscular: Se evaluó la presencia o ausencia de claudicación, falta de movilidad y temblor.
- 8.- Compromiso Sistémico: Se evaluó la presencia o ausencia de estado comatoso, deshidratación, ingesta de alimento, postración, rigidez abdominal y cambio de la temperatura corporal (hipertermia o hipotermia).

Ante a la ausencia de mortalidad de la dosis inicial, se procedió a evaluar una dosis de 5000 mg de extracto etanólico/Kg de rata en otro grupo de tres animales siguiendo el mismo protocolo de observación.

h. Análisis estadístico

Los datos obtenidos se expresaron como media \pm desviación estándar, empleando las unidades correspondientes a cada variable según el tipo de prueba. La elaboración de tablas se realizó en Microsoft Excel, mientras que el análisis estadístico y la construcción de las gráficas fueron llevados a cabo mediante el software GraphPad Prism versión 8.0.

Para la determinación de las diferencias significativas entre grupos experimentales, se aplicó en análisis de varianza (ANOVA) de una vía. Posteriormente, se utilizaron las pruebas post hoc de Tukey para las comparaciones múltiples y Dunnet para las comparaciones específicas respecto al grupo control. Todos los análisis estadísticos fueron realizados en GraphPad Prism v8.0, considerando estadísticamente significativos aquellos resultados con un valor de $p < 0.05$.

VI. RESULTADOS

a. Identificación y descripción taxonómica del líquen.

Observación macroscópica:

- Tipo de talo: fruticuloso, cilíndrico con ramificaciones
- Coloración:
 - Hidratado: blanco cremoso
 - Seco: blanco grisáceo
- Terminación: ápices redondeados
- Superficie: lisa
- Hábitat: descampado en zona altoandina con climatización fría/helada

Prueba química:

- Hidróxido de potasio: positivo (K+) con coloración amarilla.

Con relación a las características descritas, la clasificación de la muestra recolectada fue:

Clasificación taxonómica

- **Reino:** Fungi
- **División:** Ascomycota
- **Clase:** Lecanoromycetes
- **Orden:** Peltigerales
- **Familia:** Icmadophilaceae
- **Género:** *Thamnolia*
- **Especie:** *Thamnolia vermicularis*

b. Cuantificación de compuestos fenólicos

Para la determinación de la concentración de compuestos fenólicos totales se realizó una curva de calibración de estándar con ácido gálico (GA) considerando la relación entre la concentración y la absorbancia. La curva de calibración generada a partir del análisis fue lineal (**Grafica 1**) con una ecuación $y = 0,2429X + 0,0068$ y un coeficiente de determinación de $R^2 = 0,9835$. Este coeficiente indicaría un ajuste excelente del modelo lineal en relación con los datos experimentales. Como resultado, el análisis de absorbancia a 765 nm evidenció la presencia del contenido fenólico en el extracto etanólico del líquen. El contenido total de fenoles del extracto etanólico de *Thamnolia vermicularis* mostró una concentración de $181,56 \pm 0,04$ mg de AG/g de extracto por masa seca.

Se evaluó el coeficiente de variación global de la curva considerando todas las absorbancias individuales de la curva de calibración (n=12). El valor obtenido fue de 12,4%, lo cual indica una precisión general moderada dentro de los rangos aceptables.

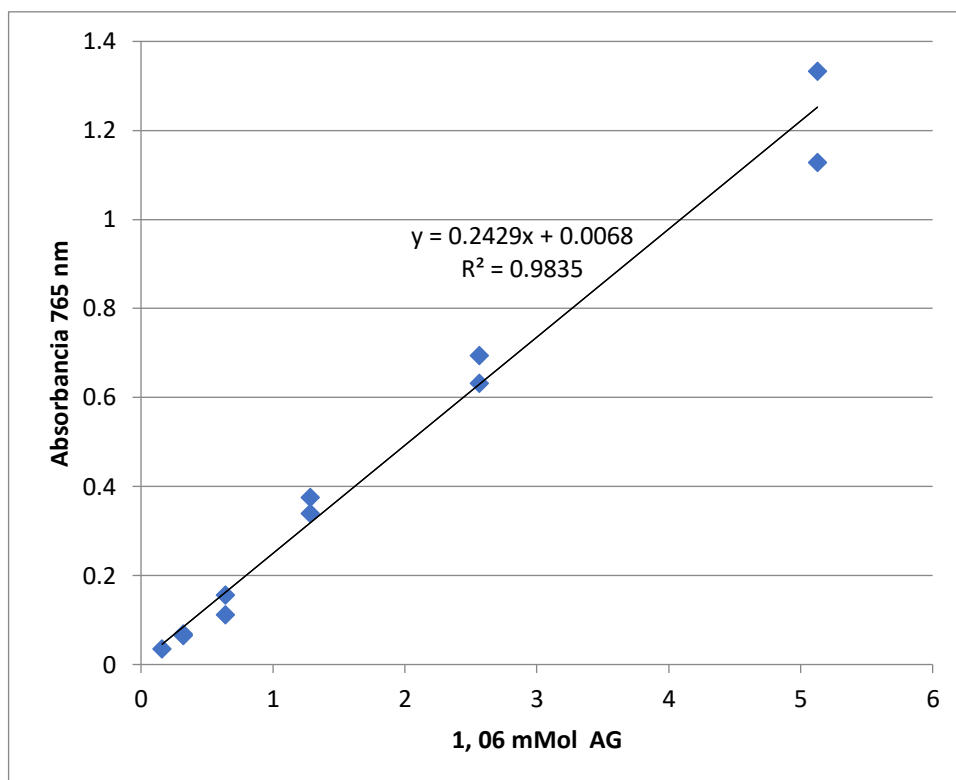


Gráfico (1). Concentración de ácido gálico (AG) en mMol Vs Absorbancia a 765nm

c. Actividad analgésica: Evaluación de contorsiones inducidas por ácido acético

Se preparó el extracto en base al peso promedio de los 6 animales, el cual fue de 31,74 mg para el grupo de 250 mg; 33,44 mg para el grupo 500 mg y 31,422 mg para el grupo de 1000 mg. Se empleó 392,539 mg de extracto de liquen en total, dividiendo la cantidad necesaria para cada grupo en base al peso promedio y la preparación de 7 ml por grupo. Se adiciono 1,5 ml de DMSO y 5.5 ml de agua para la preparación de la solución a emplear.

En base a los resultados obtenidos, los resultados muestran una reducción del número de contorsiones en comparación del promedio del control negativo (24,67) con las dosis administradas de 250mg/kg (9,83), 500 mg/kg (6,0) y 1000 mg/kg (4,5) (**Grafica 2**). Así como, en la comparación del control positivo (CP).

El análisis determinó un aumento del porcentaje de actividad en relación con la dosis empleada (250 mg/kg= 60,14%, 500 mg/kg =75,68%, 1000mg/kg = 81,76%), los resultados son representados en la **tabla 1 y grafica 2**.

Muestra	Numero de contorsiones	ACTIVIDAD %
	Promedio	
CN	24,67 ± 3.14	0,00
CP	10,50 ± 6.12*	57,43
Ext. 250	9,83 ± 4.26*	60,14
Ext. 500	6,00 ± 3.52*	75,68
Ext. 1000	4,50 ± 3.39*	81,76

N= 6 ratones por grupo; (*) p < 0.05 con referencia al grupo CN

(**) p < 0.05 con referencia al CP

Tabla (1). Análisis del número de contorsiones y el porcentaje de actividad analgésica (CN=Control negativo, CP= Control positivo, EXT = Extracto en mg/ kg)

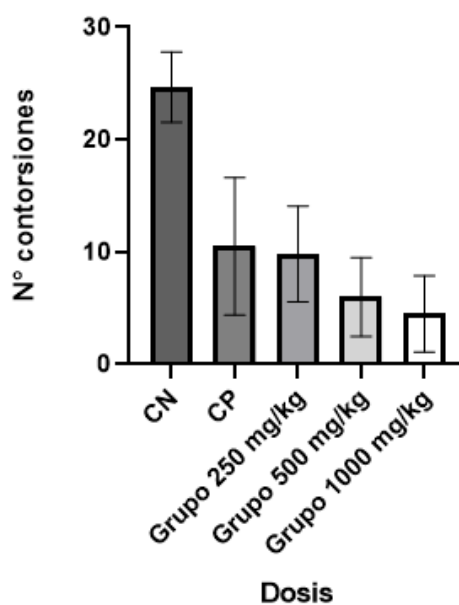


Gráfico (2). Análisis del número de contorsiones según el tratamiento aplicado.

d. *Actividad analgésica: Prueba Hot plate o plancha caliente*

Se preparó el extracto en base al peso promedio de los 6 animales, el cual fue de 25,08 mg para el grupo de 250 mg; 27,41 mg para el grupo 500mg y 26,178 mg para el grupo de 1000 mg. Se empleó 323,071 mg de extracto de liquen en total, dividiendo la cantidad necesaria para cada grupo en base al peso promedio y la preparación de 7 ml por grupo. Se adiciono 1,5 ml de DMSO y 5,5 ml de agua para la preparación de la solución a emplear.

En base a los resultados obtenidos como se muestra en la **tabla 2** y **grafico 3**, se determinó a los 60 minutos un porcentaje de duración de 66,24% y 88,98% a los 60 min para la dosis de 250mg/kg y 500 mg/kg respectivamente. La dosis de 1000 mg/kg mostro un porcentaje de duración de 82,38 % a los 30 min y fue aumentando hasta 102,20 % a los 60 min (**grafico 4**). Sin embargo, se observa una reducción a los 90 min. El análisis de los resultados no demuestra una estadística significativa en la comparación múltiple del control positivo y los grupos establecidos.

	Basal	30 min	60 min	90 min
CN	3,93 ± 0,4	4,43 ± 0,4	3,49 ± 0,4	3,68 ± 0,4
CP	3,9 ± 1,93	5,19 ± 1,93	8,19 ± 1,93	7,15 ± 1,93
EXT 250	4,18 ± 1,36	6,33 ± 1,36	6,95 ± 1,36	7,15 ± 1,36
EXT 500	4,16 ± 1,65	5,12 ± 1,65	7,86 ± 1,65	6,72 ± 1,65
EXT 1000	4,25 ± 1,89	7,75 ± 1,89	8,59 ± 1,89	7,19 ± 1,89

N= 6 ratones ANOVA p<0,05(*) Con relación al CP

CN=Control negativo, CP= Control positivo, EXT = Extracto en mg

Tabla (2). Periodo de Latencia en segundos, con relación al tiempo de experimentación, de los individuos empleados.

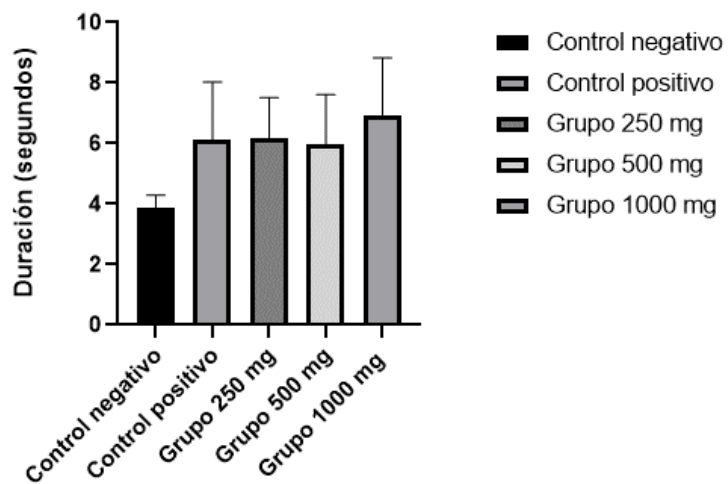


Gráfico (3). Comparación del promedio del tiempo de duración de los individuos con relación a 15 segs. establecidos. (N= 30 ratones)

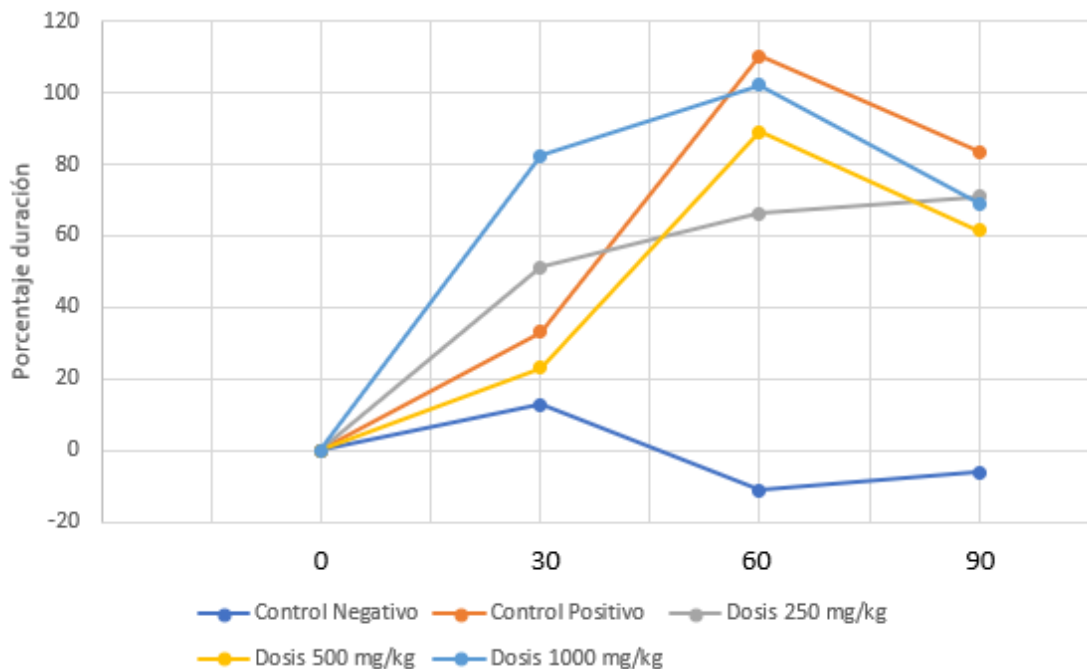


Gráfico (4). Comparación del aumento del porcentaje del tiempo de duración de los individuos con relación al tiempo establecido.

e. *Evaluación toxica aguda en ratas*

Durante la evaluación, no se observó mortalidad ni signos clínicos severos de toxicidad en ninguno de los grupos experimentales, tanto para la dosis inicial de 2000 mg/kg como la segunda dosis límite de 5000 mg/kg. Durante las primeras dos horas de administración, se observó un estado de alerta notable debido posiblemente a la manipulación; posteriormente, este síntoma se fue reduciendo. Se detectó una ligera disminución de la actividad además del aumento en la producción de orina. No se evidencio ningún otro signo ni síntoma compatible con toxicidad sistémica. Adicionalmente, no se presentaron problemas en la piel ni variaciones relevantes en el peso corporal, ni disminución del consumo de alimento o agua.

A una dosis de 5000 mg /kg, los animales permanecieron en estado de alerta durante las 2 primeras horas de evaluación, este efecto disminuyo con el pasar del tiempo. Se observó un aumento del volumen urinario y materia fecal flácidas. No se observó compromiso sistémico. No hubo reducción de peso ni de apetito. Adicionalmente, no se presentaron problemas en la piel ni otro compromiso con la salud del animal **tabla 3**.

VII. DISCUSIÓN

La muestra recolectada fue identificada como *Thamnolia vermicularis*, presentando un talo cilíndrico con ramificaciones y ápices redondeados, superficie lisa y una coloración blanco cremoso al estar hidratado a blanco grisáceo al secarse. Estas características concuerdan con las descripciones morfológicas reportadas para esta especie en ecosistemas fríos de alta montaña^(43,44). Esta coloración, junto con su presencia en hábitat altoandino de vegetación abierta es compatible con la distribución ecológica reportada, ya que dicha especie se encuentra típicamente en ecosistemas de tundra, páramo y alta montaña ^(44,45). Además, su reacción positiva de coloración amarilla también sustenta su identificación, ya que esta reacción es característica de los compuestos fenólicos presentes en el córtex de *Thamnolia vermicularis*⁽⁴⁶⁾.

En el caso de los líquenes los solventes más empleados son el metanol, acetona, diclorometano, etanol y benceno⁽⁴⁷⁻⁵⁰⁾. En algunos estudios realizados a plantas se ha comparado la eficiencia de extracción de compuestos fenólicos utilizando distintos solventes: agua, metanol acetona y etanol, siendo el mejor rendimiento obtenido con agua a 90°C durante 5 horas de extracción (12,587 mg AG/g) y acetona 75% a 30°C (7,268 mg AG/g) en el mismo tiempo ⁽⁴⁹⁾. También se ha reportado la efectividad de extracción con relación al contenido fenólico al combinar solventes, por ejemplo, empleando una mezcla de etanol: agua (75:25) a 50°C donde se obtuvo un contenido fenólico comparable a la extracción con metanol absoluto (40,84 vs 40,14 mg AG/g) ⁽⁵⁰⁾. En referencia a los componentes presentes en líquenes, algunos estudios destacan al diclorometano como un solvente eficaz para la recuperación de compuestos fenólicos en comparación otros solventes ^(51,52). Aunque en el caso de *Thamnolia*, se ha demostrado que la maceración etanólica puede ofrecer un rendimiento similar ⁽⁵¹⁾. La cuantificación realizada mediante el método de Folin-Ciocalteu a una longitud de onda de 765 nm, permitió estimar una concentración de 181,56 mg AG/g de muestra seca. Este valor representa una extracción considerable, alcanzada mediante la maceración etanólica a temperatura ambiente durante 14 días. En comparación con otros estudios, se ha reportado concentraciones menores en otros líquenes como *Peltigera lacinata* (12,86 ug AG/mg) e incluso *Thamnolia vermicularis* (12,48 ug AG/mg), a pesar de que fueron extraídos en un periodo equivalente o menor ^(50,51). Esta concentración pudo estar influenciada por factores ambientales como la altitud, el clima, el tipo de sustrato o la exposición a contaminantes ambientales, ya que se ha demostrado que las sustancias bioactivas de los líquenes son afectadas significativamente por las condiciones del entorno condicionando los resultados de la cuantificación química, así como, de la actividad biológica evaluada^(9,47).

En relación con la precisión del método, un coeficiente de variación de 12,4% refleja una variabilidad moderada entre las réplicas, que, si bien no representa un resultado óptimo, se considera aceptable dentro de los criterios establecidos por normativas analíticas⁽⁵³⁾, especialmente en las etapas preliminares de validación. Esta variación podría atribuirse a factores como

pequeñas inconsistencias en la preparación de los estándares, ligeras diferencias en el tiempo de reacción o el manejo del instrumental⁽⁵⁴⁾. No obstante, al resultar por debajo del umbral del 15%, demuestra ser adecuadamente preciso para fines de cuantificación de polifenoles^(53,54).

Por otro lado, la curva presentó un coeficiente de determinación de 0,9835, lo que sugiere que el 98,35% de la variación en la absorbancia se explica por la concentración de los estándares respaldando la linealidad y confiabilidad del método espectrofotométrico aplicado. Dicha linealidad es fundamental para asegurar una cuantificación exacta, reforzando la idoneidad del método desarrollado para el análisis de compuestos fenólicos⁽⁵⁵⁾.

Se conoce que parte de la actividad farmacológica de las sustancias líquénicas se basa en la presencia de metabolitos secundarios como depsidonas, depsidos, antraquinonas y terpenoides⁽⁵⁶⁾. Diversos estudios han demostrado la actividad analgésica de líquenes del género *Usnea*, *Cladia*, *Cladonia*, entre otros; debido a la presencia del ácido úsnico y sus derivados, los cuales pertenecen al grupo de los dibenzofuranos^(47,57). En el caso de la presente muestra, se identifica mediante la literatura la presencia del ácido thamnólico, compuesto clasificado como un depsido⁽⁴⁷⁾. Aunque tanto el ácido Úsnico como el ácido thamnólico son metabolitos propios de líquenes, estos se diferencian estructuralmente. No obstante, ambos compuestos comparten propiedades bioactivas similares, como la actividad antimicrobiana y antiinflamatoria, lo que sugiere, aunque difieran en estructuras, pueden estar involucrados en mecanismos farmacológicos similares, particularmente en efectos analgésicos^(57,58).

Con relación a los resultados obtenidos, se observa una disminución en el número de contorsiones a medida que aumenta la dosis administrada (**Grafica 2**). El análisis estadístico evidenció una diferencia significativa respecto al grupo control negativo, lo que indica un efecto analgésico atribuible al extracto. Sin embargo, pese a esta tendencia, no se observó diferencias significativas en comparación con el grupo control positivo (**Tabla 2**), indicando que, aunque el extracto mostró un efecto potencial, este no alcanzó la eficacia del tratamiento farmacológico estándar bajo las condiciones

evaluadas. Cabe señalar que el grupo tratado con 1000 mg/kg presentó una ligera inclinación hacia la significancia ($p < 0.06$) lo que sugiere una posible respuesta dosis- dependiente que podría evaluarse en estudios posteriores.

Resultados similares se obtuvieron para la prueba de la placa caliente donde se registró un aumento progresivo en tiempo de latencia en relación con la dosis administrada, alcanzando un mayor efecto en la dosis de 1000 mg/kg. El análisis estadístico evidenció una diferencia significativa únicamente para este grupo en comparación con el control negativo, lo que sugiere una actividad a dicha dosis. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas frente al control positivo, por lo que el efecto del extracto no alcanzó el nivel del tratamiento estándar.

Es importante considerar que el dolor es un proceso complejo que involucra distintos mecanismos fisiológicos, dependiendo del origen (inflamatorio, neuropático, nociceptivo), intensidad y vías de conducción nerviosa⁽⁵⁹⁾. Dentro del estudio, se emplearon dos modelos experimentales que permitieron distinguir entre el dolor de origen periférico y el dolor de origen central. La prueba de contorsiones refleja una respuesta a estímulos dolorosos de tipo químico e inflamatorio en la cavidad peritoneal, caracterizada por la activación de fibras aferentes tipo C sensibles a mediadores como prostaglandinas e histamina^(60,61). La reducción de las contorsiones que se observa tras la administración del extracto etanólico de *Thamnia vermicularis* sugiere una posible acción a nivel periférico dosis dependiente, la cual podría estar mediada por la modulación de mediadores inflamatorios o interferencia con la señalización nociceptiva en las terminaciones nerviosas.⁽⁶²⁾ En contraste, la prueba de placa caliente involucra una respuesta frente a un estímulo térmico nocivo, en la que participan receptores térmicos y vías de dolor central (a nivel medular y supra medular)^(59,61). Los resultados de esta prueba indicarían una menor participación en la inhibición de la transmisión central del dolor⁽⁶³⁻⁶⁵⁾.

Adicionalmente, los resultados pueden haber estado influenciados por variaciones individuales en la percepción del estímulo, posiblemente moduladas por el estrés inducido por la manipulación experimental⁽⁶⁶⁾.

Asimismo, es probable que se haya producido una respuesta adaptativa del comportamiento frente al dolor térmico generado, lo que podría haber afectado los resultados.

Se ha demostrado que los líquenes poseen actividades biológicas resaltantes como antibacterial, antifúngica, antioxidantes, entre otras⁽⁶⁷⁾. Sería adecuado evaluar el potencial del efecto antiinflamatorio del líquen *Thamnolia vermicularis* con relación a la presencia del ácido thamnólico y sus derivados. Este compuesto ha sido tradicionalmente empleado en la medicina china para tratar afecciones inflamatorias,⁽⁶⁸⁾ a pesar de que existen antecedentes que respaldan su uso, los estudios experimentales sobre sus mecanismos de acción y eficacia son aún limitados lo que resalta la necesidad de explorar su bioactividad a nivel molecular y celular con relación a los modelos de inflamación inducida⁽⁶⁹⁾.

La toxicidad en los líquenes ha sido evaluada tanto en líneas celulares como en organismos de menor tamaño como pequeños crustáceos y roedores. Dichos estudios están relacionados a la citotoxicidad y toxicidad aguda del ácido Úsnico en *Usnea sp* y otros compuestos de *Ramalina sp*. Se ha demostrado que en dichos organismos existe una toxicidad y mortalidad desde pequeñas dosis hasta la dosis de 1,00 g/kg, teniendo mortalidad 100% en roedores pequeños para esta última, sin embargo, en algunos casos lograban sobrevivir a dosis de 2,00 g/kg⁽⁷⁰⁻⁷⁴⁾. En el estudio, no se detectó efectos tóxicos agudos letales en la evaluación del extracto de *Thamnolia vermicularis*, lo que sugiere una baja toxicidad ubicándolo en la categoría 5 o sin clasificación toxicológica según la OECD 423⁽²⁸⁾. No obstante, se puede observar un posible efecto diurético evidenciado por el incremento en el volumen de orina, aunque este hallazgo debe ser confirmado mediante estudios. Así mismo, se registró la expulsión de materia fecal flácida, lo cual podría atribuirse como efecto del extracto administrado⁽⁷⁵⁾.

Este estudio adquiere relevancia frente a la limitada disponibilidad de medicación en determinadas zonas del país, donde el acceso a tratamientos convencionales es restringido. En este contexto, resulta fundamental continuar con investigaciones que evalúen no solo la eficacia de extractos

naturales como alternativas terapéuticas, sino también su posible interacción con medicamentos convencionales y los efectos adversos potenciales que puedan derivarse de su uso, independiente del origen ⁽⁷⁶⁾.

VIII. CONCLUSIONES

- El líquen recolectado en la zona de Huamalíes se identificó como *Thamnotia vermicularis*.
- Se cuantificó la cantidad de compuestos fenólicos del extracto etanólico teniendo como resultado 181,56 mg de AG/g de extracto seco.
- El extracto etanólico del líquen del género *Thamnotia vermicularis* podría presentar efecto analgésico dosis-dependiente a nivel periférico.
- El extracto etanólico evaluado a dosis de 5000 mg/kg, no presenta toxicidad aguda siendo la DL50 > 5000 mg/kg.

RECOMENDACIONES:

Se recomienda realizar análisis cromatográfico cualitativo del extracto etanólico del líquen recolectado en la zona de Huánuco mediante HPLC/MS.

Se recomienda realizar estudios de toxicidad subaguda, subcrónica o crónica, para evaluar la seguridad del uso frecuente (30 a 90 días) de este líquen.

Se recomienda realizar más estudios para la confirmación o descarte del efecto diurético.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rojas Ochoa F, Silva Aycaguer LC, Sansó Soberats F, Alonso Galbán P. El debate sobre la Medicina Natural y Tradicional y sus implicaciones para la salud pública. 2012 Jun 29;107–23.
2. Pascual Casamayor Dianelis, Pérez Campos YE, Morales Guerrero I, Castellanos Coloma I, González Heredia E. HISTORIA DE LA MEDICINA Algunas consideraciones sobre el surgimiento y la evolución de la medicina natural y tradicional. Vol. 18, MEDISAN. Santiago de Cuba; 2013 May.
3. Maldonado C, Paniagua Zambrana N, Bussmann R, Zenteno-Ruiz F, Fuentes A. La importancia de las plantas medicinales, su taxonomía y la búsqueda de la cura a la enfermedad que causa el coronavirus (COVID-19). *Ecología en Bolivia*. 2020 Apr;1–5.
4. Berreno E, Perez-Ortega S. Líquenes de la reserva natural integral de Muniellos, Asturias. 2003;65–82. Available from: http://www.uv.es/barreno/Biologia_de_los_liquenes.pdf
5. Martín Gordo DA. Los Compuestos Fenólicos, Un Acercamiento A Su Biosíntesis, Síntesis Y Actividad Biológica. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*. 2018 Feb 26;9(1):81–104.
6. Romero Principe WY. Determinación del contenidos de polifenoles y capacidad antioxidante de un extracto de Cushuro (Cyanophyceae) *Nostoc* sp. [Lima]: Universidad Agraria La Molina; 2024.
7. Valencia-Avilés E, Ignacio-Figueroa I, Sosa-Martínez E, Carmen Bartolomé-Camacho M, Martínez-Flores HE, García-Pérez ME. Polifenoles: propiedades antioxidantes y toxicológicas. *Revista de la Facultad de Ciencias Químicas*. 2017 Jan; 16:1–15.
8. Frías Zepeda ME, Rosales Castro M. FARMACOGNOSIA PRINCIPIOS BÁSICOS. 1st ed. Rosales Castro M, Frías Zepeda ME, Universidad Juárez del

Estado de Durango, editors. Vol. 1. Durango: UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE DURANGO; 2023. 95–223 p.

9. Salgado Valdés FJ. Dépsidos y depsidonas de líquenes antárticos: Estudio antioxidante y evaluación como posibles inhibidores de la agregación de la proteína Tau [Tesis]. [Chile]: Universidad de Chile; 2016.
10. Sepahvand A, Studzińska-Sroka E, Ramak P, Karimian V. Usnea sp.: Antimicrobial potential, bioactive compounds, ethnopharmacological uses and other pharmacological properties; a review article. *J Ethnopharmacol.* 2021 Mar 25;268(Ethnopharmacology).
11. Chérrez-Ojeda I, Calderón JC, Calero E, Terán C, Cherrez A. ¿Son seguros los productos naturales analgésicos en los pacientes con alergia a los antiinflamatorios no esteroideos? *Rev Alerg Mex.* 2018 Apr 10;65(1):99–102.
12. Navarro Hernandez JA, Ramirez Ojeda RA, Villagrán Vélez C. MANUAL DE PROCEDIMIENTOS RECOMENDABLES PARA LA INVESTIGACIÓN CON ANIMALES. 1st ed. México: Samsara Editorial; 2012. 61–70 p.
13. Carolina Mourelle A, Herrero E, Ricca M. Recomendaciones para manipulación y sujeción de ratas y ratones de laboratorio. Vol. 956, Ana Carolina Mourelle, idehucnicet. Santiago, Chile; 2013 Nov.
14. William Mejía-Dolores J, Mendoza-Quispe DE, Luis Moreno-Rumay E, Gonzales-Medina A, Remuzgo-Artezano F, Morales-Ipanaqué LA, et al. EFECTO NEUROTÓXICO DEL EXTRACTO ACUOSO DE BOLDO (*Peumus boldus*) EN UN MODELO ANIMAL. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2014 Oct 16;1–7.
15. Rodríguez-Silva C, Arteaga Temoche LA. Efecto del *Lepidium mayenii* Walp “maca” sobre la nefrotoxicidad inducida por la ifosfamida en *Rattus rattus* var. Holtzman. Vol. 12, *Rev méd Trujillo.* Trujillo; 2017.
16. Clarke A, Parkville V, Cooper AM, Goebel W, Koprowski H, Melchers B, et al. Current Topics in Microbiology 122 and Immunology - The BALB/c Mouse. In: Potter M, editor. 1985. p. 1–27.

17. Van Der Goot MH, Kooij M, Stolte S, Baars A, Arndt SS, van Lith HA. Incorporating inter-individual variability in experimental design improves the quality of results of animal experiments. *PLoS One*. 2021 Aug 1;16(8 August).
18. Rafieian-kopaei M, Shakiba A, Sedighi M, Bahmani M. The Analgesic and Anti-Inflammatory Activity of *Linum usitatissimum* in Balb/c Mice. *J Evid Based Complementary Altern Med*. 2017;22(4):892–6.
19. Bawazeer S, Rauf A. In Vivo Anti-inflammatory, Analgesic, and Sedative Studies of the Extract and Naphthoquinone Isolated from *Diospyros kaki* (Persimmon). *ACS Omega*. 2021;6(14):9852–6.
20. Onuț-Brännström I, Tibell L, Johannesson H. A worldwide phylogeography of the whiteworm lichens *Thamnolia* reveals three lineages with distinct habitats and evolutionary histories. *Ecol Evol*. 2017;7(10):3602–15.
21. Jørgensen PM. The troublesome genus *Thamnolia* (lichenized Ascomycota). *Lichenologist*. 2019;51(3):221–6.
22. Culberson WL. The lichen genus *Thamnolia*. *Brittonia*. 1963;15(2):140–4.
23. Yu H, Shen X, Liu D, Hong M, Lu Y. The protective effects of β -sitosterol and vermicularin from *thamnolia vermicularis* (Sw.) Ach. Against skin aging in vitro. *An Acad Bras Cienc*. 2019;91(4).
24. Luo H, Ren M, Lim KM, Koh YJ, Wang LS, Hur JS. Antioxidative Activity of Lichen *Thamnolia vermicularis* in vitro. *Mycobiology*. 2006;34(3):124.
25. Li C, Guo XD, Lei M, Wu JY, Jin JZ, Shi XF, et al. *Thamnolia vermicularis* extract improves learning ability in APP/PS1 transgenic mice by ameliorating both A β and Tau pathologies. *Acta Pharmacol Sin*. 2017;38(1):9–28.
26. Studzińska-Sroka E, Dubino A. Lichens as a source of chemical compounds with anti-inflammatory activity. *Herba Polonica*. 2018;64(1):56–64.
27. Onut-Brännström I, Johannesson H, Tibell L. *Thamnolia tundrae* sp. nov., a cryptic species and putative glacial relict. *Lichenologist*. 2018;50(1):59–75.
28. OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method INTRODUCTION. 2001.

29. Suarez MO. INTERAPRENDIZAJE DE ESTADÍSTICA BÁSICA. 2nd ed. Vol. 1. Ibarra: ISBN; 2018. 14–16 p.
30. Rejón Orantes J del C, Álvarez Perdomo S, Crespo-Ramírez M, Pérez de la Mora M. Un nuevo método de evaluación de la prueba de contorsiones ácido acético. *Revista Anales de Medicina Universitaria* [Internet]. 2023 May 10;2(1):44–50. Available from: <http://www.revistas.unach.mx/index.php/revanales/article/view/65/version/65>
31. Maestri E. The 3rs principle in animal experimentation: A legal review of the state of the art in europe and the case in Italy. *BioTech*. 2021 Jun 1;10(2).
32. Ministerio de Agricultura, editor. Mapa ecológico del Perú [Internet]. Lima, Perú; 1995 [cited 2025 Jun 8]. Available from: <https://keneamazon.net/Documents/Publications/Virtual-Library/Maps/INRENA-mapa-ecologico.pdf>
33. Polk MH, Young KR, Cano A, León B. Vegetation of andean wetlands (bofedales) in huascarán national park, Peru. *Mires and Peat*. 2019;24.
34. De Castro Faria F, Alves Ferreira C, Lopes Cantuária V, Kato KC, Armini Ruela F, Costa Archanjo F, et al. Phytochemical screening and evaluation of the toxic potential of ethanolic extract and fractions of *Ageratum fastigiatum*. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*. 2022 Oct 24;51(1).
35. Seguí HOG, De Jesús Hernández López J, Giersiepen JH. Methanol: Tolerances and Requirements in Norms for Mezcal and Agave Drinks. *Revista Iberoamericana de Viticultura Agroindustria y Ruralidad*. 2020 Jan 1;7(19):1–21.
36. Vinueza D, Janeta M, Pilco G, Acosta K, Abdo S. Evaluación De La Actividad Antiinflamatoria Y Citotóxica De Atranorina Y Dilactona Del Ácido Pulvínico: Compuestos Fenólicos Bioactivos Del Líquen. *Perfiles*. 2018;1(19):30–6.
37. Rafieian-kopaei M, Shakiba A, Sedighi M, Bahmani M. The Analgesic and Anti-Inflammatory Activity of *Linum usitatissimum* in Balb/c Mice. *J Evid Based Complementary Altern Med*. 2017;22(4):892–6.

38. Noreen H, Semmar N, Farman M, McCullagh JSO. Measurement of total phenolic content and antioxidant activity of aerial parts of medicinal plant *Coronopus didymus*. *Asian Pac J Trop Med*. 2017 Aug 1;10(8):792–801.
39. Yimer T, Birru EM, Adugna M, Geta M, Emiru YK. Evaluation of analgesic and anti-inflammatory activities of 80% methanol root extract of *echinops kebericho* m. (asteraceae). *J Inflamm Res*. 2020; 13:647–58.
40. Singh A, Singh A, Chouhan O, Tandi GP, Dua M, Gehlot A. Anti-inflammatory and analgesic activity of aqueous extracts of dried leaves of *Murraya koenigii* Linn. *Natl J Physiol Pharm Pharmacol*. 2016;6(4):286–90.
41. TOXICIDAD SUBAGUDA DEL EXTRACTO ACUOSO DE LOS LIQUENES ANTARTICOS *RAMALINA TEREBRATA* Y *XANTHORIA CANDELARIA* EN RATAS. República; 2015 Dec.
42. Navarro G E, Ávila I JA, Mollinedo P P, Vila C JL, Ruiz P. G. VALORACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA IN VIVO DEL ÁCIDO ÚSNICO [Internet]. La Paz, Bolivia; 2010 Dec. Available from: <http://www.bolivianchemistryjournal.org>, <http://www.scielo.org>, <http://www.scribd.com/bolivianjournalofchemistry>
43. Brodo I, Duran Sharnoff S, Sharnoff S. *Lichens of North America*. Wm. C. Brown Company; 2002. 246 p.
44. Friedmann EI. *Lichens of Antarctica and South Georgia: A Guide to Their Identification and Ecology*. *Arct Antarct Alp Res*. 2003 Aug;35(3):410–410.
45. Orange Alan, James PW., White FJ. *Microchemical methods for the identification of lichens*. British Lichen Society; 2010. 101 p.
46. Lumbsch HT. *Analysis of Phenolic Products in Lichens for Identification and Taxonomy*.
47. Robles J, Morales P, Pastor de Abram A. LIQUENES Y SUSTANCIAS LIQUENICAS. *Revista de Química*. 1992 Jun;1–12.

48. Méndez L, Rojas J, Contreras-Moreno B. Actividades biológicas analizadas en los extractos de *Jatropha curcas* Linn [Internet]. 2018. Available from: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?>
49. Paladino SC, Zuritz CA. Extracto de semillas de vid (*Vitis vinifera* L.) con actividad antioxidante: eficiencia de diferentes solventes en el proceso de extracción. 2011 Apr 9; 43:1871–199.
50. Salazar Garcés EC, Sailema Ortiz ML, Palacios Duchicela RH, Carrera Borja WX, Zambrano Mendoza CA. Efecto de solvente y temperatura para la extracción de compuestos fenólicos en hojas de fresa. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*. 2023 Jun 16;7(3):2563–75.
51. Plaza CM, Díaz De Torres LE, Lücking RK, Vizcaya M, Medina GE. Antioxidant activity, total phenols and flavonoids of lichens from Venezuelan Andes. *J Pharm Pharmacogn Res* [Internet]. 2014;2(5):138–47. Available from: <http://jppres.com/jppres>
52. Cabrera Romero JV, Vargas Espinoza E del C. Estudio fitoquímico de líquen *Thamnolia vermicularis* (Sw.) Ach. ex Schaer) [Trabajo de Titulación]. [Cuenca]: Escuela de Bioquímica y Farmacia; 2018.
53. Association of Official Analytical Chemist. Guidelines For Standar Method Performance Requirement. 2016.
54. Magnusson B, Ôrnemark U. Eurachem Guide: The fitness for purpose of analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics. Vol. 2. Eurachem; 2014. 70 p.
55. International conference on Harmonisation. ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY Q2(R1). Vol. 4. 2005.
56. Illana-Esteban C. LÍQUENES USADOS EN MEDICINA TRADICIONAL. Vol. 36, Bol. Soc. Micol. Madrid. 2012.

57. Pedrazzini A. PRIMEROS PASOS EN LA CIENCIA: DESCIFRANDO LOS PODERES CURATIVOS DE LOS LÍQUENES. Desde la patagonia, Difundiendo saberes. 2009;
58. Manojlovic N, Gritsanapan W, Milosev M, Manojlovic I. Antimicrobial activity of some lichen substances. *Planta Medica - PLANTA MED.* 2007 Aug 1;73.
59. Le Bars D, Gozariu M, Cadden S. Animal models of nociception. *Pharmacological Reviews.* 2001;597–652.
60. Julius D, Basbaum A. Molecular mechanisms of nociception. *Nature.* 2001.
61. Millan MJ. THE INDUCTION OF PAIN: AN INTEGRATIVE REVIEW. 1999.
62. Vogel H. *Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assay.* Vol. 2. Springer; 2008.
63. Lujan-Carpio E, Pante-Medina C, Salazar-Granara A. Dosis respuesta en la actividad analgésica periférica de la metformina en la prueba de contorsiones abdominales en ratones. *Horizonte Médico (Lima)* [Internet]. 2018 Dec 31;18(2):41–6. Available from: <http://www.horizontemedico.usmp.edu.pe/index.php/horizontemed/article/view/728>
64. Rodríguez Gil JR. Evaluación del efecto antinociceptivo de fosfoserinas a-metiladas en roedores. [Cuernavaca]: Universidad Autónoma del Estado de Morelos; 2021.
65. Bryda EC. The Mighty Mouse: the impact of rodents on advances in biomedical research. *Science of medicine* [Internet]. 2013 Jun; Available from: www.who.int/cardiovascular_diseases
66. Elmer GI, Pieper JO, Stevens Negus S, Woods JH. Genetic variance in nociception and its relationship to the potency of morphine-induced analgesia in thermal and chemical tests. 1998.
67. Aoussar N, Laasri FE, Bourhia M, Manoljovic N, Mhand RA, Rhallabi N, et al. Phytochemical analysis, cytotoxic, antioxidant, and antibacterial activities of lichens. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine.* 2020;2020.

68. Luo H, Ren M, Lim KM, Jin Koh Y, Wang LS, Hur JS. Antioxidative Activity of Lichen *Thamnolia vermicularis* in vitro. *The Korean Society of Mycology*. 2006 Jul 10;124–7.
69. Ramirez Ordaya Á. Trabajos científicos del IV congreso nacional de liquenología del Perú [Internet]. Primera. Ramirez Ordaya ÁM, editor. Vol. 1 Volumen. Asociación Proyecto Ecológicos Perú; 2021. 1–308 p. Available from: www.liquenesperu.com
70. Perico Franco LS. Antioxidantes de los líquenes *Stereocaulon strictum* (Stereocaulaceae) y *Lobariella pallida* (Lobariaceae) y determinación de su potencial citotoxicidad [Farmacia]. [Bogota, Colombia]: Universidad Nacional de Colombia; 2011.
71. Navarro Guarachi E. Determinación de la Actividad Leismanicida, Tripanocida In vitro y Valoración de la Toxicidad Aguda del Ácido Úsnico In Vivo. [La paz - Bolivia]: Universidad Mayor de San Andrés; 2010.
72. Valencia Quispe MY, Choque Mendoza MR. 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 [Ciencias de la Salud]. [Cuzco]: Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco; 2022.
73. Emsen B, Yildirim E, Aslan A. Insecticidal activities of extracts of three lichen species on *sitophilus granarius* (l.) (coleoptera: Curculionidae). *Plant Protection Science*. 2015 Jul 11;51(3):155–61.
74. Pontificia Universidad Católica del Perú. *Revista de Química PUCP*. Vol25. 2011;1–6.
75. Jimenez Jarillo JM. Mecanismo de acción de los diuréticos. Universidad de Laguna; 2017.
76. González Ruiz P, Remedio López Liria. Trabajo de fin de Master: “Evidencias sobre la seguridad y Toxicidad de las plantas medicinales.”

ANEXOS Y TABLAS



Imagen 1. Vista satelital del distrito de Puños. (Departamento de Huánuco, distrito de Puños, Perú. *Google Maps, 2024. Maps.google.com*)



Imagen 2. Vista del panorama de la zona de estudio (Departamento de Huánuco, distrito de Puños, Perú. *Google Maps, 2024. Maps.google.com*)



Imagen 3. Liquen Thamnolia vermicularis secado. (fuente propia)



Imagen 4. Fuente de porcelana con el extracto liquénico secado previamente.

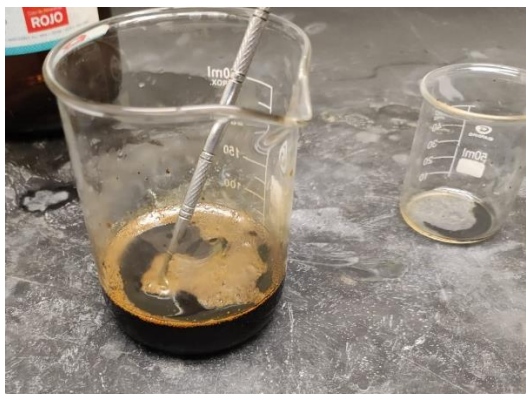


Imagen 5. Disolución del extracto líquénico en metanol previo al análisis de compuestos fenólicos.



Imagen 6. Espectrofotómetro empleado para la cuantificación de la absorbancia del extracto líquénico durante el análisis.

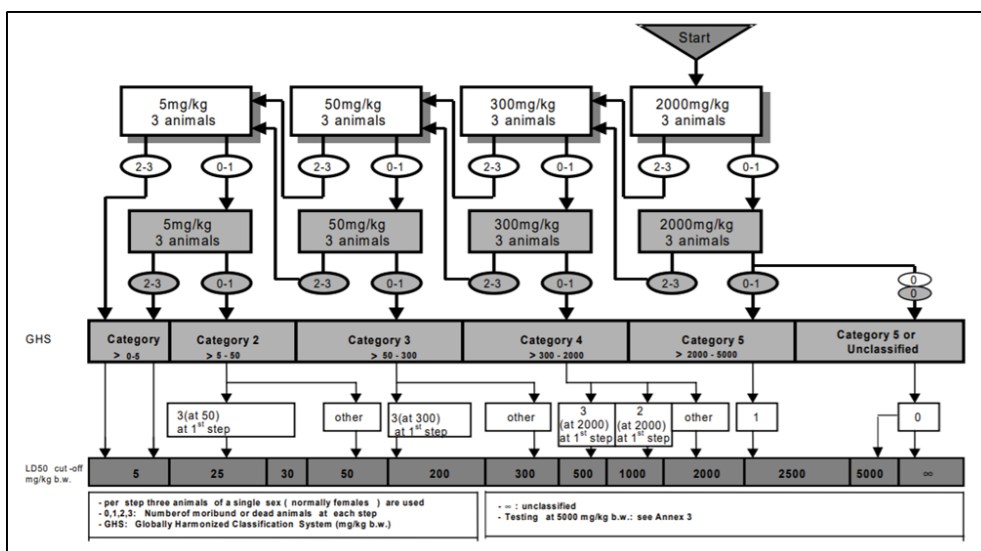


Figura 1. Flujoograma indicando procedimiento del test de toxicidad aguda a dosis de 2.00 g/kg de peso de animal (guía n°423 de la OECD) (28)

Carta de aprobación del comité de ética



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

CONSTANCIA-CIEA-039-10-23

El Presidente del Comité Institucional de Ética para el uso de Animales (CIEA) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia hace constar que el proyecto de investigación señalado a continuación fue **APROBADO** por el Comité de Ética.

Título del Proyecto : "Cuantificación de compuestos fenólicos y evaluación de la actividad toxica aguda y analgésica del extracto etanólico de *Thamnia vermicularis* en ratones Balb/c y ratas Holtzman"

Código SIDISI : 211517

Investigador(a) principal(es) : Chíncha Arias, Wendy Gabriela

La aprobación incluyó los documentos finales descritos a continuación:

Protocolo de investigación, versión de fecha 12 de noviembre del 2023.

La **APROBACIÓN** considera el cumplimiento de los estándares de la Universidad, los lineamientos Científicos y éticos, el balance riesgo/beneficio, la calificación del equipo investigador y la Confidencialidad de los datos, entre otros.

Cualquier enmienda, desviaciones, eventualidad deberá ser reportada de acuerdo a los plazos y normas establecidas. El investigador reportará cada seis meses el progreso del estudio y alcanzará un informe al término de éste. La aprobación tiene vigencia desde la emisión del presente documento hasta el **12 de noviembre del 2024**. Si aplica, los trámites para su renovación deberán iniciarse por lo menos 30 días previos a su vencimiento.

El presente proyecto de investigación sólo podrá iniciarse después de haber obtenido la(s) autorización(es) de la(s) institución(es) donde se ejecutará.

Si aplica, los trámites para su renovación deberán iniciarse por lo menos 30 días previos a su vencimiento.

Lima, 13 de noviembre del 2023.



Dr. Mammel Gasco Tantachuco
Presidente

Comité Institucional de Ética para el Uso de Animales

/ or

Av. Honorario Delgado 430
San Martín de Porres
Apartado Postal 4314
319 0000 Anexo 201355
orvei.ciea@oficinas-upch.pe
cayetano.edu.pe

Comité Institucional de Ética
para el uso de Animales

Carta de certificación de espécimen

Lima, 03 de junio del 2025



Certificación Taxonómica del Liquen *Thamnotia*

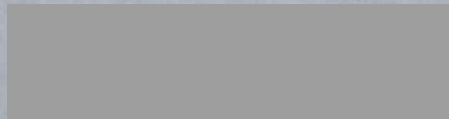
A quien corresponda:

Por medio de la presente yo Dra. Magdalena Pavlich, experta en el área de micología, estuve presente durante el proceso de identificación de un liquen perteneciente al género *Thamnotia*.

La identificación se realizó de manera descriptiva mediante la identificación visual confirmando características, tales como las ramificaciones filiformes del talo y la coloración blanquecina típica de la especie. Secuencialmente, se realizó la identificación con la prueba química de hidróxido de potasio (KOH), donde tuvo lugar una reacción positiva produciendo una coloración amarillenta, siendo esta reacción característica de la especie *Thamnotia vermicularis*, debido a la presencia de los ácidos baeticos y squamático, propios de esta especie.

Por lo tanto, certifico que el ejemplar en cuestión corresponde a la especie *Thamnotia vermicularis*.

Sin otro particular, saludo atentamente.



Dra. Magdalena Pavlich

*Directora del Laboratorio de Cultivos de Tejidos
Vegetales-LID-UPCH
Profesora Extraordinaria en Investigación y Emérita-UPCH*

Tabla de absorbancias

Nº	Abs
1	1.33280
2	1.12810
3	0.63179
4	0.69390
5	0.37586
6	0.33978
7	0.11166
8	0.15671
9	0.06561
10	0.06842
11	0.03498
12	0.02951

Promedio (\bar{x}): 0.3525

Desviación estándar (SD): 0.0438

Coefficiente de variación (CV%): 12.4%