

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



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

TESIS PRESENTADA POR:

Br. MILA YUREMA VALENCIA QUISPE
Br. MILAGROS REYNA CHOQUE MENDOZA

PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL
DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO

ASESORA:
Mgt. Anahí Karina Cardona Rivero

CO-ASESORAS:
Dra. María Encarnación Holgado Rojas
Blga. Olga Libia Cjuno Huanca

CUSCO – PERÚ
2022

DEDICATORIA

Expresamos nuestro más sincero agradecimiento a nuestra asesora de tesis Mgt. Anahí Karina Cardona Rivero por su apoyo desinteresado, sus acertados consejos, correcciones e inestimables aportes para cumplir con los objetivos programados en la tesis, por su paciencia y dedicación para que este trabajo de tesis fuese el que es, a pesar de las dificultades que se ha ido encontrado por el camino, nunca ha desistido, dedicándonos siempre con palabras alentadoras para continuar realizando este trabajo de tesis.

A nuestra coasesora, Dra. Maria Encarnación Holgado Rojas, por su ayuda desinteresada, dedicación. Comprensión, paciencia, por sus consejos, sus enseñanzas y permanente apoyo en la elaboración en nuestro trabajo de investigación.

A nuestra coasesora Blga. Olga Libia Cjuno Huanca, por su colaboración y el valioso tiempo dedicado a este trabajo de tesis, por su invaluable contribución en la ejecución y culminación del presente trabajo de investigación.

A los miembros del jurado de tesis por su acertada contribución en la elaboración del presente trabajo de investigación.

A nuestros profesores, por todo su ayuda y dedicación, confianza y comprensión por estrecharnos su mano siempre que lo necesitábamos, por todos los consejos que nos dieron y sabemos que sin ellos no hubiese sido posible la realización de este trabajo por todo esto y mucho más estaré eternamente agradecido.

A todos, muchas gracias.

Las tesoristas.

Índice

Introducción.....	1
Capítulo I.....	2
1.1. Planteamiento del problema	2
1.2. Formulación del problema.....	3
1.3. Objetivos.....	4
Objetivos generales	4
Objetivos específicos	4
1.4. Justificación del estudio	5
1.5. Hipótesis	6
Capítulo II.....	7
2.1. Visión histórica.....	7
2.2. Antecedentes del estudio	8
2.2.1. Antecedentes internacionales.....	8
2.2.2. Antecedentes nacionales.....	12
2.2.3. Antecedentes locales.....	17
2.3. Bases teóricas científicas.....	18
2.3.1. Líquenes:.....	18
2.3.1.1. Definición y morfología.....	18
2.3.1.2. Componentes de la simbiosis	18
2.3.1.3. Liqueñización:	19
2.3.1.4. Tipos de tejidos:.....	19
2.3.1.5. Estructura:.....	19
2.3.1.6. Tipos de líquenes:.....	20
2.3.1.7. Órganos apendiculares:	21
2.3.1.8. Reproducción:	21
2.3.1.9. Ecología:	22
2.3.1.10. Crecimiento:	22
2.3.2. Usnea	23
2.3.2.1. Clasificación botánica	23
2.3.2.2. Descripción botánica.....	23
2.3.2.3. Características fisicoquímicas.....	23
2.3.2.4. Hábitat.....	23
2.3.3. Ramalina	24
2.3.3.1. Clasificación botánica	24
2.3.3.2. Descripción botánica.....	24

2.3.3.3. Hábitat.....	25
2.3.4. Ácido úsnico	25
2.3.5. Citotoxicidad	25
2.3.5.1. Ciclo celular.....	26
2.3.5.1.1. Fases del ciclo celular.....	27
2.3.5.1.2. Índice mitótico:.....	29
2.3.6. Bioensayos	29
2.3.1. Bioensayo con nauplios de <i>artemia salina leach</i>	31
2.3.2. Bioensayo en semillas	35
2.3.2.2. <i>Lactuca sativa</i> (lechuga)	35
2.3.2.3. <i>Beta vulgaris l.</i> (betarraga).....	36
2.3.2.4. <i>Raphanus sativus</i> (rabanito)	37
2.3.3. Bioensayo en <i>allium cepa l.</i>	37
2.4. Definición de términos básicos	44
Capítulo III.....	46
Materiales y métodos	46
3.1. Materiales	46
3.1.1. Materiales de campo	46
3.1.2. Materiales de gabinete	46
3.1.3. Materiales biológicos	46
3.1.4. Materiales de laboratorio	47
3.1.5. Reactivos.....	47
3.2. Diseño metodológico.....	48
3.2.1. Tipo de estudio	48
3.2.2. Tipo de diseño	48
3.2.3. Definición operacional de las variables.....	49
3.2.3.1. Variables implicadas.....	49
3.2.3.2. Variables no implicadas.....	53
3.2.4. Criterios de selección	58
3.3. Area de estudio.....	58
3.4. Procedimiento	59
3.4.1. Preparación de la muestra vegetal.....	60
3.4.1.1. Recolección de los líquenes	60
3.4.1.2. Recolección de los líquenes (<i>usnea y ramalina</i>)	61
3.4.2. Pruebas fitoquímicas cualitativas. - (tamizaje fitoquímico cualitativo) 61	
3.4.3. Cuantificación del ácido úsnico.....	62
3.4.4. Bioensayo en <i>Artemia salina</i> . Según método propuesto.....	63

3.4.5. Bioensayo en semillas	66
3.4.6. Bioensayo en <i>Allium cepa</i> L.....	69
3.4.7. Procedimiento <i>Allium cepa</i> L.....	69
Capitulo IV.....	71
Análisis y discusión de resultados.....	71
4.2 Análisis fitoquímico cualitativo de los extractos de dos especies de líquenes <i>Usnea sp.</i> y <i>Ramalina</i>	72
4.3 Prueba de citotoxicidad en <i>artemia salina</i> con los extractos acuosos y etanólicos de <i>Ramalina</i> y <i>Usnea sp.</i>	74
4.3.1. Registro de datos.....	74
4.3.1. Concentración letal media.....	76
4.4 Prueba de citotoxicidad en semillas con los extractos acuosos y etanólicos de <i>Usnea sp</i> y <i>Ramalina</i>	79
4.4.1-. Pruebas de sensibilidad.....	79
4.4.2-. Análisis de varianza (anova).....	92
4.4.3-. Concentración de inhibición media	94
4.5 Prueba de citotoxicidad en <i>Allium cepa</i> de los extractos acuosos y etanólicos de dos especies de líquenes <i>Usnea sp.</i> y <i>Ramalina</i>	96
4.5.1-. Registro de signos de fitotoxicidad.	96
4.5.2-. Promedio del crecimiento radicular.....	99
4.5.3-. Porcentaje del efecto de inhibición.	102
Conclusión	109
Sugerencias	110
Referencias bibliográficas	111
Anexos	115

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Identificación y operacionalización de las variables independientes ..	56
Tabla 2: Identificación y operacionalización de las variables dependientes.....	57
Tabla 3: Cantidad de personas que conocen sobre los líquenes <i>Usnea sp.</i> y <i>Ramalina</i>	71
Tabla 4: Pobladores que utilizan los líquenes <i>Usnea sp</i> y <i>Ramalina</i>	71
Tabla 5: Análisis fitoquímico cualitativo <i>Ramalina</i>	72
Tabla 6: Análisis fitoquímico cualitativo <i>Usnea</i>	73
Tabla 7: Resultados obtenidos de la prueba de citotoxicidad de <i>Artemia salina</i> en <i>Ramalina</i>	74
Tabla 8: Resultado del porcentaje de mortalidad del extracto acuoso y etanólico de <i>Ramalina</i>	74
Tabla 9: Resultados obtenidos de la prueba de citotoxicidad de <i>Artemia salina</i> en <i>Usnea</i>	75
Tabla 10: Resultado del porcentaje de mortalidad del extracto acuoso y etanólico de <i>Usnea</i>	76
Tabla 11-. Análisis de probit para la citotoxicidad y la CL50 de los extractos etanólicos y acuosos de la <i>Ramalina</i> en <i>Artemia salina</i>	76
Tabla 12-. Análisis de probit para la citotoxicidad y la CL50 de los extractos etanólicos y acuosos de la <i>Usnea</i> en <i>Artemia salina</i>	77
Tabla 13: Resultados de las pruebas de sensibilidad de la <i>Ramalina</i>	79
Tabla 14: Resultados de las pruebas de sensibilidad en la <i>Usnea</i>	80
Tabla 15: Resultado del análisis de varianza de la elongación	92
Tabla 16: Resultado del análisis de varianza de la germinación	92
Tabla 17: Resultado del análisis de varianza del índice de germinación	93
Tabla 18: Concentración de inhibición media (CI50-120) de la <i>Ramalina</i> en <i>Lactuca sativa</i> , <i>Beta vulgaris</i> y <i>Raphanus sativus</i>	94
Tabla 19: Concentración de inhibición media (CI50-120) de la <i>Usnea</i> en <i>Lactuca sativa</i> , <i>Beta vulgaris</i> y <i>Raphanus sativus</i>	94
Tabla 20: Cuadro comparativo de los efectos de la exposición de los extractos acuosos y etanólicos de la especie <i>Usnea sp.</i>	96
Tabla 21: Cuadro comparativo de los efectos de la exposición de los extractos acuosos y etanólicos de la especie <i>Ramalina</i>	97

Tabla 22: Datos de crecimiento radicular en <i>Allium cepa</i> de la especie <i>Usnea</i> <i>sp.</i>	99
Tabla 23; Datos de crecimiento radicular en <i>Allium cepa</i> de la especie <i>Ramalina</i>	100
Tabla 24: Datos de % de crecimiento e inhibición de la longitud de raíces en prueba de sensibilidad en <i>Allium cepa</i> en el extracto acuoso del líquen <i>Usnea</i>	102
Tabla 25: Datos de % de crecimiento e inhibición de la longitud de raíces en prueba de sensibilidad en <i>Allium cepa</i> en el extracto acuoso del líquen <i>Ramalina</i>	103
Tabla 26. Concentración de inhibición media CI_{50-72} en <i>Allium cepa</i> extracto acuoso de <i>Usnea</i>	104
Tabla 27:. Concentración de inhibición media CI_{50-72} en <i>Allium cepa</i> extracto acuoso de <i>Ramalina</i>	105
Tabla 28: Resultados obtenidos en el espectrofotómetro de rango de linealidad de la curva patrón.....	105
Tabla 29: Resultados de la lectura en el espectrofotómetro del líquen <i>Usnea</i>	106
Tabla 30: Lectura en el espectrofotómetro del líquen <i>Ramalina</i>	106
Tabla 31 Cálculo de la cuantificación de ácido úsnico de <i>Usnea</i>	107
Tabla 32 Cálculo de la cuantificación de ácido úsnico de <i>Ramalina</i>	107
Tabla 34: Datos de edad y sexo los pobladores de la comunidad Pacca.	143
Tabla 35: Pobladores y su grado de instrucción.....	143
Tabla 36: Principales ocupaciones de los pobladores de la comunidad Pacca	143

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Usnea</i> sp	23
Figura 2. <i>Ramalina</i>	24
Figura 3. Estructura química del ácido úsnico.....	25
Figura 4. Fases del ciclo celular	27
Figura 5. Comparación de promedio del crecimiento radicular de <i>Raphanus sativus</i> , <i>Beta vulgaris</i> y <i>Lactuca sativa</i> , en la fase acuosa del Liquen <i>Ramalina</i>	81
Figura 6. Comparación de promedio del crecimiento del hipocotilo de <i>Raphanus sativus</i> , <i>Beta vulgaris</i> y <i>Lactuca sativa</i> , en la fase acuosa del liquen <i>Ramalina</i>	82
Figura 7. Comparación de promedio de la inhibición del crecimiento radicular de <i>Raphanus sativus</i> , <i>Beta vulgaris</i> y <i>Lactuca sativa</i> , en la fase acuosa del liquen <i>Ramalina</i>	82
Figura 8. Comparación de promedio de la inhibición del crecimiento del hipocotilo de <i>Raphanus sativus</i> , <i>Beta vulgaris</i> y <i>Lactuca sativa</i> , en la fase acuosa del liquen <i>Ramalina</i>	83
Figura 9. Comparación del porcentaje de germinación de <i>Raphanus sativus</i> , <i>Beta vulgaris</i> y <i>Lactuca sativa</i> , en la fase acuosa del liquen <i>Ramalina</i>	83
Figura 10. Comparación del índice de germinación de <i>Raphanus sativus</i> , <i>Beta vulgaris</i> y <i>Lactuca sativa</i> , en la fase acuosa del liquen <i>Ramalina</i>	84
Figura 11. Comparación del índice de germinación residual normalizado de <i>Raphanus sativus</i> , <i>Beta vulgaris</i> y <i>Lactuca sativa</i> , en la fase acuosa del liquen <i>Ramalina</i>	84
Figura 12. Comparación del índice de elongación residual normalizado de <i>Raphanus sativus</i> , <i>Beta vulgaris</i> y <i>Lactuca sativa</i> , en la fase acuosa del liquen <i>Ramalina</i>	85
Figura 13. Comparación de promedio del crecimiento radicular de <i>Raphanus sativus</i> , <i>Beta vulgaris</i> y <i>Lactuca sativa</i> , en la fase acuosa del Liquen de <i>Usnea</i>	86
Figura 14. Comparación de promedio del crecimiento del hipocotilo de <i>Raphanus sativus</i> , <i>Beta vulgaris</i> y <i>Lactuca sativa</i> , en la fase acuosa del liquen <i>Usnea</i>	86
Figura 15. Comparación de promedio de la inhibición del crecimiento radicular de <i>Raphanus sativus</i> , <i>Beta vulgaris</i> y <i>Lactuca sativa</i> , en la fase acuosa del liquen <i>Usnea</i>	87

Figura 16. Comparación de promedio de la inhibición del crecimiento del hipocotilo de <i>Raphanus sativus</i> , <i>Beta vulgaris</i> y <i>Lactuca sativa</i> , en la fase acuosa del líquen <i>Usnea</i>	87
Figura 17. Comparación del porcentaje de germinación de <i>Raphanus sativus</i> , <i>Beta vulgaris</i> y <i>Lactuca sativa</i> , en la fase acuosa del líquen <i>Usnea</i>	88
Figura 18. Comparación del índice de germinación de <i>Raphanus sativus</i> , <i>Beta vulgaris</i> y <i>Lactuca sativa</i> , en la fase acuosa del líquen <i>Usnea</i>	88
Figura 19. Comparación del índice de germinación residual normalizado de <i>Raphanus sativus</i> , <i>Beta vulgaris</i> y <i>Lactuca sativa</i> , en la fase acuosa del líquen <i>Usnea</i>	89
Figura 20. Comparación del índice de elongación residual normalizado de <i>Raphanus sativus</i> , <i>Beta vulgaris</i> y <i>Lactuca sativa</i> , en la fase acuosa del líquen <i>Usnea</i>	90
Figura 21. Comparación de promedios del crecimiento radicular de <i>Allium cepa</i> expuestos a extractos del líquen <i>Usnea</i>	101
Figura 22. Comparación de promedios del crecimiento radicular de <i>Allium cepa</i> expuestos a extractos del líquen <i>Ramalina</i>	101
Figura 23. Comparación de promedios del crecimiento radicular de <i>Allium cepa</i> expuestos a extractos del líquen <i>Usnea</i>	103
Figura 24. Comparación de promedios del crecimiento radicular de <i>Allium cepa</i> expuestos a extractos del líquen <i>Ramalina</i>	104
Figura 25. Resultados obtenidos en el espectrofotómetro de rango de linealidad de la curva patrón	106

ABREVIATURAS

IG	: Índice de germinación
IGN	: Índice de porcentaje de germinación residual normalizado.
IER:	:Índice de elongación radicular residual normalizado
DMSO	: Dimetil sulfoxido
CE50	: Concentración efectiva media
CI50	: Concentración inhibitoria media
CL50	:Concentración letal media
Ppm	: Partes por millón
Cu	: Cobre
CYTED	: Programa iberoamericano de ciencia y tecnología para el desarrollo
IM	: Índice mitótico
IF	: Índice de fases
CC	: Ciclo celular
Zn	: Zinc

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar la citotoxicidad en bioensayos y cuantificación el ácido úsnico de los extractos acuosos y etanólicos al 70% de dos especies de líquenes (*Usnea sp.* y *Ramalina*).

Se realizó la recolección e identificación por el herbario Vargas de las dos especies de líquenes. A si mismo se sistematizo la información del conocimiento de los pobladores sobre líquenes, que de 33 personas que conocen solo el 87.89% hacen uso del liquen.

En el bioensayo de *Artemia salina* se observó un efecto citotóxico extremadamente tóxicos con una CL₅₀ (Concentración Letal Media) de 18.702 ppm para el extracto acuoso y para el extracto etanólico de 0.109 de la *Ramalina* y para la *Usnea* con un extracto acuoso de CL₅₀ es de 0.962 ppm y para un extracto etanólico de 0.359 ppm. Así mismo se realizó estudios de los efectos tóxicos que puedan generar los líquenes *Usnea spp* y *Ramalina* tanto en extractos acuosos y etanólicos con unos organismos específicos como son la lechuga de semilla (*Lactuca sativa*), Beterraga (*Beta vulgaris*) y Rabanito (*Raphanus sativa*) por medio de algunos ensayos en donde se obtuvo una CL₅₀ (Concentración Letal Media) de 176.645 ppm para *Lactuca sativa*, 509,320 para *Beta vulgaris* y 362,266 para *Raphanus sativus* con el extracto acuoso de la *Ramalina* y para el extracto acuoso de la *Usnea* se obtuvo una CL₅₀ (Concentración Letal Media) de 1437.129 para *Lactuca sativa*, 1324.161 para *Beta vulgaris* y 852.768 para *Raphanus sativus*. Los valores nos indican la presencia de un gradiente de toxicidad moderada al tratamiento donde a concentraciones altas se evidencia más toxicidad respecto a concentraciones bajas.

En el ensayo de *Allium cepa*, en el extracto acuoso de *Usnea* se obtuvo la CL₅₀ de 1475.767 ppm, la toxicidad expresada en unidades de toxicidad es de 0.068 UT, con ello se demuestra que es ligeramente tóxico y en el extracto del liquen *Ramalina* se obtuvo la CL₅₀ de 856.733 ppm, la toxicidad expresada en unidades de toxicidad es de 0.1168 UT, con ello también se demuestra que es ligeramente tóxico.

Por último, en la cuantificación de ácido úsnico se obtuvo 9.47 ppm de ácido úsnico en el extracto alcohólico y un 3.001 ppm en el extracto acuoso para el liquen *Usnea sp* y para el liquen *Ramalina* se obtuvo en el extracto alcohólico una concentración de 8.13 ppm de ácido Úsnico y en el extracto acuoso 1.27 ppm.

En conclusión, los resultados muestran que los extractos acuoso y etanólico al 70% tienen un gran potencial de actividad antiproliferativa y citotóxica, pero estas pueden incrementar a dosis altas y a una larga duración, por ende, los datos sugieren que los liques se pueden considerar seguro cuando se hace uso de pequeñas dosis.

PALABRAS CLAVES *Usnea*, *Ramalina*, Ácido úsnico, citotoxicidad, *Artemia salina*, *Lactuca sativa*, *Beta vulgaris*, *Raphanus sativus*, *Allium cepa*.

ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the cytotoxicity in bioassays and quantification of usnic acid in aqueous and 70% ethanolic extracts of two species of lichens (*Usnea* sp. and *Ramalina*).

The collection and identification of the two species of lichens was carried out by the Vargas herbarium. Likewise, the information on the knowledge of the inhabitants about lichens was systematized, that of 33 people who know only 87.89% make use of the lichen.

In the *Artemia salina* bioassay, an extremely toxic cytotoxic effect was observed with an LC50 (Median Lethal Concentration) of 18.702 ppm for the aqueous extract and for the ethanolic extract of 0.109 of the *Ramalina* and for the *Usnea* with an aqueous extract of LC50 is of 0.962 ppm and for an ethanolic extract of 0.359 ppm. Likewise, studies were carried out on the toxic effects that the lichens *Usnea* spp and *Ramalina* can generate both in aqueous and ethanolic extracts with specific organisms such as seed lettuce (*Lactuca sativa*), *Beterraga* (*Beta vulgaris*) and *Rabanito* (*Raphanus sativa*). Through some tests where an LC50 (Median Lethal Concentration) of 176,645 ppm was obtained for *Lactuca sativa*, 509,320 for *Beta vulgaris* and 362,266 for *Raphanus sativus* with the aqueous extract of *Ramalina* and for the aqueous extract of *Usnea*, a LC50 (Median Lethal Concentration) of 1437.129 for *Lactuca sativa*, 1324.161 for *Beta vulgaris* and 852.768 for *Raphanus sativus*. The values indicate the presence of a gradient of moderate toxicity to the treatment where at high concentrations more toxicity is evident compared to low concentrations.

In the *Allium cepa* test, in the aqueous extract of *Usnea*, the LC50 of 1475.767 ppm was obtained, the toxicity expressed in toxicity units is 0.068 TU, with this it is shown that it is slightly toxic and in the extract of the lichen *Ramalina* it was obtained the LC50 of 856.733 ppm, the toxicity expressed in toxicity units is 0.1168 UT, with this it is also shown that it is slightly toxic.

Finally, in the quantification of usnic acid, 9.47 ppm of usnic acid was obtained in the alcoholic extract and 3,001 ppm in the aqueous extract for the lichen *Usnea* sp and for the lichen *Ramalina*, a concentration of 8.13 ppm was obtained in the alcoholic extract. Usnic acid and in the aqueous extract 1.27 ppm.

In conclusion, the results show that the aqueous and ethanolic extracts at 70% have a great potential for antiproliferative and cytotoxic activity, but these can increase at high doses and over a long period of time, therefore, the data suggest that liqueurs can be considered safe. when using small doses.

KEY WORDS *Usnea*, *Ramalina*, Usnic acid, cytotoxicity, *Artemia salina*, *Lactuca sativa*, *Beta vulgaris*, *Raphanus sativus*, *Allium cepa*.

INTRODUCCIÓN

Los líquenes son organismos simbióticos que están conformados por un hongo y un alga, generan metabolitos secundarios que son compuestos fenólicos, propios de ellos, los cuales se acumulan en tallos (dépsidos, depsidonas, dibenzofuranos y ácidos úsnicos). (1)

Uno de los compuestos más estudiados de los líquenes es el ácido úsnico, el cual es el principio activo principal de los líquenes, los isómeros ópticos de este ácido evidencian una actividad farmacológica. Son eficientes ante neumococos, estreptococos y estafilococos. De igual manera, muestran actividad antibiótica ante diversos tipos de *Mycobacterium*. Además, se ha conseguido agrandar de manera considerable la antibiosis de dichos compuestos con sus espectros, dando así la obtención de otros derivados de los ácidos úsnico. (2)

El Perú disfruta de una variedad de especies de líquenes, en Cusco se reconocieron 50 especies diversos de líquenes que fueron separados en 26 géneros, 17 familias y 7 órdenes. (3)

Desde 1982 se han desarrollado bioensayos útiles para evaluar la citotoxicidad con estudios de "camarón marino" (*Artemia salina*), y se investigó el bioensayo con nauplios de *Artemia salina*, estudiado como comprobación de toxicidad general además de la evaluación farmacológica de extractos de plantas, por lo que se utiliza para detectar toxinas de extractos altamente tóxicos. (4)

Por esto, ha sido nuestro interés el de hacer el estudio fitoquímico cualitativo, cuantificación del ácido úsnico y citotoxicidad en bioensayos de 2 especies de líquenes (*Usnea sp* y *Ramalina*), para verificar sus características fitoquímicas y establecer la concentración media de los extractos de los líquenes con el objetivo de determinar el porcentaje que causó un impacto tóxico en el 50% del extracto de dos especies de líquenes *Usnea sp* y *Ramalina*.

CAPÍTULO I GENERALIDADES

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los líquenes han sido utilizados por el ser humano en perfumería, cosmética, como tintes, como alimentos, como bioindicadores de contaminación, para tratar diversas enfermedades, desde mucho antes de que se conociera el porqué de sus efectos. Actualmente se sabe que los componentes de los líquenes responsables de muchas de sus propiedades son sus metabolitos secundarios, entre los que cabe remarcar el ácido úsnico y la atranorina. (5)

El hombre ha mostrado muy poca interacción con la naturaleza y el medio ambiente, y con ella una recurrente curiosidad por explorar la diversidad de sus reinos, las interrelaciones entre ellos y los vínculos que permiten la vida de la evolución; Por lo tanto, hasta la fecha, se sigue realizando más estudios experimentales para documentar las características de plantas y microorganismos y sus interrelaciones; y sus ventajas en las ramas de la medicina, la industria, el medio ambiente y otros.

Los líquenes son organismos complejos que consisten en una alianza íntima de un hongo y al menos un organismo fotosintético: algas verdes (clorofila) o cianobacterias. La alianza de dos criaturas produce un componente, el liquen, que es muy diferente de cualquiera de las dos criaturas separadas. Dentro de los líquenes se cumplen las necesidades básicas para que las algas y/o cianobacterias puedan realizar la fotosíntesis, a partir de las cuales se producen azúcares que sirven de nutriente a los hongos; Así, estas dos especies son capaces de producir una gama de metabolitos beneficiosos para el ser vivo gracias a sus propiedades antibacterianas, antioxidantes, antivirales, anticancerígenas, antitoxinas, analgésicas y antiinflamatorias. (6)

En 1982, Meyer et al., desarrollaron bioensayos para la determinación de citotoxicidad con la utilización de camarones de mar (*Artemia salina*). Es utilizada como vía inicial de tamizaje citotóxico de extractos, fracciones y compuestos depurados para discriminar aquellas muestras de elevada toxicidad, debido a que presenta buena correlación con la toxicidad *in vitro* demostrando ser un método adecuado para poner de manifiesto metabolitos secundarios

relacionados con actividades biológicas interesantes. Sin embargo, la CL₅₀ no advierte de una actividad fisiológica en particular, es un indicador de toxicidad a nivel celular. (7)

Los bioensayos con el empleo de plantas son considerados pruebas efectivas para evaluar efectos tóxicos de diferentes sustancias. En los vegetales, es importante destacar que durante el periodo de germinación y los primeros días de desarrollo de la plántula ocurren numerosos procesos fisiológicos en los que la presencia de una sustancia tóxica puede interferir alterando la supervivencia y el desarrollo normal de la planta, siendo por lo tanto una etapa de gran sensibilidad frente a factores externos adversos. Los estudios destacan la potencialidad del uso de *Allium cepa.*, *Beta vulgaris.*, *Lactuca sativa L.*, *Raphanus sativus L.*, ha sido considerados como sistemas de prueba para evaluar citotoxicidad. (7)

Hoy en día, el análisis de la biodiversidad debe centrarse principalmente en la apreciación y comprensión de nuevas especies que apoyan y promueven el desarrollo sostenible. En este aspecto, el estudio de diferentes especies de líquenes como fuente de compuestos citotóxicos proporciona la base para comprender sus propiedades beneficiosas y su potencial como especies citotóxicas.

Por esta razón, se planteó el presente estudio orientado a determinar el grado de citotoxicidad de dos líquenes *Usnea* y *Ramalina* en nauplios de *Artemia salina*, como también, la citotoxicidad en el modelo de plantas vasculares, con el objetivo de validar o descartar su uso terapéutico. Así mismo determinar la cantidad de ácido úsnico presente en estas dos especies, buscando con ello acreditar el uso medicinal y a su vez contribuir con el conocimiento científico de la flora de nuestro país.

1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Presentarán actividad citotóxica los extractos acuosos y etanólicos de los líquenes de *Usnea sp.* y *Ramalina* y cuál será el nivel de ácido úsnico presente?

1.3. OBJETIVOS

Objetivos generales

- Evaluar la citotoxicidad en bioensayos y cuantificar el 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

Objetivos específicos

1. Realizar la recolección e identificación de las dos especies de líquenes (*Usnea sp.* y *Ramalina*), de la comunidad de Pacca, distrito de Anta-Cusco.
2. Sistematizar la información de los pobladores sobre su conocimiento en el uso de las especies de líquenes (*Usnea sp.* y *Ramalina*) de la comunidad de Pacca.
3. Realizar el análisis fitoquímico cualitativo de los extractos de dos especies de líquenes (*Usnea sp.* y *Ramalina*), de la comunidad de Pacca, distrito de Anta- Cusco.
4. Determinar la citotoxicidad de los extractos de dos especies de líquenes (*Usnea sp.* y *Ramalina*), de la comunidad de Pacca, distrito de Anta- Cusco, empleando el ensayo de *Artemia Salina*.
5. Determinar la citotoxicidad de los extractos de dos especies de líquenes (*Usnea sp.* y *Ramalina*), de la comunidad de Pacca, distrito de Anta- Cusco, empleando el método *Lactuca sativa*, *Raphanus sativus* y *Beta vulgaris* expresado como concentración inhibitoria media CI_{50} , índice de germinación IGN e índice de elongación IER.
6. Determinar la citotoxicidad de los extractos de dos especies de líquenes (*Usnea sp.* y *Ramalina*), de la comunidad de Pacca, distrito de Anta- Cusco, empleando el método *Allium cepa* expresada como concentración inhibitoria media CI_{50} e índice mitótico.
7. Cuantificar el ácido úsnico empleando el método de Espectrofotometría UV Visible de los extractos de dos especies de líquenes (*Usnea sp.* y *Ramalina*), de la comunidad de Pacca, distrito de Anta- Cusco.

1.4. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

- **Conocimiento**

El ácido úsnico es el metabolito más usual en líquenes, aislado en el año de 1844 inicialmente de *Usnea*, por lo cual se plantea realizar la cuantificación del ácido úsnico de los líquenes y debido a ello es necesario estudiar rigurosamente los compuestos fitoquímicos presentes en los líquenes y que estos puedan tener un potencial farmacéutico. (5)

Los líquenes tienen varios beneficios farmacológicos dentro de sus sustancias metabólicas. En los últimos años han surgido nuevos estudios de un interés farmacológico antitumorales y de gran importancia que se ve en estos últimos años son las propiedades neuro protectoras de los metabolitos de los líquenes. (8)

- **De prioridad:**

Los líquenes han demostrado tener un gran potencial, a distintos niveles, en sus posibles aplicaciones para el ser humano. No obstante, el hecho es que hoy en día solo se pueden nombrar dichas aplicaciones en referencia a su capacidad potencial. (9)

Los líquenes tienen una amplia gama de aplicaciones para el ser humano en diferentes sectores, como son el industrial, dentro del cual estaría el uso como bioindicadores, perfumes, tintes o cosméticos, el bromatológico o el farmacológico, en el que podemos encontrar un gran número de aplicaciones potenciales como es la de antiinflamatorio, hemoaglutinante, antifúngico, antimicrobiano y antioxidante, esta última engloba tres importantes aplicaciones cuya investigación podría abrir puertas a nuevos tratamientos para el cáncer, el Alzheimer y el Parkinson. (5)

Sin embargo, quedan vías de investigación para llegar a tratamientos o medidas que puedan ayudar a la mejora de enfermedades, cada vez más comunes, como son las neurodegenerativas o el cáncer como es (seno, colón, próstata, ovario, páncreas y pulmón), una de las enfermedades de mayor mortalidad en el mundo. Se recomiendan

realizar cultivos in vitro de líquenes, purificación de enzimas implicadas en los procesos de síntesis, transformación y expresión de los genes responsables del ácido úsnico y metabolitos relacionados, así como el cultivo en biorreactores para sobre expresar la producción de úsnico. (5) La FAO reconoce que la medicina tradicional es utilizada por 80 % de la población en el Mundo, de tal forma que los líquenes son consumidos ampliamente en diversas regiones por su inocuidad y capacidad contra diversas enfermedades. A nivel ambiental, son excelentes bioindicadores de la calidad ambiental de las ciudades, por lo que se perfilan como íconos de salud, seguridad y calidad ambiental. (10)

- **De aplicabilidad**

La presente investigación es un punto de partida del conocimiento científico sobre la existencia de los líquenes en la comunidad de Pacca distrito de Anta, provincia del Cusco.

El estudio citotóxico será una herramienta importante para los siguientes estudios anticancerígenos empleando métodos diferentes y comparando con fármacos anticancerígenos será un estudio importante para la sociedad. (5)

Con todo lo expuesto anteriormente y enmarcado dentro de nuestro proyecto de investigación, iniciamos este proyecto centrado principalmente en la identificación de la citotoxicidad de dos especies de líquenes *Usnea* y *Ramalina*.

1.5. HIPÓTESIS

- Los extractos acuosos y etanólicos al 70% de las especies *Usnea spp* y *Ramalina* de la comunidad de Pacca del distrito de Anta-Cusco, presentan alta citotoxicidad y su principal metabolito es el ácido úsnico

CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL

2.1. VISIÓN HISTÓRICA

Durante el siglo XIX la liquenología alcanzó un rápido desarrollo, con un importante avance en lo concerniente a la descripción de géneros y de multitud de especies, tanto de Europa como de otros continentes. Uno de los principales artífices de esta labor fue el finlandés Nylander, que desarrolló parte de su trabajo en París y describió unas cinco mil nuevas especies. Los líquenes son ya un grupo vegetal bien establecido y se consideran con la misma categoría que las algas o los hongos en los sistemas de clasificación. Sin embargo, el concepto del grupo cambiará a lo largo del siglo (11).

En 1867 y 1869 el suizo Schwendener demostró, en unos meticulosos experimentos, la doble naturaleza de los líquenes, conformados por la unión de un alga y un hongo. (11)

Se considera que existen entre 13.500 y 17.000 especies de hongos liquenizados pertenecientes a más de un millar de géneros, que se asocian con unas cien especies de fotobiontes pertenecientes a menos de cuarenta géneros. (11) Sin embargo, solo tres géneros de fotobiontes, *Trebouxia* y *Trentepohlia* entre las algas verdes, y *Nostoc* entre las cianobacterias, suministran el simbiote a la mayoría de los líquenes, de manera que la misma especie de alga puede repetirse en líquenes muy diferentes. Por otra parte, aunque las algas liquenizadas están todavía poco estudiadas, se conocen casos en los que el mismo hongo puede asociarse con distintas especies del mismo género de fotobionte sin que se aprecien diferencias en la morfología del líquen. (11)

El líquen se puede hallar en una diversidad de sustratos, lo que los hace duraderos y estables en la superficie. Los sustratos más comunes incluyen rocas, árboles, madera, tierra, el exoesqueleto de ciertos invertebrados, caparazones de tortuga e incluso materiales artificiales como vidrio, cuero, hierro, asbesto, cemento, o ladrillos. De acuerdo con esta condición, los líquenes se han clasificado en cortícolas (sobre

cortezas de árboles y arbustos), musícolas (crecen sobre musgos), terrícolas (crecen sobre el suelo), folícolas (crecen sobre hojas, típicos de ambientes tropicales), saxícolas (crecen sobre piedras y rocas) y liquenícolas (sobre otros líquenes) (9)

2.2. ANTECEDENTES DEL ESTUDIO

2.2.1. Antecedentes internacionales

Cabrera Romero, Jessica Valeria y Vargas Espinoza, Elizabeth del Carmen (2018), “Estudio fitoquímico de liquen *Thamnolia vermicularis* (Sw.) Ach. ex Schaer) presente en la provincia del Azuay, Cuenca”-Ecuador. (2)

El objetivo de este trabajo fue estudiar la *Thamnolia vermicularis* encontrada en la provincia del Azuay como fuente de compuestos antibacterianos y antifúngicos, fueron recolectadas en el Parque Nacional Cajas, Región Tres Cruces. Se utilizó biomasa liquénica, presecada y realizada en polvo, para la determinación de la actividad antibacteriana en disolventes de polaridad aumentada: hexano, cloroformo, acetato de etilo y metanol, mediante extracción Soxhlet. Se utilizó la prueba cromatográfica biológica, que tiene como objetivo evaluar la actividad antibacteriana de grupos de compuestos separados por cromatografía. Se realizaron pruebas de actividad antimicrobiana contra los patógenos humanos *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y los hongos ambientales *Penicillium crysogenum* y *Aspergillus fumigatus* comparando con la prueba de difusión en agar con extractos totales. Se demostró una actividad antibacteriana moderada de los extractos de *T.vermicularis*, en comparación con la inactividad de los biomarcadores desarrollados. Estos resultados indican que los compuestos producidos por el metabolismo del liquen en experimentación tienen su acción antibacteriana frente a actividades sinérgicas, por lo que la deslindación cromatográfica produce a una extracción de exportación infructuosa. (2)

Rodríguez Oscar E, Andrade William, Díaz Fabio y Moncada Bibiana, “Actividad antimicrobiana de líquenes de la cuenca alta del rio Bogotá” (12)

El objetivo de este trabajo fue obtener la efectividad antibacteriana de extractos de distintas especies polares de *Everniastrum columbiense*, *Flavopunctelia flaventor*, *Parmotrema simulans*, *Ramalina celastri*, *Teloschistes exilis*, *Usnea sp.* Que fueron recolectados al otro lado del borde occidental de la cima de la cuenca de río Bogotá, contra bacterias *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae*. Los materiales y métodos utilizados fueron la difusión en gel perforado. Como resultado, los extractos de *Flavopunctelia flaventor*, *Everniastrum columbiense*, *Parmotrema simulans*, *Usnea Sp* y *Ramalina celastri* mostraron actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* y extracto de *Flavopunctelia flaventor*, *Usnea Sp.* y *Ramalina celestri*, mostraron efectividad antibacteriana contra *Klebsiella pneumoniae*. (12)

Jaramillo Ordoñez, Cristhina (Ecuador, 2018). Evaluación de la actividad antifúngica del extracto de *Usnea laevis* en hongos fitopatógenos. (13)

El objetivo propuesto es determinar la eficacia antifúngica del extracto de líquen frente a hongos fitopatógenos. La actividad antifúngica in vitro de estos extractos se ensayó contra géneros de hongos patógenos de plantas anteriormente sustraídos (*Aspergillus*, *Penicillium* y *Rhizopus stolonifer*); Se añadió al medio de cultivo agar patata dextrosa (PDA) a una concentración de 0,5%. Determine la tasa de inhibición. Los resultados se analizaron estadísticamente y los extractos se clasificaron según su tasa de inhibición según OILB. Los extractos metanólicos y etanólicos de *Usnea laevis* mostraron una mayor potencia contra *Rhizopus stolonifer*, inhibiendo más del 50% de su crecimiento, en contraste con *Penicillium* y *Aspergillus*, que tuvieron proporciones de inhibición mucho más bajas y mostraron significancia estadística diferencial. El extracto de líquen es ligeramente tóxico para *Rhizopus stolonifer*, levemente tóxico para *Aspergillus sp 1* y *Penicillium sp*, e inofensivo para *Aspergillus sp 2*. En conclusión, se encontró que el extracto de *Usnea laevis* tiene una mayor actividad in vitro contra *Rhizopus stolonifer*, inhibiendo más del 80% de su crecimiento. Se considera ligeramente tóxico para esta especie. El extracto metanólico de *Usnea laevis* demostró una gran diferencia significativa en el porcentaje de inhibición de *Aspergillus sp*, *Penicillium sp* y *Rhizopus stolonifer*, en comparación con el extracto etanólico.

Mora Recinos, P. Actividad biocida y estudios de toxicidad de extractos de cianobacterias que se encuentran sobrepoblando el lago de Atitlán Universidad De San Carlos De Guatemala, 2012. (14)

El objetivo de este proyecto fue determinar la actividad biocida y la toxicidad de extractos de cianobacterias que se encuentran sobrepoblando el lago de Atitlán. Como muestra se tuvo extracto de cianobacterias colectadas del lago de Atitlán. La metodología fue Las muestras fueron recolectadas en bolsas herméticas, utilizando medias de nylon con poros de diámetro 0.5mm, asegurando el muestrear únicamente las manchas verdes o verdes-azules observadas en la superficie del Lago. La toma de muestra se realizó a varios metros de la orilla 43 del lago en los poblados de San Pedro la Laguna y San Buenaventura (Panajachel); además se muestreó el centro del lago. Se preparó una concentración del extracto a ensayar de 1 mg/ml con agua destilada, como control negativo se utilizó agua salvavidas y como control positivo se utilizó Paraquat en 44 concentraciones de 40, 4, 0.4, 0.04, 0.004, 0.0004 mg/ml; cada una de las muestras con 5 réplicas ($p = 0.05$). como resultado: El test de *Allium cepa* permitió la evaluación de la actividad citotóxica y genotóxica del extracto etanólico en estudio frente a ápices de cebolla con 48 horas de tratamiento en agua. En la tabla 3 se puede observar que el extracto no presentó diferencia significativa con respecto al control negativo ($p > 0.05$), indicando que no presenta actividad citotóxica pues se obtuvo un alto porcentaje de crecimiento (94.5%): Se puede observar que el extracto presentó actividad citotóxica menor a 2 mg/ml, por lo que se realizó nuevamente la prueba utilizando concentraciones de 1.0, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 y 0.03125 mg/ml, para obtener a través del programa Finney la concentración letal media (CL_{50}), la cual fue de 0.84 mg/ml. Para validar este método se utilizó como control positivo, Furosemida, y se obtuvo una CL_{50} de 0.72 mg/ml.

Rodríguez Romero, et al. Índices de germinación y elongación radical de *Lactuca sativa* en el biomonitorio de la calidad del agua del rio Chalma, Instituto Politécnico Nacional, México, 2014. (15)

El objetivo de este proyecto incluye evaluar la toxicidad a través de la biología con *Lactuca sativa* establecer un índice biológico que permite conocer y evaluar las condiciones contaminadas de esta agua del río. Los resultados se han

analizado con métodos multivariados: analizando los componentes y similitudes principales. Tres áreas se han distinguido por la proporción de toxicidad obtenida: los primeros tres sitios de investigación presentaron valores de toxicidad positivos y bajos, con altas concentraciones de nutrientes, la parte promedio está representada por la página la cuarta web, ha ganado el índice de extensión exhaustivo más bajo. Una parte inferior del río, hay índices que han clasificado esta área con una toxicidad moderada baja. Finalmente, el índice de ingresos muestra que la sensibilidad de la germinación del bioensayo de la partícula sativa ha creado reacciones biológicas integradas. Esta información se puede utilizar para evaluar los riesgos genéticos biológicos. La integración de varias reacciones biológicas se observó en bioensayo de *Lactuca Sativa* identificó tres áreas en el río Chalma.

Navarro Guarachi, E. Determinación de la actividad leishmanicida, tripanocida in vitro y valoración de la toxicidad aguda del ácido úsnico in vivo, Universidad Mayor de San Andrés, 2010. (16)

Se evaluó la actividad bactericida y tripanosómica de *Leishmania* y la toxicidad aguda del ácido úsnico (C₁₈H₁₆O₇). Se cree que este metabolito secundario extraído del *liquen Usnea spp*, recolectado en la ciudad de Pasaña (Oruro, Bolivia) tiene muchos usos medicinales como antibacteriano y antifúngico. Las actividades bactericidas de *Leishmaniasis* y tripanósidos se evaluaron in vitro mediante el método XTT (2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) -2-H-tetrazolio-5-carboxanilida), utilizando el método colorimétrico, medir la movilidad. Se encontró que el ácido úsnico es 10,3 µg / ml más activo contra *L. braziliensis* IC en comparación con *L. amazonensis* y *L. donovani* IC₅₀ fueron 86,5 y 92,4 µg/ml, respectivamente. Se utilizó anfotericina B como control positivo, CI₅₀ 0,2 µg / ml. Los resultados fueron significativos (P <0,05). En la actividad del tripanosoma, el ácido úsnico mostró una IC de 95,2 mcg/ml en comparación con una IC de 3,25 mcg/mL de bisnidazol, (P<0,05). Se realizó un estudio tóxico agudo en ratas albinas suizas hembras, y la dosis letal media (DL₅₀) se determinó por el Método Matemático Red Muench y el método gráfico Probet, la administración de (DL₅₀) fue de 798,47 mg/kg y 776,25 mg/kg usando dosis de 2000 mg/kg, 1000 mg/kg, 775 mg/kg, 662 mg/kg, 550 mg/kg, 175 mg/kg administración GI, observada durante 14 días.

Causil V. et al. Efecto citotóxico del hipoclorito de sodio (NaClO), en células apicales de raíces de cebolla (*Allium cepa*.) Colombia, 2017. (17)

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto citotóxico del hipoclorito de sodio (NaClO) en células apicales de raíces de cebolla (*Allium cepa* L.). Se prepararon cinco soluciones de hipoclorito de diferentes concentraciones más una solución control con tres replicas para cada tratamiento, se midió el crecimiento de las raíces durante tres días, se cortaron los ápices sumergiéndose en ácido clorhídrico, posteriormente fueron teñidos con Aceto-Orceína y se observaron al microscopio; se calculó el índice mitótico (IM) y se observaron las anomalías celulares (cromosómicas).

La concentración donde se presentó un mayor IM fue de 1 ppm. Se evidenciaron las anomalías celulares: En anafase, evidenciando puentes entre cromosomas, metafase. Los resultados evidenciando que *Allium cepa* es una especie que ofrece un modelo experimental para evaluar el efecto citotóxico, en este caso del hipoclorito de sodio, el cual generó anomalías celulares (cromosómicas) en todas las concentraciones. (17)

2.2.2. Antecedentes Nacionales:

Vaca Meza, E. Evaluación de la toxicidad en *Artemia salina* del extracto acuoso de las hojas de *Piper aduncum* L. Universidad Nacional de Trujillo; 2019. (18)

El propósito de la investigación es evaluar la toxicidad de las partes diluidas obtenidas del extracto acuoso de las hojas de *Piper aduncum* L. (matico) de la provincia de Cachicadan. En esta investigación, se seleccionaron hojas de *Piper aduncum* L. para probar la eficacia de desintoxicación de la solución salina de nauplios de *Artemia salina* de soluciones diluidas de los extractos en concentraciones 5000, 312.5, 78.1, 19.5, 4.88 µg/ml según el método de Miller y Tainter. Nobles después de 24 horas. Por tanto, la CL₅₀ del extracto acuoso de hojas de *Piper aduncum* L fue de 2751,11 µg/ml. Se ha demostrado que el extracto acuoso de las hojas de *Piper aduncum* L (Matico) en larvas de *Artemia salina* es relativamente inofensivo o no tóxico.

Bardales Chávez, Sandra; Lozano Ciudad, Gladys “Evaluación de la citotoxicidad del extracto acuoso de *Ambrosia arborescens* Mill, sobre células meristemáticas de *Allium cepa*”. Universidad Nacional de Trujillo; 2019. (19)

El objetivo de este estudio es determinar la citotoxicidad del extracto de hoja de *Ambrosia Arborescens* Mill. 'Marco' en células de meristemo de *Allium cepa*. La encuesta se determinó al azar y se evaluaron 9 tratamientos. Un control que contiene agua destilada y ocho controles de eficacia 0,06%, 0,12%, 0,25%, 0,5%, 1%, 2%, 4% y 8% durante 48 y 72 horas, respectivamente. Se estimuló el crecimiento de raíces jóvenes, y luego se sometió a tratamientos relevantes de acuerdo con el patrón de investigación establecido. Los resultados mostraron una disminución en el crecimiento radicular de T4 a las 48 y 72 h cuando alcanzaron mínimos significativos y máximos significativos de T9 a 0.24 cm y 0.14 cm, respectivamente. En el índice mitótico los porcentajes variaron del 41,91% (T1) al 17,04% y del 29,418% (T1) al 17,745% (T6) a las 48 y 72 h, respectivamente, los niveles observados disminuyeron significativamente. El índice de axioma aumentó 77,05% (T1) a 100% en T4 a las 48 horas y disminuyó significativamente en T6 a las 72 horas, con una puntuación de 93,75% en comparación con T1 al 100%. (19)

Mamani Quispe, Denise “Efecto de cuatro concentraciones del extracto acuoso de hojas y flores de *Brassica rapa* L. En el ciclo celular de meristemas radiculares de *Allium sativum* L.” Universidad Nacional del Altiplano- Puno, 2017. (20)

Los objetivos de la investigación fue deslindar la calidad de los fitoquímicos de la calidad de los alcaloides, fenol, taninos y carbohidratos en los extractos de agua de hojas y flores de mostaza (*Brassica Rapa* L.) y determinan efectivamente el efecto del extracto de *Brassica de Rapa* L. en la concentración de 1%, 30%, 50% y 100% para el ciclo celular de meristemas radiculares del ajo (*Allium sativum* L). Se realizan los métodos, almacenados en extracto de agua a una velocidad de 1%, 30%, 50% y 100% de las hojas y flores de mostaza, se han obtenido en el estado de transmisión en un litro de agua; En el análisis fitoquímico cualitativo, se aplica el método de color de identificación de

alcaloides, fenol, taninos y carbohidratos; Los efectos del extracto de agua en el ciclo celular de asimilación, raíces de ajo (*Allium sativum* L.). Los resultados son los siguientes: Que el extracto de agua de mostaza se caracteriza por el alcaloide más alto, el fenol, el contenido de tanino y las líneas reductoras, en comparación con las flores, también determina que los tipos de índice mitótico han disminuido mientras que aumentan la extracción, llegando a la extensión de la extensión. Ciclo celular en 51 y 92 minutos con concentración de hojas de 50 y 100% de mostaza, relacionadas con el tratamiento controlado. (20)

Espinoza Quintana, Cinthia; Martinez Huaroc, Rosa. “Evaluación de la toxicidad aguda producida por amoxicilina, dexametasona y diclofenaco, en *Lactuca Sativa*” Universidad Privada de Huancayo Franklin Roosevelt, 2016. (21)

El propósito de este trabajo fue evaluar la toxicidad aguda de amoxicilina, dexametasona y diclofenaco a diferentes concentraciones sobre *Lactuca sativa* (lechuga) y semillas en diferentes placas de Petri durante 120 ha 185°C. Se observa crecimiento de hipocotilo. Para la obtención de los resultados se utilizó el método estadístico Probit, se encontraron la concentración inhibitoria media (IC₅₀) y la concentración letal media (CL₅₀), y estos parámetros se utilizaron para determinar la toxicidad aguda en otras investigaciones, las cuales son parte de nuestra historia. En los resultados se observó una inhibición por la toxicidad producida por los fármacos amoxicilina, dexametasona y diclofenaco. En enfoque mínimo. (21)

Callupe Vargas, Natalie. “Determinación de la toxicidad en suelos contaminados por hidrocarburos mediante bioensayos con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.), cebolla (*Allium cepa* L.) Y rabanito (*Raphanus sativus* L.)” Universidad Nacional de la Selva, Tingo María, 2018. (7)

El objetivo del estudio es determinar la toxicidad en suelos contaminados con hidrocarburos mediante ensayos biológicos en semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.), rábano (*Raphanus sativus* L.) y cebolla (*Allium cepa* L.). El experimento se realizó colocando una placa de papel de filtro en cada placa de petri, luego de lo cual se marcó cada placa con la dilución correspondiente del extracto de hidrocarburo, así como la fecha de la prueba biológica; luego, el

papel de filtro se satura con 3 ml de diluyente, lo que evita la formación de bolsas de aire. Este paso se repitió para cada una de las siete concentraciones preparadas con extracto de suelo. El resultado fue un alargamiento bajo potasio en los tres cultivares. Cuando se incrementaron las concentraciones de hidrocarburos en lechugas, cebollas y rábanos, se demostró inhibición. En las cebollas, además de inhibir la germinación y el crecimiento de las raíces, también existe un efecto inhibitor sobre el crecimiento del hipocotilo. Estos resultados confirman que durante el período de germinación y los primeros días de crecimiento de las plántulas ocurren una serie de procesos fisiológicos en los que la presencia de una toxina puede interferir, perjudicar la supervivencia y el crecimiento normal de las plantas. (7)

Marino E. Determinación de la diversidad de líquenes saxícolas de tres sitios arqueológicos de Cajamarca, Universidad Nacional de Cajamarca, 2016. (22)

El objetivo principal del estudio fue realizar un inventario y determinación taxonómica, a nivel del género y especie de Liqueen Saxícola en tres sitios arqueológicos de Cajamarca: Cumbemayo, Santa Apolonia y Ventanillas de Otuzco, de 2010 a 2015.

El sitio arqueológico de Cumbemayo presenta la mayor diversidad de líquenes saxícola, con un total de trece especies. La especie *Dyctionema glabratum* se encuentra principalmente en Cumbemayo y la especie menos densa en este sitio es *Lepraria sp*, seguida de Ventanillas de Otuzco con 5 especies y Santa Apolonia con 3 especies. Se encuentran especies del género *Parmelia*, seguidas de *Dyctionema glabratum* y *Candelariella vitellina* con mayor abundancia en el sitio arqueológico de Cumbemayo. Así, se observó una menor densidad de conjuntos de líquenes en los tres sitios arqueológicos evaluados. (22)

Velasco Salazar, Narda J. Aislamiento y elucidación estructural de los metabolitos bioactivos del liquen *Usnea aurantiacoatra* y su actividad antibacteriana, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Escuela Profesional de Química, 2020. (23)

El presente trabajo describe el aislamiento y elucidación estructural de los metabolitos secundarios, que presentan actividad antibacteriana, de los

extractos del líquen *Usnea aurantiacoatra*. A partir de 600 g de muestra limpia y seca se realizaron extracciones con los solventes diclorometano, acetona y metanol a temperatura ambiente, obteniéndose tres extractos a los cuales se les realizaron las separaciones y purificaciones mediante técnicas cromatográficas en capa delgada y columna, obteniéndose cada vez sustancias de mayor pureza. y a todos los extractos provenientes del fraccionamiento se realizaron ensayos de evaluación de actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* empleando el método de difusión de discos y posterior elucidación mediante técnicas espectroscópicas RMN 1H, UV e IR. Se elucidaron los siguientes compuestos: (+) R-ácido úsnico (C1), peróxido de ergosterol (C2) y tentativamente el ácido 2,3,5-trihidroxitereftálico (3.2 b). Según los resultados los compuestos C1 y 3.2 b, pueden ser considerados como potenciales bioactivos frente a *S. aureus*, debido a que muestran actividad a concentraciones muy bajas. (23)

Popovici Violeta, et al. Evaluación de la actividad citotóxica del extracto seco de la *Usnea Barbata*. (24)

Los líquenes han demostrado ser fuentes prometedoras de medicamentos contra el cáncer; uno de los más importantes es el ácido úsnico, que es un compuesto fenólico con estructura de dibenzofurano. El objetivo del presente estudio es la evaluación de la actividad citotóxica del extracto seco de acetona (UBE) de *Usnea barbata* (L.) FH Wigg. En primer lugar, se evaluó la acción citotóxica de UBE utilizando la prueba Brine Shrimp Lethality (BSL); se obtuvo un efecto letal significativo después de 24 h de tratamiento a las altas concentraciones de UBE utilizadas, y fue cuantificado por la alta tasa de mortalidad de las larvas de *Artemia salina* (L.). En segundo lugar, se evaluó la citotoxicidad in vitro de UBE en carcinoma de células escamosas de lengua humana, utilizando CAL 27 (ATCC® línea celular CRL-2095™). Los resultados obtenidos se han informado con respecto al contenido de ácido úsnico de UBE, y los datos muestran que la muerte de las células CAL 27 fue inducida por apoptosis y alto estrés oxidativo. (24)

2.2.3. Antecedentes locales:

Mujica Ayala, Jhulyana M, alomares Pachecoc, Arian, Estudio etnobotánica, etnofarmacológico, Análisis fitoquímico y la determinación de la Bioactividad de plantas medicinales de la comunidad de Pampallacta, del distrito de Calca- Cusco, Perú, 2009. (25)

El objetivo principal, fue realizar el estudio etnobotánico, etnofarmacológico de plantas de gran interés medicinal, análisis fitoquímico cualitativo y se determinaron las 10 plantas medicinales más usadas por la comunidad. De acuerdo al estudio etnofarmacológico se describieron los usos medicinales de la especie en estudio, siendo las especies con mayor uso, las pertenecientes a la familia *Asteraceae*. Los pobladores describieron 38 afecciones que son tratadas utilizando plantas medicinales siendo la tos la afección que utiliza una gran cantidad de especies vegetales reportadas y la vía de administración más usada fue interna.

En el análisis fitoquímico cualitativo se usaron extractos metanólicos, acuosos clorofórmicos y acidulados de las 10 plantas más utilizados por los pobladores, en la que se efectuaron marchas fotoquímicas las q fueron sometidos a coloración determinándose la presencia de distintos metabolitos secundarios.

Como conclusión, se realizaron los estudios etnobotánico y etnofarmacológico de las plantas medicinales de la comunidad de Pampallacta llegándose a recolectar 65 especies vegetales para 33 familias con el cual se contribuye al inventario de una parte relevante del patrimonio cultural, además se efectuó el análisis fitoquímico cualitativo y la determinación de la bioactividad de 10 especies vegetales de interés medicinal más utilizada para dicha comunidad. (25)

Quispe Choquehuanca Lizeth, citotoxicidad y genotoxicidad de los alcaloides totales extraídos de la hoja de *Astragalus garbancillo Cav.* “Salcca salcca” en bioensayos. Cusco, Perú, 2019. (26)

El objetivo de este trabajo es estudiar la citotoxicidad y genotoxicidad de alcaloides totales en hojas de *astragalus garbancillo cav.* Aprobar exámenes de biología.

El resultado fue una CI_{50} (concentración inhibidora media) de 233,190 ppm de *Lactuca sativa*; 257,865 ppm para *Beta vulgaris* 636,634 ppm La toxicidad se expresa en unidades de toxicidad de 0,33 BTU, lo que indica que es ligeramente tóxico. También se encontró que los extractos producían efectos mutagénicos a altas concentraciones y tenían efectos inhibidores mitóticos. De ello se deduce que los resultados muestran que los alcaloides de A. El garbanzo es altamente antiproliferativo y el efecto sobre los cromosomas debilitados puede incrementarse en dosis altas y durante largos períodos de tiempo. Por lo tanto, los alcaloides *A. garbancillo* pueden considerarse seguros en dosis bajas. (26)

2.3. BASES TEÓRICAS CIENTÍFICAS

2.3.1. LÍQUENES:

2.3.1.1. DEFINICIÓN Y MORFOLOGÍA

Los líquenes pertenecen del Reyno Fungí, viven juntos con las algas estas perteneciente al Reino Protista también llamados micobiontes. (27)

En la parte crucial del caso, el micobionte es el representante de la formación del componente liquen conocido como talo. El tipo de algas que pasa a ser parte de los líquenes se llama fotobionte y realizan la fotosíntesis. Las diferentes clases de sitios de talo son la respuesta adaptativa del grupo de líquenes al medio ambiente. (27)

El liquen es un microorganismo que no tiene movilidad ensimismo en ni una parte de su periodo, por lo cual sus esporas se extienden por medio de las precipitaciones ambientales, sus talos están conformados por “un grupo de células originadas de una espora y que al separarse conforman una hifa (filamento de células fúngicas), el grupo de hifas forma una masa llamada micelio” (27)

2.3.1.2. COMPONENTES DE LA SIMBIOSIS

Hongos:

- La totalidad de estos adquieren convertirse en líquenes Ascomicetos.
- Evitan el estrés hídrico del alga y de los ambientes inadecuados para buena simbiosis.

- El hongo coopera la mayor parte de la biomasa. (27)

Algas:

- El 92% de los líquenes están constituidos por algas verdes habituales, y cianobacterias al 8%.
- Cuando el fotobionte logra un color azul; este dona al hongo macronutrientes y glucosa provenientes de nitrógeno, si este es alga verde le dona ridicol. Estos 2 productos cuando están dentro del hongo se convierten en alcohol.
- Proporcionan color a los líquenes: Trebouxia, Trentepho, Nostoc (27)

2.3.1.3. LIQUENIZACIÓN:

- Es la adherencia entre las paredes de los hongos y algas.
- Inserción entre células del agua por medio de haustorios emitidos por el hongo. (27)

2.3.1.4. TIPOS DE TEJIDOS:

Los tejidos defectuosos se forman a partir de micosis fungoide, por entrelazado, ramificación, gelatinización o acumulación de hifas miceliales. Las formas y tamaños varían ampliamente, dejando espacio para plecténquimas.

La apariencia es generada por el micelio.

- Paraplecténquimas: están compuestos por filamento fúngico circulares, poderosamente unidas entre ellos.
- Prosoplecténquimas: están compuestos por filamento fúngico estiradas con pared bastante delicada y unidas de manera semejante.
- Aracnoides: protección de tejido filamento fúngico.
- Empalizada: Hifas pequeñas con células tubulares, semejantes entre ellas. (27)

2.3.1.5. ESTRUCTURA:

La particularidad de los líquenes es compleja en la estructura del nucleolo. (27)

- **Talos homómeros:** Las cianobacterias y los hongos se distribuyen uniformemente. Esto ocurre en líquenes pegajosos tales en *Collema*. Este componente accede absorber grandes cantidades de H₂O.
- **Talos semihomómeros:** son composiciones uniformes, el líquen está regulado por más de un córtex. La ricina que crece en el fondo ayuda a que se adhiera al sustrato.
- **Talos heterómeros:** Son los más populares, apilados en el interior. Tienen múltiples capas (corteza superior, estrato córneo, médula, corteza inferior) que consisten en diferentes tipos de pseudo-tejidos, en los cuales los hongos son tan grumosos que no pueden aislarse. Los fotones están completamente protegidos por la corteza cerebral y su grosor está asociado a la adaptación al medio; Por ejemplo, en lugares con mucha luz solar, la corteza cerebral es más gruesa. (27)

Por debajo de la corteza se separa la fotocélula, en este manto se da la unión con el hongo.

El núcleo ocupa una parte importante de la capa exterior, consta de células alargadas intercaladas con algodón y tiene huecos que facilitan la ventilación. Estas dos últimas capas son áreas donde se acumula más líquido.

La corteza inferior es igual a la corteza superior y las hebras todavía están oscurecidas principalmente por el pigmento melanina. Hay talos donde esta categoría no existe. (27)

2.3.1.6. TIPOS DE LÍQUENES:

- A. **Formas crustáceas:** Permanece fuerte con el sustrato y, por lo tanto, es poco probable que se desintegre sin eliminar el talco o parte del sustrato. Este tipo de líquen no tiene una corteza inferior, su aumento es de varios milímetros por año. (28)
- B. **Formas foliáceas:** De forma similar a las hojas, con tallos aplanados y lobulados. Todavía están parcialmente adheridos al sustrato, por lo que se pueden eliminar intactos del sustrato. Además, estos líquenes extraen agua tanto del sustrato como de la atmósfera. (28)

C. **Formas fructuosas:** Son líquenes tupidos, espinosos, en bandas o tubulares que se adhieren al sustrato y se ramifican apicalmente. Se destacan del sustrato y pueden estar erectas o suspendidas y crecen entre 1 y 2 cm por año. Sus pecíolos, a diferencia de los que tienen hojas, muestran simetría radial, lo que hace imposible distinguir entre la corteza inferior y superior. Está sujeto a la humedad relativa del aire para poder humedecerlo. (28)

2.3.1.7. ÓRGANOS APENDICULARES:

- ❖ **Pelos:** Se forman a partir de los extremos libres del micelio de la corteza cerebral o médula. Se utilizan para retener la humedad. A menudo aparece en los líquenes de las hojas. (27)
- ❖ **Cilios:** Prolongación fúngica del perfil de arriba. Sirven para retener agua. (27)
- ❖ **Ricinas:** Se parecen a vellos. Conformadas por hifas del hongo vigorosos compactos. (27)
- ❖ **Cifelas y pseudocifelas:** Ejecutan la compensación de gases. (27)
- ❖ **Cefalodios:** Ayudan a que el N se fije. (27)

2.3.1.8. REPRODUCCIÓN:

A. **Asexual:** Ocurre debido a la fragmentación de los líquenes. En la propagación de líquenes, los dos simbiontes funcionan como dos unidades independientes y desprendibles de talo, promoviendo así la dispersión de líquenes y actuando como organismos migratorios vegetativos. Los simbiontes más comunes son: (29)

- ✓ **Soredios:** Algunas células del PV, rodeadas por una capa suelta de hongos, de más de 50 micrones de longitud, se forman como harina, a medida que la cáscara se separa y brotan los brotes. (29)
- ✓ **Isidios:** Las extensiones de diversas formas que surgen de la superficie superior del tallo pueden ser cilíndricas, esféricas o caraloides; Se separa fácilmente del talo. La corteza se

desarrolla (yemas), donde entran los hongos y las esporas, y cuando los brotes se separan, actúan como semillas. (29)

- ✓ **Esquizidios:** Se producen desde el fragmento superior de la raíz con escamas, córtex y capa fotobionte. (29)
- ✓ **Blastidios:** Son yemas con falso córtex y se originan en los dos de la raíz. (29)

B. **Sexual:** Los hongos pueden hacer esto, porque las algas simbióticas se reproducen solo vegetativamente. Siguen una composición y proceso similar, en la multiplicación de hongos. Fungicida perenne de litio. En los líquenes de los crustáceos se encuentran pequeños granulomas alargados, con un himen en forma de hendidura (lirelas).

También hay una regulación del recubrimiento en forma de uña, en la que se observa una masa de esporas secas en la punta (macedonio). (29)

2.3.1.9. ECOLOGÍA:

Son organismos que se adecuan en diferentes ambientes, una de las particularidades es la sensibilidad a los cambios climáticos.

Son muy cosmopolitas, pueden sobrevivir en cualquier lugar; aunque son muy sensibles a la contaminación. Se pueden caracterizar según el lugar donde se originan: (29)

- Saxícolas: En rocas.
- Cortícolas: En las cortezas de los árboles.
- Lignícolas: En madera.
- Terrícolas y humícolas: En tierra y humus

2.3.1.10. CRECIMIENTO:

Su crecimiento es muy tardío a causa de dos condiciones:

- **Agua:** Patrón fundadamente para el desarrollo del alga.
- **Luz:** La luz es primordial para el crecimiento. (29)

2.3.2. USNEA

2.3.2.1. Clasificación botánica

Figura 1. *Usnea sp.*



Fuente: Auñez Zapata, 2013 (30)

Reino: *Fungi*

División: *Lichenes*

Clase: *Ascolichenes*

Familia: *Usneaceae*

Género: *Usnea*

2.3.2.2. Descripción botánica

Tiene talos fruticulosos de color amarillo verdoso. Ramas cilíndricas o angulares, con eje central flexible. Soralius e Isidius son habituales. Photopoint: clorofila. apotecios lecanorinos, con un disco verde pálido y bordes fibrosos. Esporas de semillas simples y solubles. (31)

2.3.2.3. Características fisicoquímicas

Quinonas, triterpenoides y esteroides y en menor cantidad fenoles, taninos, grasas y aceites, lactonas y cumarinas, azúcares reductores y flavonoides (32)

2.3.2.4. Hábitat

Viven en condiciones con cierta cantidad de humedad del aire y suficiente iluminación. En general, se trata de especies con características pronunciadas

en cuanto a calidad del aire y ecología, por lo que suelen estar ausentes en zonas de influencia humana. (33)

2.3.3. RAMALINA

2.3.3.1. Clasificación botánica

Figura 2. *Ramalina*



Fuente: Auñez Zapata, 2013 (30)

Reino: *Fungí*

División: *Ascomycota*

Clase: *lecanoromycetes*

Familia: *ramalinaceae*

Género: *ramalina*

2.3.3.2. Descripción botánica

Talo, arbusto con crecimiento raramente secundario, de hasta (7-15) cm de altura, templadamente con ramas desde segmentado. Las ramas son fuertes, fustes, planos a sutilmente acanalados, superficie superior de las ramas jóvenes lisa, tiene rugosidad longitudinal de tejido cartilaginoso Regular en ramas gruesas, superficie gris verdosa, lisa, brillante, sin coriocarcinoma, lineal, numerosas laminarias y pseudoquistes raros, a veces con flecos, a menudo planos o ligeramente cóncavos, con filamentos cartilaginosos continuos, lisos o lisos, nunca formando filamentos. (34)

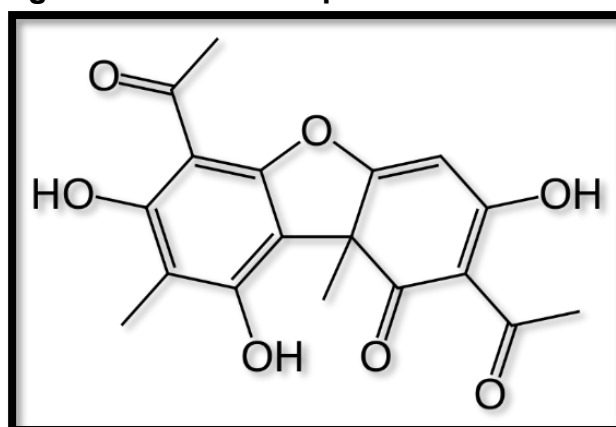
2.3.3.3. Hábitat

Esta especie está ampliamente distribuida en varios ambientes templados y tropicales del hemisferio sur, particularmente las Américas, con presencia en el sur de América del sur, el caribe, Asia, Australia y el este de África (35).

2.3.4. ÁCIDO ÚSNICO

Entre los líquenes, el ácido úsnico es el más estudiado porque contiene isómeros ópticos que también tienen un efecto antibacteriano de amplio espectro frente a neumococos, estreptococos y estafilococos. Tiene acción antibiótica contra varias tipologías de *Mycobacterium*. Asimismo, es posible aumentar el espectro antibacteriano de estos ácidos en un amplio rango mediante la obtención de derivados. Este ácido es un compuesto común en los líquenes y los compuestos varían de acuerdo a la especie. (36)

Figura 3. Estructura química del ácido úsnico



2.3.5. CITOTOXICIDAD

FUNDAMENTO: Este es un estudio que se puede utilizar en cualquiera de las siguientes situaciones: muerte celular o metabolismo alterado. Existen ensayos útiles para determinar la citotoxicidad, que se utilizan ampliamente debido a su bajo costo, facilidad de cuantificación y reproducibilidad. Gracias a este tipo de pruebas, es posible determinar la capacidad citotóxica de compuestos de interés, que pueden tener aplicaciones terapéuticas en el futuro. (37)

El estudio de citotoxicidad se concreta como una modificación de las funciones celulares que consiste en producir alteraciones y que esto puede ser descubierto. (38)

Los ensayos de citotoxicidad constituyen mecanismos de detección por varios mecanismos celulares conocidos y responden interfiriendo con estructuras y propiedades esenciales para la supervivencia, proliferación y función celular. Entre estas pruebas, descubrieron la integridad de las membranas y las células, el metabolismo, la síntesis y degradación, la liberación de componentes o productos celulares, la regulación de los iones y la división celular. (39)

Los líquenes presentan una amplia distribución en la naturaleza y son capaces de crecer en regiones en las que no podrían crecer los simbioses por separado. Los metabolitos secundarios ayudan a los líquenes a protegerse de las condiciones ambientales adversas y se ha demostrado que estos metabolitos presentan un amplio espectro de actividades biológicas, incluida la actividad antitumoral. Algunos de los mecanismos moleculares por los que los metabolitos secundarios ejercen actividad citotóxica son la regulación del ciclo celular, la inducción de la muerte celular apoptótica, la modulación del sistema inmune y la inhibición de la angiogénesis. El ácido úsnico es el metabolito secundario de los líquenes más estudiado. Una de las principales limitaciones del uso de los líquenes en la medicina moderna es su lenta tasa de crecimiento en la naturaleza. Además, es complicado mantener la simbiosis *in vitro*. En este trabajo se estudia algunos metabolitos secundarios que han demostrado actividad antitumoral y las posibles formas de obtenerlos a gran escala, así como los factores que influyen en su producción. (40)

2.3.5.1. Ciclo celular

Presenta una serie de eventos que suceden cuando el período en que una célula ha terminado de clasificarse, hasta el periodo en que vuelve a dividirse (41)

Existen dos grandes tipologías de células en las composiciones pluricelulares: (germinales y somáticas). Las células germinales son las que originan gametos, en cambio las somáticas no producen, La diferencia es significativo porque las células germinales dan lugar a un proceso conocido meiosis, por lo que se obtienen cuatro gametos haploides a partir de una célula diploide. Las células somáticas que proliferan terminan su ciclo celular fraccionándose y cambiándose en dos células hijas con la misma dotación genética que su antecesora por un proceso conocido de mitosis. (41)

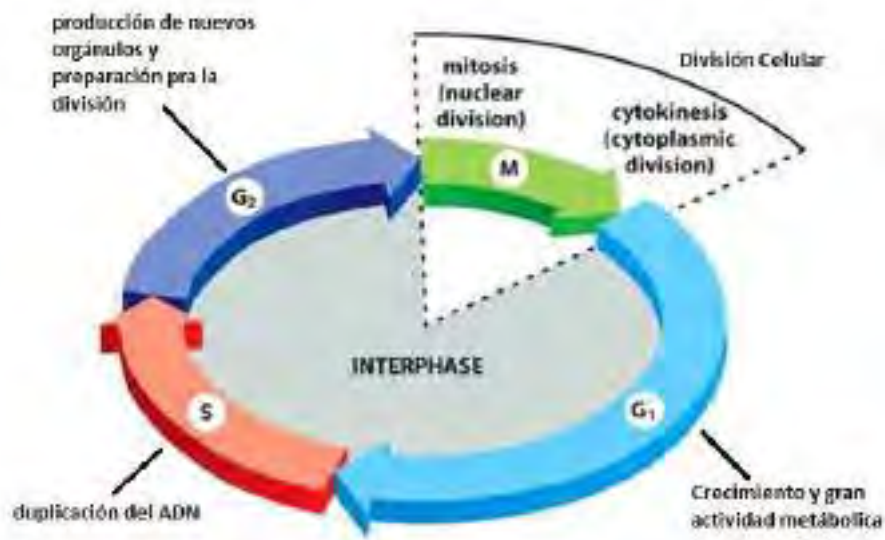
El ciclo celular de diferentes tipos de célula dentro de un tejido debe ser potencialmente registrado y coordinado. Si ocurre una división y proliferación

adecuada, la célula eucariota debe proceder un adecuado programa genético, en donde hace que pase por varias fases y culmina en la división celular. (41)

2.3.5.1.1. Fases del ciclo celular

Este ciclo se clasifica en dos etapas principales: La interfaz celular o preparación para la división celular y el material genético y la división celular (fase M), que es cuando ocurre este proceso. (42)

Figura 4. Fases del ciclo celular



Fuente: Megias, Mea. (2017) (41)

El estudio de interfase, se clasifica en tres fases, G₁, S y G₂, en cambio la división celular se divide en dos, mitosis y citocinesis. (41)

A. Subetapas de la interfase:

- G₁: La etapa de desarrollo y diferenciación celular, seguida por un incremento en la actividad metabólica, En esta fase se reproducen los organelos celulares y es la subetapa más extensa de la interfase.
- S: La fase corta que se da al final de la interfase, donde la célula cesa de su acción normal y duplica su material hereditario.

- G2: La última subetapa de la interfase y persiste un prolongado tiempo en la célula y se alista para la división celular: se subsanan los posibles errores de la duplicación del ADN y se producen proteínas y otros componentes que son útiles para realizar la división. (41)

B. Subetapas de la división celular:

- * **Mitosis:** La subetapa de la división celular donde se fracciona el núcleo, su función procede a un reparto equitativo del material hereditario.
- * **Citocinesis:** (o citodiéresis) Es la subetapa con que termina la división celular y consiste en la repartición del citoplasma y los orgánulos celulares para la formación de dos células hijas. (41)

a) Mitosis y sus fases

Durante la mitosis la célula procede varios procesos bien caracterizados durante el proceso que ocurren la segregación del material genético nuclear. Por sus particularidades las etapas de la mitosis son divididas en profase, metafase, anafase y telofase. (43)

- I. Profase:** Dentro del núcleo, la cromatina se condensa. Los cromosomas se replican y se unen al centrómero (cromátidas). La envoltura nuclear se desintegra en el citoplasma, los centrosomas se activan y migran hacia los polos celulares y las fibras del "huso mitótico". (43)
- II. Metafase:** Las fibras del huso se encuentran en el centro de los cromosomas en estructuras especializadas llamadas cinetocoros. Hay un cinetocoro en cada cromosoma. Los cromosomas se mueven hacia la línea media entre los dos centriolos. (43)
- III. Anafase:** El centrómero se rompe y las cromátidas se deslizan hacia polos opuestos en la dirección de los

centrómeros. Ahora que están separados, las cromátidas se llaman cromosomas. (43)

IV. Telofase: Los dos juegos de cromosomas alcanzan a los polos de la célula y comienzan a estirarse. La envoltura nuclear se forma alrededor de los cromosomas para formar el núcleo. Se produce la división celular (división celular) y dos células hijas idénticas se dividen. (43)

b) Citocinesis:

Al finalizar la telofasa comienza la formación del anillo contráctil para la división del citoplasma. El citoplasma se fracciona en dos partes mediante un anillo contráctil de filamentos de actina y miosina, el cual comprime a cada parte de la célula progenitora, dando una parte a dos células hijas, cada una de las células poseen un núcleo, Cuando una célula termina del ciclo celular tiene el desplazamiento de salir de él, se encuentra en una fase que es conocido como fase G. En esta parte las células están metabólicamente activas, pero no pueden dividirse, sin embargo, se ha reportado que una parte de estas células y sus precedentes pueden hacer meiosis como parte del proceso de regeneración tisular y desarrollo normal. (43)

2.3.5.1.2. Índice Mitótico:

Es la medida del porcentaje de células que se descubren en la fase M (mitosis) del ciclo celular en un tiempo prolongado y el apunte se ejecuta en preparados cromosómicos. El porcentaje puede verse alterado por compuestos que pueden interferir con la división celular ya sea por interacción directa con el ADN o por una variación de factores de regulación del ciclo celular. Esta prueba es altamente reproducible y sensible para la detección de agentes citotóxicos. (44)

2.3.6. Bioensayos

2.3.6.1. Definición

Los bioensayos son ensayos en donde un tejido vivo, una variedad de compuestos son empleados como agentes para descubrir la fuerza de distintas

sustancias fisiológicamente activa o de actividad desconocida, medir el grado toxicidad de distintos combinados y reconocer la sensibilidad de los diferentes géneros. Para establecer los mecanismos de diferentes efectos de compuestos ensayados. Así como establecer el límite de tolerancia de los organismos a diferentes sustancias. (45)

Procedimientos de ensayo ejecutados en dispositivos moleculares y móviles naturales así mismo como en organismos más complicados; con el único fin de conocer e indagar la presencia de varias pruebas de origen natural para descubrir efectos biológicos, esencialmente de clase citotóxico, antitumoral y anticancerígeno. (46)

2.3.6.2. Clasificación

Los bioensayos se dividen en: Pruebas in vitro y pruebas in vivo, ofreciendo su en diferentes mecanismos móviles u organismos de animales equitativamente. (46)

- A. **Bioensayo in vitro:** La expresión cultivo in vitro es una expresión estrechamente genérica donde se relata una técnica utilizada donde es el propio objetivo del procedimiento. En otros términos, exactos, in vitro quiere expresar "dentro de vidrio", quiere indicar, la siembra de flora o y sus partes (pero también de células y tejidos animales) dentro de recipientes de vidrio en situaciones de lugares vigilado. (47)

Los bioensayos in vitro se dividen en dos grupos:

- **Ensayos celulares:** El blanco de la experimentación es cualquiera de los mecanismos que forman una porción de la célula o línea celular que está siendo comprobado (membrana celular, mitocondrias, núcleo, etc.) (47)

- **Ensayo molecular:** El blanco son unidades subcelulares sencillas con ADN o ARN. (47)

- B. **Bioensayos en vivo:** Es determinada como los ensayos que poseen como blanco de experimentación organismos de animales que muestran

semejanza con células humanas en el cual se puede presagiar la actividad citotóxica de nuevas drogas descubiertas. (47)

2.3.6.3. Bioensayo con nauplios de *Artemia salina* Leach

La prueba con *Artemia salina* es usado desde 1982 se ha desarrollado bioensayos para determinar la citotoxicidad utilizando “camarones de mar” (*Artemia salina*); lo cual se son usados para el tamizaje tóxico de extractos debido a que presenta una buena correlación con la toxicidad in vitro, mostrando ser un método adecuado para identificar metabolitos secundarios con actividades biológicas. (48)

Dentro de las múltiples estrategias que se pueden utilizar para la selección de especies vegetales como fuentes de principios activos; el estudio de la letalidad que producen los extractos sobre larvas de *Artemia salina*, ha demostrado ser útil para tales propósitos para estudios farmacológicos. (48)

La determinación de la CL₅₀, se usa con el fin de descubrir los umbrales de toxicidad que es para ciertas sustancias, en la indagación fitoquímica valiéndose del principio, de que toxicología es farmacología en altos niveles o farmacología es toxicología a bajas variables esto puede ser correlacionado con la bioactividad del valor de la CL₅₀ o DL₅₀ y al mismo instante el valor de toxicidad.

Si cierta especie en estudio muestra una concentración letal media a una concentración menor del extracto, más potente es el compuesto activo en la planta. (49)

Los huevos de *Artemia salina*, han sido utilizados en varios sistemas de bioensayo, entre las aplicaciones se tiene: El análisis de residuos de toxinas, morfina, pesticidas, micotoxinas, fluidos, anestésicos, toxicología de dispersantes de aceites, carcinogénesis de ésteres y toxinas en un ambiente marino. (49)

Características del ensayo en *Artemia salina* Leach

- Es una prueba de bajo costo de citotoxicidad
- No se hace el uso de trabajo en condiciones estériles

- Es regularmente rápido.
- Fácil de ejecutar.
- Método sensible altamente reproducible, que requiere múltiples bajas.
- El almacenamiento de los quistes puede ser a una temperatura ambiente como mínimo 6 meses sin perder viabilidad.
- Demanda incubadora (25 °C).
- No se hace el uso de suero, como lo exigen otros ensayos de citotoxicidad.

2.3.6.3.1. *Artemia salina* Leach

Del griego *Artemia* que significa óptima conservación. La *Artemia salina* Leach se define como microcrustáceo cuyas larvas (nauplios) son sensibles a distintas diversidades de moléculas (en concentraciones bajas), por lo que se pueden medir fácilmente la toxicidad de extractos vegetales en forma rápida y simple. (50)

La *Artemia salina* que viven desde hace alrededor de 100 millones de años en la tierra, se adaptan a zonas donde existente sal. La cantidad alta de sal lo usan como barrera de protección frente a otros animales. (50)

Para revivirlos, se colocaron en agua de mar (hidratada) en recipientes cilíndricos para su posterior transporte aéreo, con una pequeña cantidad de huevos (aproximadamente 10 g de huevos por litro), encendidos (50 W) durante unos 10 min para estimular su actividad metabólica. Los huevos y las cáscaras sin desarrollar pueden dañar a los peces y crustáceos que los transportan. Por eso es importante encapsular las larvas (nauplios), para beneficiarse de su alimentación fotosintética (su afinidad por la luz) o cápsulas para diluirlas con productos químicos inocuos para las larvas. (50)

2.3.6.3.2. Aspectos morfológicos de la especie *Artemia salina* Leach

Es un pequeño crustáceo variable distribuido en el mundo y limitado a biotopos hipersalinos. En estas condiciones llega a desarrollar grandes densidades,

constituyéndose en el organismo zooplanctónico dominante. *Artemia*, en su ciclo de vida, presentación por lo general reproducción bisexual, dando lugar a dos tipos de huevos: Aquellos que consiguen el desarrollo embrionario totalmente en el interior del ovisaco y nacen directamente en forma de nauplios (modo reproductivo ovovivíparo) y aquellos que se cubren de un corión resistente, obtienen de la glándula de la cáscara, cuando esta se encuentra en su fase oscura y son emitidos por la hembra como "quistes (modo reproductivo ovíparo) El modo reproductivo ovovivíparo es empleado por *Artemia* para la obtención de nauplios, los cuales pasan por diferentes estadios de desarrollo: metanauplio, pre adulto y adulto. (50)

En tanto que el modo reproductivo ovíparo, es aprovechado para la obtención de quistes, los cuales, luego de eclosionar darán origen al estadio de nauplio, metanauplio, preadulto y adulto; completando su ciclo de vida. (50)

2.3.6.3.3. Posición taxonómica del género *Artemia salina Leach*

Phyllum:

Phyllum: *Artrópoda*.

Clase: *Crustácea*.

Subclase: *Branquiopoda*

Orden: *Anostraca*.

Familia: *Artemiidae*

Género: *Artemia Salina Leach*

2.3.6.3.4. Hábitat:

La *Artemia* está muy extendida en más de 300 lagos naturales o marismas saladas artificiales a nivel mundial. Las disparejas familias territoriales se adecuaron a situaciones en las que oscilan entre una temperatura (6-35 ° C) (25) El hábitat de *Artemia salina Leach* es en la región del Caribe y Sudamérica, principalmente costeros y estas incluidas aguas de alta clorinidad. La salinidad en que se encuentra la *Artemia salina Leach* presente de 40 a 300 g/L.

En el Perú ha sido reportada la presencia de *Artemia salina Leach* en nueve lugares diferentes a lo largo del litoral: salinas de Tumbes, Estuario del Virrila,

Salinas de Guadalupe, Chicama, Puerto Huarmey, Pampas de Salina, Pampa Playa Chica, Chilca y Caucato. (25)

2.3.6.4. Método de prueba o determinación de la concentración de medias letales CL₅₀ (51)

Hay varias formas de cuantificar y contrastar la toxicidad de distintos productos químicos y dosis. Una parte final es la concentración letal media, conocida como CL₅₀. Esta cifra representa que una determinada dosis es mortal para un cincuenta por ciento de los animales experimentales específicos. Mientras menos sea el CL₅₀ mayor es la bioactividad. (25)

La toxicidad de un extracto de una planta con *Artemia salina* Leach se expresa como CL₅₀ (concentración letal media) entre menor es la CL₅₀ (menor concentración del extracto) más potente es el compuesto activo en la planta. (25)

Para determinar la CL₅₀ como un paso principal es la contabilidad de las larvas se soluciona las matanzas por la fórmula de Abbott y paralelo damos uso a otra corrección donde se fundamenta el porcentaje de supervivencia de todos los organismos, la corrección se utiliza en diferentes medios encontrados. (25)

2.3.6.5. FÓRMULA DE ABBOTT:

$$\%mortalidad = \frac{\% \text{ de vivos en control} - \% \text{ vivos en tratamiento} = Y}{\% \text{ vivos en control}}$$

Para la determinación la CL₅₀ con 95% de confianza se ejecutan los métodos utilizados utilizan la técnica Probit, seguido por Finney.

El objetivo de estos tipos de estudios es calcular el nivel de estímulo que es importante en tener como resultado a una cierta cantidad de personas de la población. La cantidad de estimulación en que ocasiona un resultado en el 50% del sujeto de una cantidad bajo tratado es sustancial la cuantificación denotada como DL₅₀ por dosis letal media, CL₅₀ por concentración letal media, CE₅₀ por concentración efectiva media y por límite de tolerancia media). El turno predominado donde muestra la tentación tiene que ser detallado, de 24 h. DL₅₀, con el único propósito de comparar y apreciar la fortaleza relativa del estímulo.

La obtención del DL₅₀ requiere de estadística cuantitativa, que es importante para cambiar datos de resultados actualizados en Probit y las porciones administradas en datos logarítmicas. Hay cursos avanzados que determinan con exactitud los cálculos automáticamente, pero su confiabilidad tiene que ver mucho con la persona o institución que haya perfeccionado. (25)

2.3.7. Bioensayo en semillas

2.3.7.1. Fundamento

El fundamento para realizar esta clase de bioensayo comienza en la importancia para los sucesos de progreso temprano en el desarrollo y la supervivencia de las plantas. Es un ensayo paralizado donde se calcula la respuesta de un organismo vivo frente a una sustancia, es decir, nos ayuda a instaurar el efecto de los tóxicos en el crecimiento radicular y el avance de la semilla a diferentes niveles de compuestos tóxicos. (7)

La valoración del efecto en la elongación de las radicales y del hipocótilo accede a probar la reacción venenosa de sustancias solubles que están concurrentes bajo niveles de cantidad bajos que estos son poco intensos para impedir la germinación, pero estos podrían tardar o inhabilitar totalmente las técnicas del hipocótilo, todo esto depende del lugar del compuesto, el impedimento de la elongación de la radícula e hipocótilo forman guías sub-letales demasiado perceptivos para la evaluación del efecto de la germinación. El bioensayo podría ser consumado con diferentes tipos de especies, el cual resulte a un costo bajo importante, y que tengan una disposición disponible de germinación y su desarrollo sea velozmente. (7)

2.3.7.2. *Lactuca Sativa* (Lechuga)

Planta anual de la familia de las compuestas. Se adapta a distintos climas, la temperatura adecuada para la lechuga es de 15 ° - 20 °C. La lechuga (*Lactuca Sativa*) es muy flexible cuando hay un aumento de humedad. No resiste la sequía debido a su bajo desarrollo de su sistema radicular. La lechuga es un género bioindicadora que sirve de progreso de ensayos de toxicidad en varios protocolos de aplicación en ecotoxicología por su sensibilidad a compuestos tóxicos. Su característica primordial son los tallos, hojas verdes prolongadas

redondas y crujientes que forma un cogollo compacto. Se van realizando variedades más difíciles que pueden cultivarse en partes de clima frío o templado. (52)

2.3.7.2.1. Clasificación taxonómica

Reino: *Plantae*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Orden: *Asterales*

Familia: *Asteraceae*

Subfamilia: *Cichorioideae*

Tribu: *Lactuceae*

Género: *Lactuca L,*

Especie: *L sativa L*

2.3.7.3. *Beta vulgaris L.* (betarraga)

Es una hortaliza del conjunto de raíces para una siembra inmediata, y se distingue por sus hojas de intensidad verde, peciolo rojos o púrpuras y sus raíces globosas de un color morado, que muestran anillos concéntricos en corte transversal. Es una especie bioindicadora, nombrada en la lista de la Guía 208 de la OCDE (52)

2.3.7.3.1. Clasificación taxonómica

Reino: *Pantae*

Sub reino: *Phanerogamae*

División: *Angiospermae*

Clase: *Dicotyledoneae*

Sub clase: *Archychlamydeae*

Orden: *Centrospermales*

Familia: *Chenopodiaceae*

Género: *Beta*

Especie: *Beta vulgaris L*

Nombre común: *Remolacha forrajera*

2.3.7.4. *Raphanus Sativus* (Rabanito)

Es una planta oriunda del Asia, se desarrolla en zonas tropicales y subtropicales. Se siembra todo el año y se consume habitualmente el hipocótilo. Tiene mayor cantidad agua (95% agua), los minerales que abundan más son el potasio y el iodo. El rabanito es un género bioindicadora, nombrado en la lista de la Guía 208 de la OCDE. Para la mejora pruebas Toxicidad en los varios protocolos de aplicación en ecotoxicología por su sensibilidad a compuestos tóxicos. (OCDE, 2003) (52)

2.3.7.4.1. Clasificación taxonómica

Reino: Plantae

División: Magnoliophyla

Clase: Magnoliopsida

Orden: Brassicales

Familia: brassicaceae

Género: *Raphanus*

Especie: *Raphanus Sativus L*

2.3.8. Bioensayo en *Allium cepa L.*

2.3.8.1. La raíz como sistema de ensayo

Las células meristemáticas de las raíces están compuestas en pruebas de ensayo ya que es un tejido proliferante donde accede examinar los resultados con mayor genotóxica. La raíz que proviene del inferior del bulbo es de tipo adventicia. Por otro lado, está ubicado la caliptra, una capa delgada de células esclerosadas y no proliferantes, seguidamente encuentran las células meristemáticas, en la división celular activa y en el sustrato seguidamente ejecutar evaluaciones de genotoxicidad. Si estas células se multiplican, una parte de esas células se distinguen en células de elongación obteniendo un tejido más cercano a la base del bulbo. El responsable para el desarrollo de las raíces es el tejido, por ende, de una causa regulada de debilidad de las alianzas de la celulosa del panel en donde se accede que el citoplasma obtenga forma alargada. Al constituir peticiones coherentes con este órgano con el propósito de

entender sus propiedades cobra categoría como estudio de ensayo en evaluaciones establecidas a la toxicología y a la genética toxicológica. (53)

2.3.8.1.1. Raíz

Principal órgano embrionario que se desarrolla en el proceso de germinación de semilla, ordinariamente hipogeo, específicamente por las siguientes funciones: (53)

1. Absorción; Del agua y sales minerales
2. Circulación: De la savia bruta y elaborada
3. Fijación; De la planta al sustrato
4. Sostén.
5. Acumulación de sustancias de reserva

A.- Clasificación de la raíz:

- **Por su origen:** Embrionales (Dicotiledóneas) Adventicias (Monocotiledóneas)
- **Por la forma:** Típica, axonomorfa, Fibrosa o fasciculada
- **Raíces modificadas:** Tuberiforme, napiforme, columnares, fulcreas, neumatóforos y gemíferas. (53)

B.-Morfología externa de la raíz:

En la raíz se diferencian en sus partes, desde el ápice hasta la base:

1. **Pilorriza:** Está ubicada en el depice de una gran parte de las raíces, revistiendo toda la zona meristemática.
2. **Zona meristemática:** Área con tejido primario y tejido primario. Se diferencian 3 capas fundamentales: Protoplasma: procedente de la epidermis, meristema basal: procedente del parénquima de la corteza y médula, y corteza: a partir del cual se formará el tambor céntrico.
3. **Zona de crecimiento longitudinal:** La elongación de raíz es el área donde las células solo crecen en tamaño.
4. **Zona pilífera:** Zona capilar absorbente.
5. **Zona suberificada:** Las ramas de las raíces sirven para aumentar el área de adhesión y absorción.

6. Cuello: Área de transformación entre raíz y tallo. (53)

C. Morfología interna de la raíz (anatomía).

I.- Estructura primaria: Resultado de la actividad de los meristemos primarios. Principales áreas destacadas.

1. Epidermis: Las zonas no están estratificadas, excepto en epífitas (orquídeas), donde son polimorfas y se les llama dosel. Las células epidérmicas son delgadas cuando se exponen al oxígeno. Bajo tierra, la epidermis vive mucho tiempo y la pared exterior se expande para sujetar a la lignina. Apto para succión y venta de agua. El lugar para encontrar estos pelos es a unos centímetros del ápice de la raíz, faltan en el meristemo apical y en las partes más enceras de las raíces. (53)

2. Corteza primaria:

Exodermis: Uní o multiestratificada, a veces ausente (Mayoría de las Pteridofitas). La epidermis se descompone, se transforma en un tejido defensivo, se convierte en células vivas. Puede constar de una o más capas de células. En ocasiones su superficie interna puede ir acompañada de esclerosis o fibrosa.

Parénquima cortical. Esto es causado por el meristemo primario. Células vivas constantemente diferentes y bajo un fuerte vacío. Pared de celulosa primaria. Si la corteza cerebral está sana, tiende a endurecerse o volverse parenquimatoso. Varias reservas se acumulan en la vacuola, en forma de gránulos o líquido en el citoplasma (aminas, proteínas y polisacáridos), y diferentes cantidades de almidón se acumulan en los plástidos. Otra característica de este parénquima es la presencia de grandes espacios intercelulares, que forman planos en las plantas, cuyo desarrollo se da en lugares con alta humedad (arroz). La función de estos espacios o lagos es transportar gases y almacenar oxígeno para tejidos que no

tienen acceso al oxígeno del aire. Supera el oxígeno del suelo, lo que mejora la condición del suelo como resultado de la oxidación de sustancias tóxicas.

Endodermis: No clasificado, crece en todas las plantas vasculares. La circunferencia interior representa la corteza de la raíz. Se identificó mostrando células en las paredes radial y transversal, y engrosamientos de lignina y suberina que forman bandas de Caspary. Tiene una gran influencia en el movimiento de la solución del suelo entre el cortador y la base del centro. Allí las células del endodermo pasan por delante de los cordados de la xilema. (53)

3. Cilindro central: Invade la parte fundamental de la raíz.

Periciclo: Específicamente meristemática.

Hecho de un manto de células parenquimáticas de paredes delgadas. Puede aparecer esclerénquima como en algunas monocotiledóneas gramíneas (53)

Tejido vascular (haces vasculares radiales): Xilema, floema. Los cordones de la xilema y el floema se entrelazan y forman unidades separadas en la circunferencia de la columna vascular, la xilema puede retrasarse hacia el centro, en este caso la xilema, en la sección transversal de la raíz, forma una estrella. En muchas unidades, la xilema no llega al centro, una actividad monocapa que suele estar ocupada por el parénquima pulpar de reserva. (53)

Médula: Presente o ausente (53)

II.-Estructura secundaria: Las raíces de las plantas leñosas y de cotiledones muestran un crecimiento secundario. Hay dos regiones en las que se desarrolló debido a la actividad de los tejidos meristemáticos secundarios, y el resto de un comienzo primario. (53)

1.- Peridermis súber Felógeno, Felodermis

Alinee, epidermis después de iniciar el crecimiento vascular secundario. La clasificación de estas células da como resultado una expansión del grosor de esta capa, que, junto con una dilatación del grosor del tejido vascular para forzar la corteza para la parte externa, no experimenta el incremento de la circunferencia y llega a destruirse la piel. Flogeno surge de una porción externa del anillo exterior y formarse marrón por fuera y suave por dentro, pero es difícil distinguirlo del anillo exterior.

2.- Cilindro central: Periciclo, Floema trio, Floema 2rio, Cambium, Xilema 2rio, Xilema 1rio, Médula

Cambium se encuentra dentro de la superficie de la corteza. Cuando las células corticales producen núcleos substitutos, el ciclo circular, ubicado en la superficie exterior de la madera, comienza a partirse, formando las denominadas primeras células desde la base. Cambium se enlaza desde la base de la corteza y logra un aspecto ondulado (mostrado en la sección), pero cuando se forma una xilema secundaria contra el floema, el cambium se desplaza hacia afuera y su circunferencia se vuelve circular.

2.3.8.1.2. Meristema

Las células meristemáticas tienen la capacidad de dividirse por mitosis causando por cada división dos células iguales a la que les dio origen, así se van formando los tejidos y estos se agrupan desarrollando los órganos, es decir el cuerpo vegetal. Son células morfológicamente indiferenciadas, y estas tienden a dividirse proporcionalmente; su estructura y fisiología estas son distintas a otra célula del cuerpo de la planta. Una vez que el tejido sea identificado del griego meristos que significa divisible (53)

Son tejidos embrionarios afectados de diferenciarse o perpetuarse. Meristemas estas acceden a la producción en su crecimiento de los vegetales en modo alargado y en el ancho del meristema. (53)

Clasificación de meristemas

- A. Se divide por el lugar donde se encuentra la estructura de la planta en:
- a) Apicales:** Ubicados dentro de sus estructuras de la planta.

- b) Basales:** Están ubicadas en la parte interior de las porciones (ej. Espinas).
 - c) Laterales:** Ubicadas en la periferia de los órganos, beneficiando su desarrollo en grosor.
 - d) Intercalares:** Ubicadas entre células diferenciadas (maduras) favoreciendo el desarrollo en ambos lados.
 - e) Axilares:** responsable del desarrollo desde la axila de la hoja.
- Por el turno de su apariencia frente a un (orden y desarrollo) de la planta.
 - a) Primarios: el tallo y la raíz de los apicales están inicialmente en el embrión.
 - b) Secundarios: Se generan desde de los tejidos primarios por diferenciación. Producción de tejido secundario. (Cámbium y felógeno).

B. Funciones. El meristemo apical tiene tres funciones principales: auto mantenimiento, producción de células somáticas (soma=cuerpo) y establecimiento de patrones de crecimiento de órganos. El meristema apical se desarrolla según este ordenado y no tienen secciones aleatorias, estas tienen un horario establecido relacionado externamente del ápice y secuencia interna del desarrollo.

2.3.8.2. *Allium cepa*

2.3.8.2.1. Descripción botánica

La cebolla (*Allium cepa* L), corresponde a la clase de las monocotiledóneas, familia *Alliaceae*, genero *Allium*. Es una planta bianual que provoca bulbo, en situaciones normales, se cultiva como anual para recoger sus bulbos y cuando se persigue la obtención de semillas, como bianual. (51)

2.3.8.2.2. Clasificación taxonómica

Reino: *Plantae*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Liliopsida*

Orden: *Amaryllidales*
Familia: *Amaryllidaceae*
Subfamilia: *Allioideae*
Tribu: *Allieae*
Género: *Allium*
Especie: *Allium cepa L.*

2.3.8.2.3. Morfología y características de *Allium Cepa*

- **Planta:** Cada dos años, tiene el tallo pequeño que en la base de la raíz y sobre la hoja forma un bulbo.
- **Bulbo:** Constituido de una mezcla de mantos gruesos y pulposas en la base
- **Sistema radicular:** Raíz blanca, espesa y simple.
- **Tallo:** Sustenta la inflorescencia es derecho, de 80 a 150 cm de altura, hueco, con inflado ventrudo en su mitad inferior.
- **Hojas:** Trepadoras, extensas, puntiagudas en la parte libre.
- **Flores:** Diminutas, coloridas, blancas, se juntan en umbelas. (51)

2.3.9. ANÁLISIS FITOQUÍMICO CUALITATIVO

La fitoquímica, es la ciencia que estudia la variedad de sustancias orgánicas que elaboran y acumulan las plantas, su aislamiento, estructura química, metabolismo, distribución natural y funciones biológicas de estas sustancias comúnmente llamadas “drogas vegetales”, responsables de aliviar o curar enfermedades. (54)

Se ha investigado una serie de métodos para determinar y preliminar de los diferentes constituyentes químicos en plantas, fundados para identificar estos con solventes adecuados juntamente con la aplicación de ensayos de coloración.

Se divide en cuatro fases.

- Recolección y división botánica de la especie de estudio.
- Disociación y purificación de constituyentes químicos
- Se determina la estructura adecuadamente.
- Pruebas biológicas y farmacológicas

Los ensayos biológicos y farmacológicos deben ser realizados a lo largo de todo el análisis fitoquímico. (49)

2.4. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICOS

- **Artemia salina Leach.** - La *Artemia salina Leach* definido como microcrustaceo cuyas larvas (nauplios) son frágiles a una extensa variedad de sustancias por lo que pueden calcular fácilmente la bioactividad de extractos vegetales en forma rápida y simple. (50)
- **Bioactividad.** - Cualquier respuesta o reacción del tejido vivo. Considerado como inherente de una sustancia, como un medicamento o toxina, para variar una o varias funciones químicas de una célula. Este mecanismo está relacionado con una concentración y con el alargamiento de la exposición celular de esta sustancia. (25)
- **Bioensayo.** – Es un experimento que investiga la potencia relativa de una sustancia en organismos vivos, por la comparación del efecto de sustancia del estándar o patrón.
- **Citotoxicidad.** – La citotoxicidad se define como la cualidad que tienen algunas células para ser tóxicas. Las sustancias que tienen toxicidad tienen una amplia composición química que ocasionan enfermedades graves a veces ocasionando la muerte con pequeña cantidad consumida. (26)
- **Concentración.** - Unidad química detecta para identificar la relación que tiene con el peso de un soluto y la cantidad o volumen del solvente que contiene. (38)
- **Concentración efectiva media (CE₅₀).** - Se calcula estadísticamente a partir de un componente que se encuentra en el ambiente y se espera que tenga un efecto de 50% en los sujetos de experimentación bajo varias condiciones. (38)
- **Concentración letal media (CL₅₀).** Es la cantidad estadística bien calculada en donde se espera que un 50% de la población muera en situaciones definidas.

Cantidad calculada estadísticamente, de cierto compuesto en el medio, donde se espera que muera un 50% de los organismos de una cierta población bajo ciertas condiciones bien definidas. (38)

- **Concentración inhibitoria media (CI₅₀).** – Cantidad capaz de producir la abstención de varias funciones biológicas, estas pruebas de laboratorio son usados al 50%, bajo condiciones específicas en el laboratorio. (38)
- **Crecimiento relativo de la radícula (CRR).** - Identifica el número de desarrollo desde la aparición de la radícula en la semilla que están exhibidas a un tratamiento de cantidades del lote testigo. (55)
- **Dosis letal media (DL₅₀).** – Es una cantidad, que está bien desarrollada, por aspectos físicos o químico en donde muere el 50% de las sustancias de una población bajo condiciones estrictas. (38)
- **Índice de germinación (IG).** - Presenta el desarrollo de las semillas relativamente de la radícula. (26)
- **Índice de elongación (IE).** -Representa el crecimiento relativo de la radícula. (26)
- **Mutágeno.** – Es un agente que altera el ADN información genética de un organismo a las células de las futuras generaciones. Estos cambios llevan al desarrollo del cáncer que se adquiere a carcinógenos. (26)
- **Nauplio.** – Es una de las primeras larvas desarrollados de crustáceos, que tiene forma de piriforme y presenta solo tres pares de apéndices cefálicos: anténulas, antenas y mandíbulas, con los que nada. (26)
- **Ppm. - (partes por millón)** una medida de la concentración en la cual la cantidad es tal que hay una parte del soluto por un millón de partes del solvente o de matriz. (26)

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1. MATERIALES DE CAMPO

- Libreta de campo
- Papel periódico
- Grabadora
- Cámara fotográfica
- Cuaderno de apuntes
- Tijera botánica
- Lapiceros
- Etiquetas
- Bolsas de papel
- Cordel
- GPS o altímetro
- Hojas de papel periódico
- Mapas
- Archivero

3.1.2. MATERIALES DE GABINETE

- Computadora
- Bibliografía especializada
- Croquis, planos, fotocopias.
- Papel bond
- Papeles kraff

3.1.3. MATERIALES BIOLÓGICOS

- Especie de líquenes (*Usnea spp*, *Ramalina*) recolectadas en la comunidad de Pacca, provincia de Anta.
- *Artemia salina* Lech (Lima- Perú)
- *Lactuca sativa*
- *Raphanus sativus*

- *Beta vulgaris*
- *Allium cepa*

3.1.4. MATERIALES DE LABORATORIO

- Embudo
- Tubos de ensayo
- Mortero
- Frasco de vidrio
- Papel filtro
- Alcohol
- Matraz o Erlenmeyer
- Pipetas Pasteur
- Baguetas de vidrio
- Termómetros ambientales
- Picetas
- Pera de decantación
- Espátulas
- Crisoles de porcelana

3.1.5. REACTIVOS

- Agua destilada
- Etanol de 70°
- Ácido clorhídrico concentrado
- Ácido sulfúrico concentrado
- Hidróxido de amonio
- Hidróxido de sodio 10%
- Hidróxido de potasio al 0.2 M
- Anhídrido acético
- Ácido nítrico concentrado
- Sulfato de sodio anhidro
- Yoduro de potasio
- Cloroformo
- Cloruro de sodio

- Gelatina
- Tricloruro férrico
- Ninhidrina
- Acido 3,5- dinitrobenzoico
- P- dimetil amino benzaldehído

Reactivos para la identificación

- Solución de gelatina – sal
- Lieberman- burchard
- Ehrlinch
- Borntrager
- Kedde
- Dragendorff
- Mayer
- Rosenheim

3.1.6. EQUIPOS DE LABORATORIO

- Autoclave
- Estufa
- Espectrofotometría UV

3.2. DISEÑO METODOLÓGICO

3.2.1. Tipo de Estudio

Es un estudio correlacional, ya que establece una relación que existe entre dos variables: Independientes los extractos acuosos y etanólicos al 70% de dos especies de líquenes *Usnea* y *Ramalina*) y dependiente (citotoxicidad). La citotoxicidad depende de una cuantificación del ácido úsnico en el extracto y etanólico de *Usnea sp* y *Ramalina*

Consiste en obtener diferentes datos a partir de la variable independiente para luego cuantificar en la variable dependiente utilizando estadística de progresión.

3.2.2. Tipo de diseño

A. Actividad citotóxica en *Artemia salina*.

Es un estudio cuasi experimental. Un diseño con post prueba únicamente y grupos intactos. Cuasi experimental porque los sujetos de experimentación no son asignados al azar, si no que estos grupos ya están establecidos antes de realizar el experimento.

B. Actividad citotóxica en plantas vasculares

Es un estudio experimental al azar, un diseño con post prueba y grupos control. Siendo un experimento puro, la asignación al azar tiene como propósito dar al investigador que las variables extrañas no afectaran sistemáticamente los resultados del estudio.

C. Para la sistematización de información en los pobladores de Pacca

Es un estudio de tipo no experimental, descriptivo porque no se modificará ninguna variable interviniente.

3.2.3. Definición Operacional de las Variables

3.2.3.1. VARIABLES IMPLICADAS

3.2.3.1.1. VARIABLES INDEPENDIENTES

3.2.3.1.1.1. Extractos acuosos y etanólicos al 70% de los líquenes *Usnea sp* y *Ramalina*

Definición conceptual:

Es el preparado concentrado de los constituyentes activos de los líquenes obtenidos mediante extracción por maceración. (11)

Definición operacional:

- ❖ **Indicadores:** Cantidad de extracto disuelto/ cantidad de disolvente.
- ❖ **Naturaleza:** Cuantitativa
- ❖ **Forma de medición:** Directa
- ❖ **Escala de medición:** Razón
- ❖ **Instrumento de medición:** Balanza analítica, micropipeta.
- ❖ **Procedimiento de medición:** Se procederá a pesar la cantidad necesaria en mg y se diluyera en ml del disolvente.

- ❖ **Expresión final:** mg/ml.

3.2.3.1.2. VARIABLES DEPENDIENTES

3.2.3.1.2.1. Citotoxicidad en *Artemia Salina*

Definición conceptual: Es el daño a la función o la estructura celular de la *Artemia Salina*, debido a la presencia de los extractos acuosos y etanólicos de los líquenes *Usnea Spp* y *Ramalina*. (47)

Definición operacional:

- ❖ **Indicadores:** Número de individuos muertos. Movilidad de los nauplios de *Artemia salina*.
- ❖ **Naturaleza:** Cuantitativa
- ❖ **Escala de medición:** Intervalo
- ❖ **Tipo de medición:** Directa
- ❖ **Instrumento de medición:** Estereoscopio o lupa.
- ❖ **Procedimiento de medición:**
 - ✓ La actividad de los extractos secos se evidencia de acuerdo al número de nauplios muertos de *Artemia Salina*.
 - ✓ Número de muertos por dilución del extracto.
- ❖ **Expresión final:** CL₅₀

3.2.3.1.2.2. Citotoxicidad en semillas de *Lactuca sativa*, *Raphanus sativus* y *Beta vulgaris*.

Definición conceptual: Es la alteración de la supervivencia y el desarrollo normal de la planta durante el periodo de la germinación y los primeros días de desarrollo, por la presencia de una sustancia toxica, siendo una etapa de sensibilidad frente a factores externos adversos. (56)

Definición operacional:

- **Indicador:**
 - 1-. **Germinación y elongación de las semillas.**
 - * **Naturaleza:** Cuantitativa
 - * **Medición:** Directa

- * **Escala:** Razón
- * **Instrumento de medición:** Vernier o regla milimetrada
- * **Procedimiento de medición:** La toxicidad de determinará evaluando la inhibición de la germinación y la inhibición de la elongación de la radícula y hipocótilo, luego de 120 horas de administrar a distintas concentraciones los extractos en estudio. Los datos obtenidos se procesarán con el programa estadístico PROBIT, ANOVA.
- * **Expresión final:** CI₅₀ o CE₅₀, IG, IE.

- **Indicador:**

- 2-. **Signos de fitotoxicidad**

- * **Naturaleza:** Cuantitativa
 - * **Medición:** Directa
 - * **Escala:** Nominal
 - * **Instrumento de medición:** Observación directa.
 - * **Procedimiento de medición:** La toxicidad se determinará evaluando cualquier indicador de fitotoxicidad o de crecimiento anormal en las plántulas tratadas y en los controles, luego de 120 horas de administrar a distintas concentraciones los extractos en estudio.
 - * **Expresión final:** Presencia/ ausencia.

3.2.3.1.2.3. Citotoxicidad en bulbos de *Allium cepa* (parámetro macroscópico)

Definición conceptual: Es la alteración que impide el crecimiento normal de la raíz, y por tanto su elongación, cuando la hidratación de los bulbos se lleva a cabo en presencia de sustancias tóxicas. (53)

Definición operacional:

- **Indicador:**

1- Inhibición del crecimiento de la radícula

- * **Naturaleza:** Cuantitativa
- * **Medición:** Directa
- * **Escala:** Razón
- * **Instrumento de medición:** Vernier o regla milimetrada.
- * **Procedimiento de medición:** Usualmente se usa la prueba de crecimiento de la raíz para encontrar el valor CE₅₀ o CI₅₀.
- * **Expresión final:** CI₅₀.

2-. Signos de fitotoxicidad: (Ápices radiculares con necrosis pelos absorbentes poco desarrollados, etc.) Así como cambios en las características tales como ganchos, tumores, necrosis, estrías y coloración).

- * **Naturaleza:** Cualitativa
- * **Medición:** Directa
- * **Escala:** nominal
- * **Instrumento de medición:** observación directa
- * **Procedimiento de medición:** La toxicidad se determinará evaluando cualquier indicador del crecimiento anormal de los bulbos tratados y en los controles.
- * **Expresión final:** Presencia / ausencia.

3.2.3.1.2.4. Citotoxicidad en meristemos radiculares de *Allium cepa*

Definición conceptual: Es la inhibición de la división celular de los meristemos radiculares ya sea retardado el proceso de mitosis o destruyendo las células. Las células meristemáticas de la raíz de *Allium cepa* L. Es un importante sistema de prueba para la evaluación de la citotoxicidad de extractos de planta medicinales por sus propiedades cinéticas de proliferación y por tener grandes y pocos cromosomas. (53)

Definición operacional:

- **Indicador:**

- 1-. Inhibición de la división celular**

- * **Naturaleza:** Cuantitativa
 - * **Medición:** Directa
 - * **Escala:** Razón
 - * **Instrumento de medición:** Microscopio
 - * **Procedimiento de medición:** Luego de 72 horas de administrar a distintas concentraciones los extractos en estudio se determinará evaluando el crecimiento, el flujo del ciclo celular.
 - * **Expresión final:** Índice mitótico, índice de fases.

- 3.2.3.1.2.5. Cuantificación del Ácido úsnico**

Definición conceptual: El ácido úsnico es un metabolito frecuente en líquenes, variando su concentración según la especie. (16)

Definición operacional:

- **Indicadores:**

- ⌘ **Rango de linealidad**

- * **Naturaleza:** Cuantitativa
 - * **Forma de medición:** Directa
 - * **Escala de medición:** Razón
 - * **Instrumento de medición:** Espectrofotométrico UV visible.
 - * **Procedimiento de medición:** se prepararán soluciones 1/10, 1/50, 1/100, 1/500, 1/1000 ppm y se medirán absorbancias en 284nm.
 - * **Expresión final:** ppm

- 3.2.3.2. VARIABLES NO IMPLICADAS**

- 3.2.3.2.1. Variables intervinientes.**

- 3.2.3.2.1.1. De los sujetos encuestados**

- Edad.**

- ❖ **Definición conceptual:** Tiempo que ha vivido una persona

- **Naturaleza:** Cuantitativa

- **Forma de medición:** Directa
- **Escala de medición:** De intervalo
- **Expresión final de la variable**
 - Jóvenes de 18 hasta los 30 años
 - Adultos a partir de los 21 hasta los 60 años
 - Ancianos de 61 años a mas

Sexo.

❖ **Definición conceptual:** Constitución orgánica que diferencia el género.

- **Naturaleza:** Cualitativa
- **Forma de medición:** Directa
- **Escala de medición:** Nominal
- **Expresión final de la variable:**
 - Masculino
 - Femenino

Grado de instrucción:

❖ **Definición conceptual:** Nivel de conocimiento que tiene un individuo.

- **Naturaleza:** Cualitativa
- **Forma de medición:** Directa
- **Escala de medición:** Nominal
- **Expresión final de la variable**
 - Analfabeta
 - Primaria incompleta
 - Secundaria incompleta
 - Secundaria completa a más

Ocupación:

❖ **Definición conceptual:** Se refiere a la clase de trabajo o actividad que realiza una persona por el pago de dinero o en especies, o por la ganancia familiar.

- **Naturaleza:** Cualitativa
- **Forma de medición:** Directa
- **Escala de medición:** Nominal
- **Expresión final de la variable**

- Agricultor
- Obrero
- Ama de casa
- otros

Tabla 1: IDENTIFICACIÓN Y OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES INDEPENDIENTES

Variable Independientes	Definición conceptual	Indicadores	Naturaleza/ escala de medición/ Tipo de medición	Procedimiento de medición	Instrumentos de medición	Expresión final
Extractos acuosos y etanólicos al 70% de los líquenes <i>Usnea sp</i> y <i>Ramalina</i>	Es el resultado de la extracción acuosa y etanólico para alcaloides, en la que se trabaja con el comportamiento de los alcaloides a las variaciones de pH.	Cantidad de extracto disuelto/ cantidad de disolvente.	Cuantitativa Razón Directa	Se procederá a pesar la cantidad necesaria en mg y se diluyera en ml del disolvente.	Balanza analítica.	mg/ml

Fuente: Elaboración propia

Variable dependiente	Definición conceptual	Indicadores	Naturaleza/ escala de medición/ Tipo de medición	Procedimiento de medición	Instrumentos de medición	Expresión final
Cuantificación del ácido úsnico.	El ácido úsnico es un metabolito frecuente en líquenes, variando su concentración según la especie.	Rango de linealidad	Cuantitativa Razón Directa	Se prepararán soluciones 200, 400, 800, 1600 ppm y se medirán absorbancias en 284nm.	Espectrofotómetro UV visible	ppm

Fuente: Elaboración propia

Tabla 2: IDENTIFICACION Y OPERACIONALIZACION DE LAS VARIABLES DEPENDIENTES

VARIABLE DEPENDIENTE						
	CITOTOXICIDAD					
	En nauplios de <i>Artemia salina</i>	En semillas de <i>Lactuca sativa</i> , <i>Raphanus sativa</i> y <i>Beta vulgaris</i>		En bulbos de <i>Allium cepa</i>		En meristemo radicular de <i>Allium cepa</i>
INDICADORES	Número de individuos muertos	Inhibición de la germinación y elongación	signos de fitotoxicidad: necrosis	Inhibición del crecimiento de raíces	signos de fitotoxicidad	Inhibición de la división celular
Naturaleza	Cuantitativa	Cuantitativa	Cualitativa	Cuantitativa	Cuantitativa	Cuantitativa
Tipo de medición	Directa	Directa	Directa	Directa	Directa	Directa
Escala de medición	Razón	Razón	Nominal	Razón	Nominal	Razón
Instrumento de medición	Lupa	Regla milimetrada	Observación directa	Regla milimetrada	Observación directa	Microscopio
Expresión final	CL ₅₀	CL ₅₀ , IGN, IER	Presencia Ausencia	CL ₅₀	Presencia Ausencia	% IM, % IF

3.2.4. CRITERIOS DE SELECCIÓN

A. Para el estudio de la especie *Usnea sp* y *Ramalina*

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Liquen debidamente certificado.
- Liquen en buen estado

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Líquenes en mal estado de conservación

B. Para la sistematización en los pobladores de Pacca

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Todos los pobladores que pertenecen a la comunidad de Pacca – Anta
- Pobladores que sean mayores de edad.
- Todos los pobladores que conozcan sobre líquenes.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Pobladores que no desean colaborar con la entrevista.
- pobladores que no pertenecen a la comunidad.
- Pobladores que no tengan conocimiento sobre Líquenes.
- Pobladores menores de edad.

3.3. AREA DE ESTUDIO

La sistematización de la información en los pobladores y la recolección de los líquenes se realizó en la comunidad de Pacca distrito de Anta, Provincia de Cusco (Ver mapa de ubicación de la comunidad de Pacca, Anexo N°2, la parte experimental se realizó en el laboratorio de la carrera profesional de Biología, Química y Farmacia UNSAAC.

3.3.1.- ASPECTOS GEOGRAFICOS

3.3.1.1. Ubicación Geográfica

La comunidad de Pacca se encuentra localizada en el distrito de Anta Departamento de Cusco. Ubicada a una altitud entre los 3362 m.s.n.m, entre las coordenadas geográficas 13°28',18" L.S y 72°8',55" L.O.

Anta es un distrito que está ubicada en la Ciudad de Cusco alrededor de 25 kilómetros con una vía pavimentada, Cusco – Abancay – Lima, Cusco – Valle Sagrado y Páchar – Ollantaytambo.

3.3.1.2. Ubicación Geológica

De acuerdo a Weberbauer 1945, el departamento de Cusco presenta cuatro ecosistemas con características propias, que son: provincias altas, valles interandinos ceja de selva y selva baja. Calca y Urubamba se encuentran en valles interandinos, así como Cusco, Anta, Canchis, Paruro, Acomayo y Paucartambo. Ubicados en los 2,000 a 3,600m, de acuerdo a la clasificación de Holdridge 1978.

3.3.1.3. Clima

La temporada de lluvia en la provincia de Anta es templada y nublada y en la época de sequía es bastante cómoda y en partes es nublada. En todo el año normalmente la temperatura es variable de 1°C a 19°C y muy pocas veces baja a -1°C o sube a más de 22°C. La comunidad de Pacca la temperatura es variable. La época de lluvia se da del 17 de septiembre al 29 de abril, en un periodo de 31 días de lluvia como mínimo por 13 milímetros. La temperatura durante el día alcanza entre 18°C y 27°C desde inicios del mes de mayo hasta junio e inicios de julio a inicios del mes de octubre.

3.4. PROCEDIMIENTO

En la elaboración del proyecto de indagación se tomaron algunos puntos.

• **La investigación etnobotánica se organizó de la siguiente manera:**

- Se realizó un previo reconocimiento del área de la zona de estudio.
- Se aplicaron las entrevistas previas a todos los pobladores de la comunidad con la finalidad de conocer los usos de los líquenes.
- Para realizar el muestreo, se tuvo que hacer una caminata por toda el área de la comunidad de Pacca en donde se hizo uso del mapa, para obtener una mejor visión de la zona en donde se encuentra los líquenes. La zona en estudio se reconoció en compañía del (presidente de la Comunidad de Pacca) que posee conocimiento amplio de la ubicación de los principales líquenes.
- Se realizó la recolección de las dos especies de líquenes, en las estaciones definidas para ecosistemas andinos, época de lluvia.
- Los líquenes recolectados fueron identificados botánicamente por el Herbario Vargas de la Carrera de Biología de la UNSAAC.

• **En el trabajo de laboratorio:**

Se realizó la evaluación citotóxica, cuantificación del ácido Úsnico de dos extractos acuosos y etanólicos al 70% de dos especies de líquenes (*Usnea* y *Ramalina*) de la comunidad de Pacca, distrito de Anta – Cusco.

3.4.1. PREPARACION DE LA MUESTRA VEGETAL

3.4.1.1. Recolección de los líquenes

Los líquenes se recolectaron en la comunidad de Pacca del distrito de Anta, Provincia de Anta a 50,5 km de la ciudad de Cusco en el departamento de Cusco, en los meses de diciembre del año 2020 y enero del año 2021, el suelo elegido fue libre de contaminación ambiental por basura, desechos industriales, la recolección se realizó durante los días despejados y sin lluvias, se identificó

cada líquen con una etiqueta donde figurara el nombre común, fecha y lugar de recolección, se puso adentro de las bolsas de papel para llevar a la ciudad de Cusco.

3.4.1.2. Recolección de los líquenes (*Usnea* y *Ramalina*)

Selección

- Se seleccionó líquenes enteros, libres de partículas de polvo, insectos, manchas, hongos, etc.

Estabilización y secado de la planta

- Proceso por el cual se previene la fermentación y se impide a hongos y bacterias reproducirse. Para ello se pueden seleccionar las muestras evitando que se encuentren dañadas o deterioradas.

El proceso se realizó dentro de ambientes con ventilación adecuada de tal forma que se pudo evitar la presencia de polvo y los rayos solares.

- El secado fue llevado a una temperatura ambiental.

Molienda

- Luego del secado se seleccionó adecuadamente para su respectiva molienda en el molino de granos.

3.4.2. Pruebas Fitoquímicas Cualitativas. - (Tamizaje fitoquímico cualitativo)

El tamizaje fitoquímico o screening fitoquímico es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica que permite determinar cualitativamente los principales grupos constituyentes químicos presentes en la planta y a partir de allí orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés.

El análisis fitoquímico permite determinar la presencia o ausencia de diferentes grupos de metabolitos secundarios. Se realizan de acuerdo al **ANEXO N°7**.

3.4.3. Cuantificación del ácido úsnico.

FUNDAMENTO: La cuantificación del ácido úsnico es el más estudiado por sus fotoisómeros y es el metabolito más común del líquen, cuya concentración varía según la especie. (57)

Para realizar la cuantificación del ácido úsnico de dos especies de líquenes se usará el método de espectrofotometría UV-V.

Curva de calibración. - Para calcular el rango de linealidad según método propuesto por Olivio Nino, Mandujano (57)

1. Se preparó soluciones de 1000, 100, 10, 1 ppm de ácido úsnico (patrón) en cloroformo y se midió la absorbancia a 284nm.
2. Con estos resultados se estableció la zona de linealidad y se realizó la preparación de la curva de calibración con 1.6 mg de ácido úsnico (patrón) en 50 ml de cloroformo y a partir de este medio se obtuvo otras soluciones de 6.4 ppm, 3.2 ppm, 1.28 ppm y 0.64 ppm. (57)

Cuantificación de ácido úsnico en dos especies de líquenes

La cuantificación del ácido úsnico de dos especies de líquenes (*Usnea sp* y *Ramalina*) se realizó por triplicado se siguió el siguiente procedimiento.

1. En un balón se colocó 2.5 mg de extracto seco de las dos especies de líquenes (*Usnea sp* y *Ramalina*), disolvió con cloroformo hasta un volumen de 100ml.
2. A partir de esta solución se obtuvo diluciones de 1/10, 1/50, 1/100, 1/500, 1/1000; del mismo que al inspeccionar la absorbancia de las soluciones a 284 nm se encontró en la zona de linealidad (57).
3. Al final, se ejecutó el cálculo del contenido de ácido Úsnico por gramo de los dos ejemplares (*Usnea sp* y *Ramalina*) se utilizó la curva de calibración.
4. Como patrón se usó el ácido úsnico del laboratorio Phytolab con una pureza de 98%.

3.4.4. Bioensayo en *Artemia salina*. Según método propuesto Concha Cusihuallpa B.

FUNDAMENTO:

Este procedimiento con *Artemia salina* es una experimentación que procede establecer citotoxicidad en la larva de este crustáceo en donde es sumamente alto impresionable a una diversidad de sustancias sintéticas. La toxicidad está anunciada con CL₅₀ (concentración letal media).

Para determinar la CL₅₀ se hace el uso de hallar umbrales de toxicidad para determinar compuestos; la indagación fitoquímica se debe al principio, que la farmacología es sencillamente tóxica a concentraciones bajas o viceversa toxicología es farmacología a concentraciones altas se consigue ordenar bioactividad con el valor de CL₅₀ o DL₅₀ y al mismo tiempo su toxicidad. (57)

A. Obtención de nauplios

1. Se depositó aproximadamente 50 mg de huevos de *Artemia salina* en un Erlenmeyer con 350 ml de agua de mar artificial (3,5 g de sal marina por cada 100 ml de agua potable), previamente se oxigeno por una hora con la ayuda de un motor.
2. Se incubo los huevos de *Artemia salina* en un lugar con luz (artificial o natural) durante 48 horas a 27,5 + 2.5 °C. 67
3. Transcurrido el tiempo se extrajo los nauplios con la ayuda de pipeta descartable y se mantuvo en 50 ml de agua de mar y oxigenada.

B. Preparación de extractos

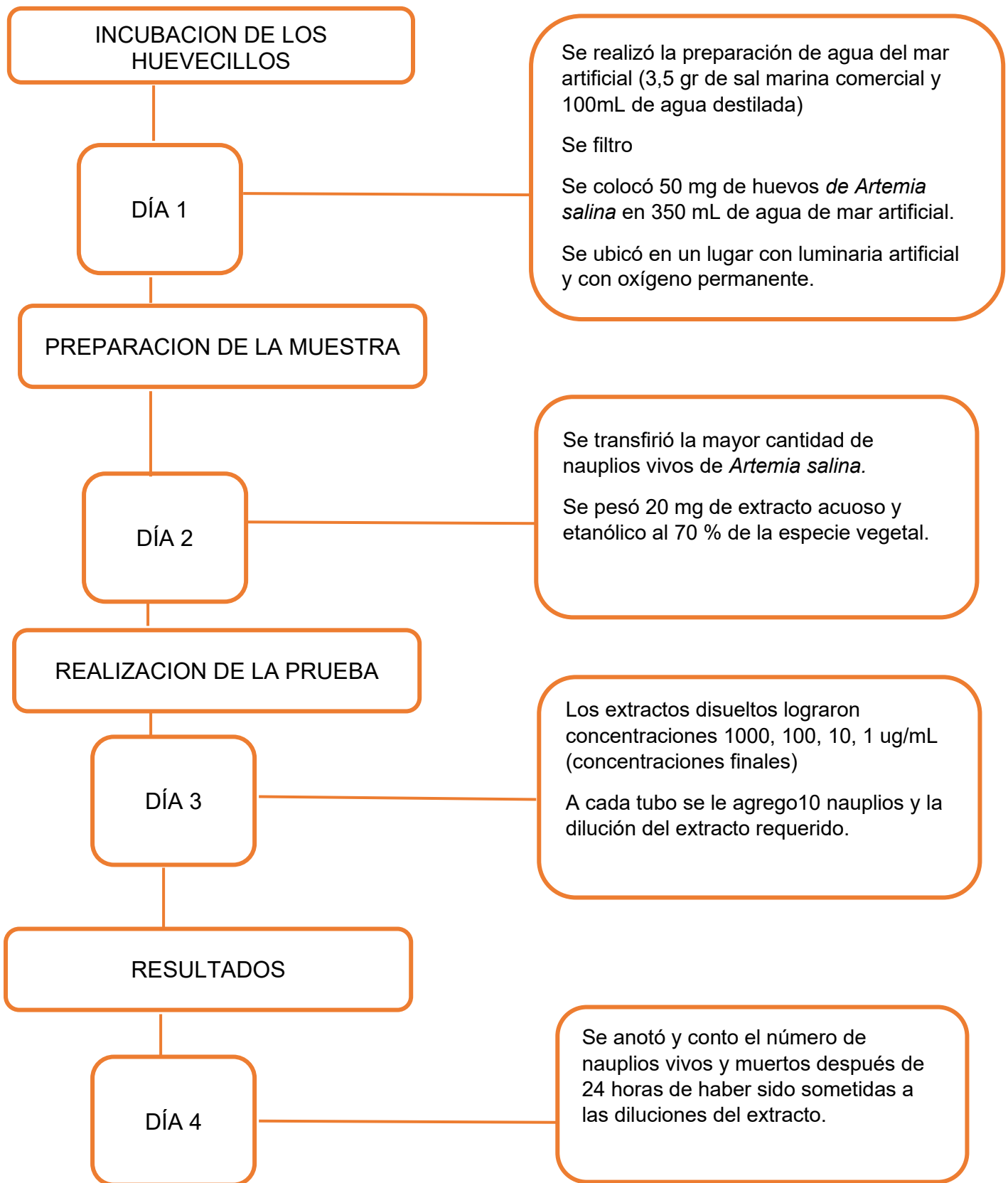
1. Se pesó 20 mg del extracto acuoso y etanólico al 70%. Se diluyo 2 ml de DM₅₀, a partir de esta se preparó soluciones a diferentes soluciones 1000, 100, 10 y 1 ug/mL se formó de la solución madre 500, 50, 5 y 0.5 ul en un tubo de ensayo, rápidamente se llevó a un volumen de 5 ml con agua de mar artificial. Se realizó un control, el blanco que contuvo 2 mL de DM₅₀ más 3 mL de agua de mar artificial Luego se adicionaran 10 nauplios a cada tubo.

2. Finalmente se incubo los tubos a 23 °C con fotoperiodo de 12 horas de luminaria /12 horas de oscuridad. No se dio ningún alimento a los nauplios. Pasando las 24 horas de incubación tuvo que contarse los individuos muertos.

C. Evaluación y Registro

1. Se evaluó trascurrido el tiempo de 24 horas de incubación. Se contó y anoto el número de individuos muertos el "criterio de muerte" será la inmovilidad de los apéndices por más de 5 segundos esto será visto con un microscopio.
 - ✓ Según los criterios adoptados por el Instituto de Investigaciones Fármaco-Bioquímica de Argentina el uso de citas bibliográficas y haber ensayado más de 1.500 sustancias (extractos, aceites, armas, metales pesados, etc.). Se clasificó según el grado de toxicidad de la sustancia.
 - ✓ Sustancia atóxica = CL_{50} superior a 1000 ppm
 - ✓ Compuesto medianamente tóxica = CL_{50} 100-1000 ppm
 - ✓ Compuesto tóxico = CL_{50} 10-100 ppm
 - ✓ Sustancia muy tóxica = CL_{50} menor a 10 ppm. (57)

Flujograma 1. Método de *Artemia Salina* Leach



Fuente: Elaboración propia. Referencias tomadas por Concha Cusihuallpa.

3.4.5. Bioensayo en semillas según método seguido por Sobrero, Ronco.

La toxicidad con bioensayos de (*Lactuca sativa L*) es un ensayo detenido de toxicidad aguda (120 h de exhibición) donde logran calcular tanto efecto fitotóxico de mezclas puras o simplemente compuestos complejos a una base de germinación de las semillas y crecimiento de toda plántula aproximadamente en los primeros días de desarrollo.

Un punto final para la valoración se establece la inhibición en la elongación de la radícula y del hipocótilo y la inhibición en la germinación

Lo más significativo en recalcar que mediante el tiempo de germinación y en los inicios del día de crecimiento de la plántula pasan varias técnicas fisiológicas en donde la que la sustancia toxica puede interceptar perturbando en el crecimiento lucido de las plantas, en el cual es una fase de mayor sensibilidad en los diferentes factores externos.

La valoración del crecimiento de la radícula y del hipocótilo compone hitos característicos para establecer la capacidad de establecimiento y crecimiento de la planta. (58)

Procedimiento de toxicidad con semillas de *Lactuca sativa*, *Raphanus sativus* y *Beta vulgaris* según Sobrero, Ronco.

- En cada placa Petri se puso un disco de papel filtro.
- Se marcó adecuadamente cada placa con la dilución correspondiente, cada caja con 200, 400, 800, 1600 ppm, también se puso la fecha, hora de inicio y final del bioensayo.
- Para evitar la formación de bolsas de aire se tuvo que llenar el papel filtro con 4 o 5 ml de la dilución.
- Se usó una pinza como ayuda, se procedió a colocar lentamente 10 semillas, desistiendo un espacio bastante amplio para su elongación de las raíces.
- Se cubrieron las cajas de Petri de la irradiación rápidamente luego de haber colocado las semillas en su interior y durante la etapa de ensayo, se incubo por 120 horas (5 días) a una temperatura de 22 ± 2 °C.

- Se continuo con la prueba hasta los 14 días, se registró los signos de fitotoxicidad, índice de semillas germinadas y no germinadas y la elongación de la radícula y del hipocotíleo.
- Se calculó el % de inhibición y la CI_{50} . (58)

Flujograma 2. Prueba de toxicidad con semillas de *Lactuca sativa*, *Raphanus sativus* y *Beta vulgaris*

1-. En cada caja Petri se puso un disco de papel filtro.

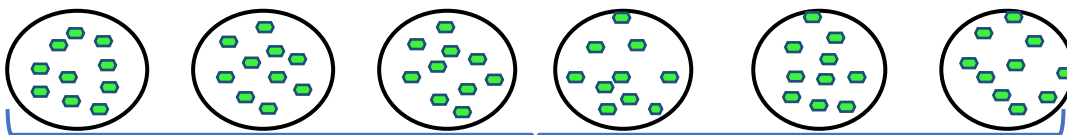
Condiciones de la prueba



2-. Se marcó correctamente cada caja con la dilución correspondiente, cada caja con 200, 400, 800, 1600 ppm, control (+) y control (-), así como la fecha y hora de inicio y término del bioensayo

3-. Se saturó el papel filtro con 4 o 5 mL de la dilución evitando que se funden bolsas de aire.

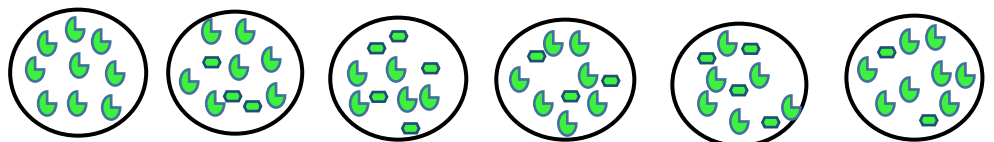
4-. Se usó una pinza, se ubicó lentamente 10 semillas, habiendo una suficiente área entre las semillas para acceder la elongación de las raíces.



Dilución de la muestra cada una con 3 repeticiones

Control (-) control (+)

5-. A toda la caja de Petri se cubrió de la luz rápidamente luego de instalarlas en su interior las semillas y mientras un tiempo de ensayo Incubaremos por 120 horas (5 días) a una temperatura de 22 ± 2 °C



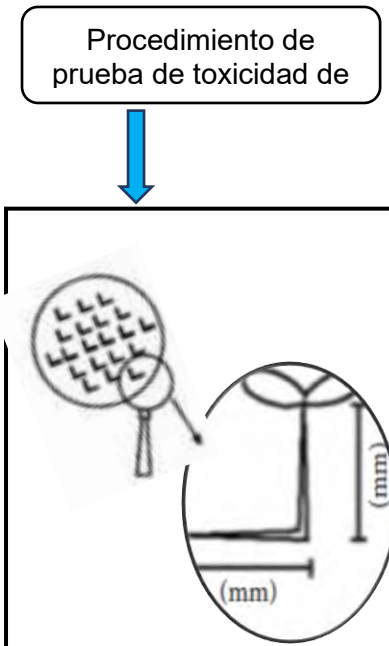
6-. Se continuó con la prueba hasta los 14 días, se registraron los signos de fitotoxicidad (necrosis, efectos en pelos absorbentes)

Se registró el número de semillas no germinadas y germinadas.

Se realizó el control de la elongación de la radícula y del hipocótilo

Se midió el porcentaje de inhibición.

Se calculó la CI_{50}



Fuente: Elaboración propia. Referencias tomadas Sobrero, Ronco.

3.4.6. Bioensayo en *Allium cepa* L. Según método propuesto por Diaz, Ronco Granados.

FUNDAMENTO:

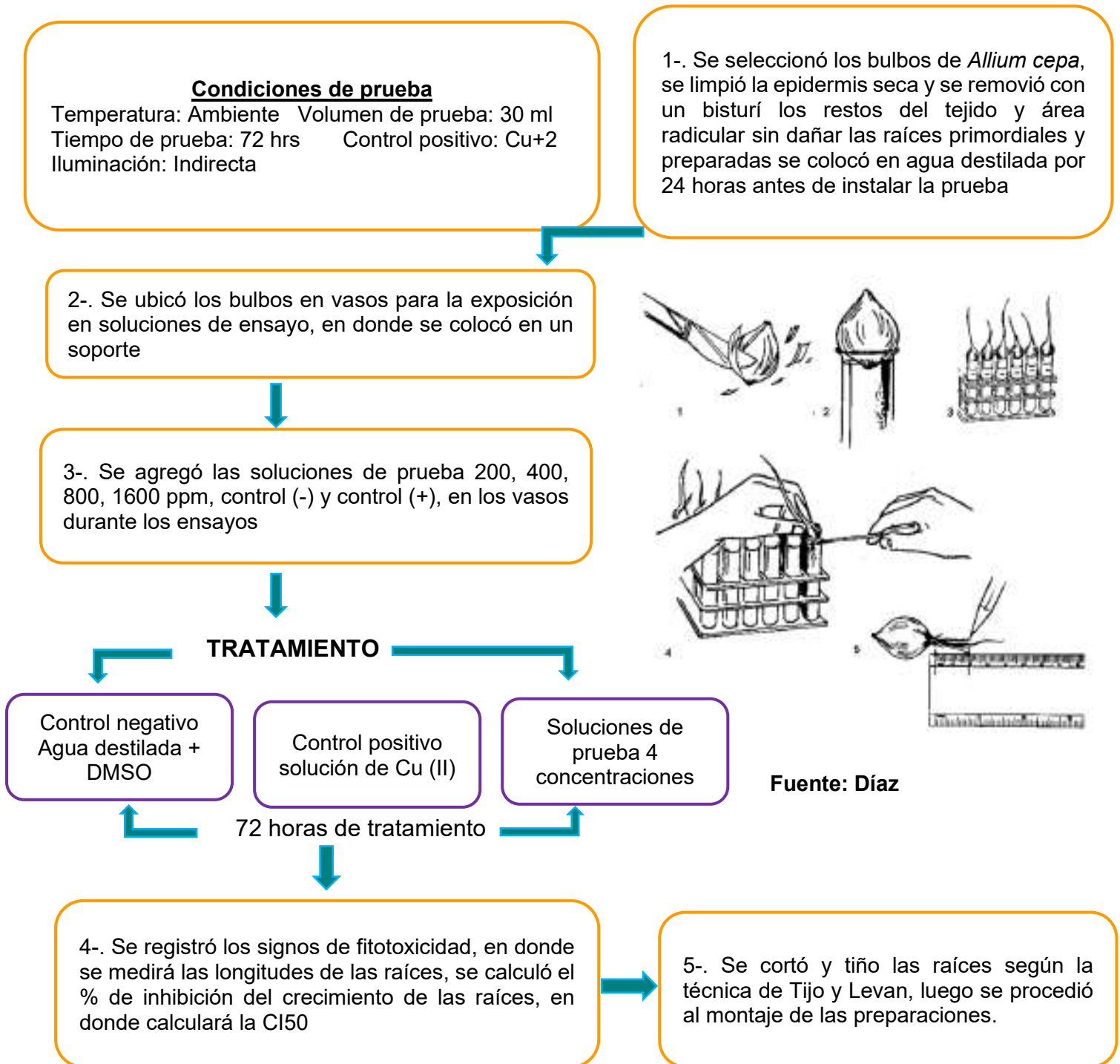
Cuando un bulbo de cebolla (*Allium sp*) se rehidrata, se produce una estimulación del crecimiento de las células, lo cual permite la elongación de las raíces de la planta. Sin embargo, cuando la hidratación se lleva a cabo en presencia de sustancias tóxicas, la división celular de los meristemas radiculares puede inhibirse, ya sea retardando el proceso de mitosis o destruyendo las células. Este tipo de alteraciones generalmente impide el crecimiento normal de la raíz y, por tanto, su elongación.

El efecto puede determinarse en forma indirecta, mediante la comparación de la elongación de las raíces de cebollas expuestas al tóxico con las de cebollas no expuestas, luego de un periodo de 72 h de prueba. La cuantificación del efecto se realiza estableciendo el porcentaje de inhibición del crecimiento de las raíces respecto a la longitud promedio de las raíces del control. (59)

3.4.7. Procedimiento *Allium cepa* L. Según método propuesto por Diaz, Ronco, Granados.

- Se seleccionó los bulbos de *Allium cepa*, se limpió las epidermis secas y removió con un bisturí las sobras del tejido y área radicular sin hacer ningún daño la raíz primordial ya preparada se colocó en agua destilada por 24 horas antes de instalar la prueba.
- Se ubicó los bulbos en vasos para la exposición en soluciones de ensayo, en donde se colocó en un soporte.
- Se agregó las soluciones de prueba 200, 400, 800, 1600 ppm, control (-) y control (+), en los vasos durante los ensayos.
- Los tubos se colocaron en una gradilla, y se mantuvieron a una temperatura ambiente (20 °C) por 72 horas. Se debe evitar la luminosidad directa.
- Se registraron los signos de fitotoxicidad, en donde se midieron las longitudes de las raíces, se calcularon el % de inhibición del crecimiento de las raíces, en donde calcularon la CI₅₀. (59)

Flujograma 3. Prueba de citotoxicidad con *Allium cepa* L.



Fuente: Elaboración propia. Referencias tomadas de Díaz, Ronco, Granados.

CAPÍTULO IV

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 Sistematización de la información de los pobladores sobre su conocimiento en el uso de las especies de líquenes (*Usnea sp.* y *Ramalina*) de la comunidad de Pacca.

Tabla 3: Cantidad de personas que conocen sobre los líquenes *Usnea sp.* y *Ramalina*

	CANTIDAD	PORCENTAJE (%)
Si conoce	33	83
No conoce	7	18
	40	100%

Fuente: Entrevistas a los pobladores de la comunidad Pacca.

Análisis e interpretación.

En la tabla 3, se puede ver el porcentaje de las personas entrevistadas donde nos muestra que de 40 personas entrevistadas 33 personas entre varones y mujeres tienen conocimiento acerca de los líquenes *Usnea sp.*, *Ramalina*, aunque muchos no lo conocen con esos nombres, pero al mostrar los líquenes en físico mencionaron que si lo conocían así mismo al entrevistarlos del lugar de crecimiento indicaron que los líquenes crecen entre rocas, cerca de piedras y sobre árboles. Y 7 personas mencionaron que no conocían ni escucharon acerca de los líquenes.

Tabla 4: Pobladores que utilizan los líquenes *Usnea sp.* y *Ramalina*

	CANTIDAD	PORCENTAJE (%)
Si usa	29	87.89
No usa	4	12.11
TOTAL	33	100

Fuente: Entrevistas a los pobladores de la comunidad Pacca.

Interpretación.

La tabla 4 muestra el porcentaje de los pobladores que conocen y usan los líquenes de 33 pobladores que conocen sobre los líquenes, el 87.89% usa los líquenes ya sea de forma medicinal como filtrante para dolor de estómago, antiparasitario y como ungüento para heridas; otras personas lo usan como ornamental para el armado de nacimiento y por último lo utilizan como tinte natural de lana para la elaboración de tejidos naturales.

4.2 Análisis fitoquímico cualitativo de los extractos de dos especies de líquenes *Usnea sp.* y *Ramalina*

Tabla 5: Análisis fitoquímico cualitativo *Ramalina*

METABOLITO SEGUNDARIOS	REACTIVOS	ACUOSOS	ETANOLICO 70%
FENOLICOS	CLORURO FERRICO	+	+
FLAVONOIDES	SHINODA	++	+
ALCALOIDES	DRAGENDORFF	-	-
QUINONAS	BORNTRANGER	-	-
SAPONINAS	ESPUMA	-	-
TANINOS	GELATINA-SAL	-	-
TRITERPENOS	LIEBERMAN-BURCHARD	++	+

Fuente: Ficha de recolección de datos

Interpretación

En el anexo 7, foto 3,5 y tabla 5 se puede observar como resultado en el ensayo fitoquímico cualitativo de la *Ramalina* en donde se observa en poca cantidad de flavonoides y triterpenos, muy poca cantidad de compuestos fenólicos y ausencia de alcaloides, quinonas, saponinas y taninos en el extracto acuoso mientras que en el extracto etanólico se observa en baja presencia de compuestos fenólicos, flavonoides y triterpenos y ausencia de alcaloides, quinonas, saponinas y taninos.

Tabla 6: Análisis fitoquímico cualitativo *Usnea*

METABOLITO SEGUNDARIOS	REACTIVOS	ACUOSOS	ETANOLICO 70%
FENOLICOS	CLORURO FERRICO	++	+
FLAVONOIDES	SHINODA	+	+
ALCALOIDES	DRAGENDORFF	-	-
QUINONAS	BORNTRANGER	-	-
SAPONINAS	ESPUMA	-	-
TANINOS	GELATINA-SAL	++	+
TRITERPENOS	LIEBERMAN-BURCHARD	+++	++

Fuente: Ficha de recolección de datos

Leyenda:

- ❖ Abundante: +++
- ❖ Poco: ++
- ❖ Muy poco: +
- ❖ Ausente: -

Interpretación:

En el anexo 7 foto 2,4 y tabla 6 se puede observar como resultado en el ensayo fitoquímico cualitativo de la *Usnea* en donde se observa en abundante cantidad triterpenos, poca cantidad de compuestos fenólicos y taninos, muy poca cantidad de flavonoides y ausencia de alcaloides, quinonas, saponinas en el extracto acuoso, mientras que en el extracto etanólico al 70% indica poca cantidad de triterpenos, con baja ausencia compuestos fenólicos, flavonoides y taninos y ausencia de alcaloides, quinonas y saponinas.

El ensayo fitoquímico consiste en observar los efectos de coloración donde se observó la presencia o perdida de metabolitos secundarios.

Análisis y discusión

Castro Mandujano Olivio, 2004 (57), En el estudio del liquen *Psiloparmelia* distinta, en el resultado de la marcha fitoquímica indica que el liquen en estudio contiene ácidos fenólicos, depsidonas, dépsidos, ácidos úsnicos, fenoles y triterpenos y que no contiene alcaloides, flavonoides ni antraquinonas.

Velazco Salazar, 2020, (23) se realizaron pruebas de forma cualitativo en donde el liquen *Usnea aurantiacoatra* contiene compuestos fenólicos, esteroideos,

saponinas esteroideas en proporciones abundante y cumarinas en poca cantidad así mismo no contiene alcaloides, flavonoides, antraquinonas y taninos.

4.3 Prueba de citotoxicidad en *Artemia salina* con los extractos acuosos y etanólicos de *Ramalina* y *Usnea sp.*

4.3.1. Registro de datos

Tabla 7: Resultados obtenidos de la prueba de citotoxicidad de *Artemia salina* en *Ramalina*.

CONCENTRACION DEL EXTRACTO (PPM)	Nº de Ensayo	Nº TOTAL <i>Artemia salina</i>	Nº MUERTOS <i>Artemia</i> DESPUÉS DE 24 HORAS	
			Extracto Etanólico	Extracto Acuoso
1000	1	10	8	9
	2	10	8	7
	3	10	8	7
100	1	10	8	7
	2	10	9	5
	3	10	9	5
10	1	10	5	5
	2	10	7	4
	3	10	7	4
0.1	1	10	5	3
	2	10	5	2
	3	10	5	2
Blanco	1	10	1	1
	2	10	1	0
	3	10	1	1

Fuente: Ficha de recolección de datos

Tabla 8: Resultado del porcentaje de mortalidad del extracto acuoso y etanólico de *Ramalina*

% promedio de mortalidad en 24 horas					
Tipo de extracto	Blanco	0.1ppm	10ppm	100ppm	1000ppm
Extracto Etanólico	1	50	63.33	80	80
Extracto Acuoso	0.67	23.37	43.33	56.67	76.67

Fuente: Ficha de recolección de datos

Análisis e interpretación

De acuerdo a los resultados podemos observar que a la concentración de 1000 y 100 ppm hay mayor mortalidad de nauplios de *Artemia Salina* en 24 horas evidenciando así que tiene un efecto tóxico, mientras que en las concentraciones 10 y 0.1ppm disminuye la mortalidad de nauplios *Artemia salina*.

- En el extracto etanólico de la *Ramalina* de las concentraciones de 1000 y 100ppm supera el 50% de la mortalidad de nauplios en 24 horas y en las concentraciones 10ppm la mortalidad es de 63.33 % a las 24 horas y al 0.1ppm la mortalidad es de 50% a las 24 horas.

Tabla 9: Resultados obtenidos de la prueba de citotoxicidad de *Artemia salina* en *Usnea*.

CONCENTRACION DEL EXTRACTO (PPM)	Nº de Ensayo	Nº TOTAL <i>Artemia salina</i>	Nº MUERTOS <i>Artemia</i> DESPUÉS DE 24 HORAS	
			Extracto Etanólico	Extracto Acuoso
1000	1	10	8	9
	2	10	7	10
	3	10	8	7
100	1	10	6	7
	2	10	7	9
	3	10	7	7
10	1	10	6	6
	2	10	6	7
	3	10	6	4
0.1	1	10	4	5
	2	10	5	4
	3	10	5	3
Blanco	1	10	2	2
	2	10	2	1
	3	10	1	2

Fuente: Ficha de recolección de datos

En el extracto acuoso de la *Ramalina* de las concentraciones 1000 y 100ppm supera el 50% de la mortalidad de nauplios en 24 horas y en concentraciones de 10 y 0.1% no supera el 50% de mortalidad debido a que a 10ppm la mortalidad es de 43.33 % a las 24 horas y al 0.1% la mortalidad es de 23.37% a las 24 horas.

Tabla 10: Resultado del porcentaje de mortalidad del extracto acuoso y etanólico de *Usnea*.

% promedio de mortalidad en 24 horas					
Tipo de extracto	Blanco	0.1ppm	10ppm	100ppm	1000ppm
Extracto Etanólico	1.67	43.33	60	66.67	76.67
Extracto Acuoso	1.67	40	56.67	76.67	56.67

Fuente: Ficha de recolección de datos

Análisis e Interpretación

De acuerdo a los resultados podemos observar que, a la concentración de 1000, 100 y 10ppm podemos observar que hay mayor mortalidad de nauplios de *Artemia Salina* en 24 horas evidenciando así que tiene un efecto tóxico, mientras que en las concentraciones 0.1ppm disminuye la mortalidad de nauplios *Artemia salina* y en el blanco que es mínima la muerte de los nauplios.

- En el extracto etanólico de la *Artemia salina* de las concentraciones de 1000 ,100 y 10ppm supera el 50% de la mortalidad de nauplios en 24 horas y en las concentraciones 0.1ppm no supera el 50% de la mortalidad a las 24 horas.
- En el extracto acuoso de la *Artemia salina* de las concentraciones 1000 100 y 10ppm supera el 50% de la mortalidad de nauplios en 24 horas y en concentraciones de 0.1% no supera el 50% de mortalidad debido a que a 0.1% la mortalidad es de 40% en 24 horas.

4.3.1. Concentración Letal media

Tabla 11-. Análisis de probit para la citotoxicidad y la CL50 de los extractos etanólicos y acuosos de la *Ramalina* en *Artemia salina*.

CONCENTRACION LETAL MEDIA (CL50)

Probability	CL50 (ppm) - ETANÓLICO	CL50 (ppm) - ACUOSO
IC/EC 1.00	0.000	0.000
IC/EC 5.00	0.000	0.000
IC/EC 10.00	0.000	.004
IC/EC 15.00	0.000	.021
IC/EC 50.00	0.109	18.702
IC/EC 85.00	1400.340	16576.705
IC/EC 90.00	13118.396	82530.340
IC/EC 95.00	361416.930	890930.286
IC/EC 99.00	77270110.026	181739230.378

Fuente: Datos estadísticos

Análisis y Discusión

En la tabla 11 se observa que en la concentración letal media del extracto etanólico de la *Ramalina* que produce mortalidad al 50% de los nauplios *Artemia salina* es de 0.109 ppm y del extracto acuoso fue 18.702 ppm de acuerdo al resultado obtenidos de los líquenes según la clasificación de CYTED el extracto etanólico es extremadamente tóxico y para el extracto acuoso presenta altamente tóxico.

Tabla 12-. Análisis de probit para la citotoxicidad y la CL50 de los extractos etanólicos y acuosos de la *Usnea* en *Artemia salina*.

CONCENTRACION LETAL MEDIA (CL50)

Probability	CL50 (ppm) - ETANÓLICO	CL50 (ppm) - ACUOSO
IC/EC 1.00	0.000	0.000
IC/EC 5.00	0.000	0.000
IC/EC 10.00	0.000	0.000
IC/EC 15.00	0.000	.001
IC/EC 50.00	.359	.962
IC/EC 85.00	73459.468	1112.434
IC/EC 90.00	1324293.526	5898.179
IC/EC 95.00	96265640.960	69896.010
IC/EC 99.00	9627786758	7221037.989

Fuente: Datos estadísticos

Análisis y discusión

En la tabla 12 se observa que en la concentración letal media del extracto etanólico de la *Usnea* que produce mortalidad al 50% de los nauplios *Artemia salina* es de 0.359 ppm y del extracto acuoso fue 0.962 ppm de acuerdo al resultado obtenidos de los líquenes según la clasificación de CYTED el extracto etanólico y el extracto acuoso ambos extractos son extremadamente tóxicos.

Saetama Gualpa,2017 (60), Se realizó estudios de mortalidad en diferentes concentraciones, se encontró que en los valores CI50 en un periodo de exposición de 24 horas obteniéndose como resultado 17,386 ppm, en donde que se determinó altamente tóxico.

Mora Recinos et al. 2012 (14), En el extracto de cianobacterias obtenido en la evaluación de la toxicidad contra *Artemia salina* del extracto etanólico se observa que el extracto presenta una toxicidad menos de 1mg/ml es decir si posee actividad citotóxica con una concentración letal media CL50 de 0.84 mg/ml.

Popovici et al.2021. (24) La evaluación de citotoxicidad de *usnea barbata* en diferentes extractos secos mostro que a concentraciones superiores de 100 ug/ml (1:10) los efectos registrados indican baja toxicidad (mortalidad entre 20% y 38%). Comparando los resultados por UBDE en diferentes disolventes y el ácido úsnico, reportados al control negativo (agua) por la prueba de Dunnett, el análisis estadístico mostró diferencias significativas (p -valor <0.05) en el caso de los lotes expuestos. Las mortalidades fueron estadísticamente significativamente por el ácido úsnico (BSL LC₅₀ = 424,75 µg/ml) y acetona (BSL LC₅₀ = 411,77 µg/ml), etanol (BSL LC₅₀ = 338,39 µg/ml) y metanol (BSL LC₅₀ = 250,19 µg/ml). La actividad citotóxica más alta se registró con el extracto de acetato de etilo (BSL LC₅₀ = 219,59 µg/ml).

4.4 Prueba de citotoxicidad en semillas con los extractos acuosos y etanólicos de *Usnea sp* y *Ramalina*.

4.4.1-. Pruebas de sensibilidad

Tabla 13: Resultados de las pruebas de sensibilidad de la *Ramalina*.

RAMALINA (AGUA)	PRUEBAS DE SENSIBILIDAD		TRATAMIENTO (ppm)					
			T1: -	T2: 200	T3: 400	T4: 800	T5: 1600	T6: +
<i>Raphanus sativus</i>	ELONGACION (mm)	RADICULA	3.28	2.16	1.32	1.28	0.6	0
		HIPOCOTILO	6.4	5.10	4.30	3.80	2.50	0.50
	% INHIBICION	RADICULA	0	34.15	59.76	60.98	81.71	100
		HIPOCOTILO	0	20.31	32.81	40.63	60.94	92.19
	%GERMINACION		90	58.0	46.0	45.0	33.0	0
	INDICE DE GERMINACION		100	52.68	39.19	31.21	14.63	0
	INDICE DE GERMINACION RESIDUAL NORMALIZADO (IGN)		0	-0.36	-0.49	-0.5	-0.63	-1.0
	INDICE DE ELONGACION RADICAL RESIDUAL NORMALIZADO (IER)		0	-0.34	-0.60	-0.61	-0.82	-1.0
<i>Beta vulgaris</i>	ELONGACION (mm)	RADICULA	3.1	2.3	1.7	1.1	0.8	0
		HIPOCOTILO	2.5	1.3	0.9	0.7	0.3	0
	% INHIBICION	RADICULA	0	25.81	46.16	64.52	74.19	100
		HICOTILO	0	48.0	64.0	72.0	88.0	100
	% DE GERMINACION		70	42.10	33.30	24.70	20	0
	INDICE DE GERMINACION		100	55.64	41.12	26.61	19.35	0
	INDICE DE GERMINACION RESIDUAL NORMALIZADO (IGN)		0	0.40	-0.52	-0.65	-0.71	-1.0
	INDICE DE ELONGACION RADICAL RESIDUAL NORMALIZADO (IER)		0	-0.25	-0.46	-0.65	-0.75	-1.0
<i>Lactuca sativa</i>	ELONGACION (mm)	RADICULA	2.38	1.13	0.92	0.73	0.48	0
		HIPOCOTILO	1.98	1.48	1.12	0.81	0.74	0
	% INHIBICION	RADICULA	0	52.52	61.34	69.32	79.83	100
		HICOTILO	0	25.25	43.43	59.09	62.62	100
	% GERMINACION		50	20	10	10	10	0
	INDICE DE GERMINACION		100	31.64	12.88	10.22	6.71	0
	INDICE DE GERMINACION RESIDUAL NORMALIZADO (IGN)		0	-0.6	-0.8	-0.8	-0.8	-1.0
	INDICE DE EELONGACION RADICAL RESIDUAL NORMALIZADO (IER)		0	-0.53	-0.62	-0.70	-0.80	-1.0

Fuente: Ficha de recolección de datos

Análisis e interpretación

En el resultado de la *Ramalina* se puede observar que a medida que la concentración de la ppm se incrementa la elongación de la radícula e hipocótilo disminuye en las tres muestras así mismo disminuye la germinación.

Tabla 14: Resultados de las pruebas de sensibilidad en la Usnea.

USNEA (AGUA)	PRUEBAS DE SENSIBILIDAD		TRATAMIENTO (ppm)					
			T1: -	T2: 200	T3: 400	T4: 800	T5: 1600	T6: +
Raphanus sativus	ELONGACION (mm)	RADICULA	2.8	2.32	1.98	1.46	0.92	0
		HIPOCOTILO	4.9	4.26	3.11	2.52	1.32	0
	% INHIBICION	RADICULA	0	17.14	28.28	47.85	67.14	100
		HIPOCOTILO	0	13.06	36.53	48.57	73.06	100
	%GERMINACION		80	66.6	53.3	36.6	24.0	0
	INDICE DE GERMINACION		100	62.13	53.03	39.10	24.63	0
	INDICE DE GERMINACION RESIDUAL NORMALIZADO (IGN)		0	-0.17	-0.34	-0.54	-0.70	-1.0
	INDICE DE ELONGACION RADICAL RESIDUAL NORMALIZADO (IER)		0	-0.17	-0.29	-0.47	-0.67	-1.0
Beta vulgaris	ELONGACION (mm)	RADICULA	2.5	2.1	1.94	1.48	1.15	0
		HIPOCOTILO	3.7	3	2.30	1.73	0.84	0
	% INHIBICION	RADICULA	0	16	22.4	40.8	54	100
		HICOTILO	0	18.91	37.83	53.24	77.29	100
	% DE GERMINACION		80	46.6	36.6	30.6	24.3	0
	INDICE DE GERMINACION		100	63	58.2	44.69	34.73	0
	INDICE DE GERMINACION RESIDUAL NORMALIZADO (IGN)		0	-0.41	-0.54	-0.61	-0.69	-1.0
	INDICE DE ELONGACION RADICAL RESIDUAL NORMALIZADO (IER)		0	-0.16	-0.22	-0.40	-0.54	-1.0
Lactuca sativa	ELONGACION (mm)	RADICULA	1.8	1.41	1.22	0.97	0.93	0
		HIPOCOTILO	2.7	1.87	1.74	1.33	1.13	0
	% INHIBICION	RADICULA	0	21.66	32.22	46.11	48.33	100
		HICOTILO	0	30.74	35.55	50.74	58.14	100
	% GERMINACION		60	32.33	28.9	23.4	17.5	0
	INDICE DE GERMINACION		100	41.42	35.35	26.07	16.42	0
	INDICE DE GERMINACION RESIDUAL NORMALIZADO (IGN)		0	-0.46	-0.51	-0.61	-0.70	-1.0
	INDICE DE ELONGACION RADICAL RESIDUAL NORMALIZADO (IER)		0	-0.21	-0.32	-0.46	-0.48	-1.0

Fuente: Ficha de recolección de datos

Análisis e interpretación

En la tabla 14 se puede observar tres muestras de semillas.

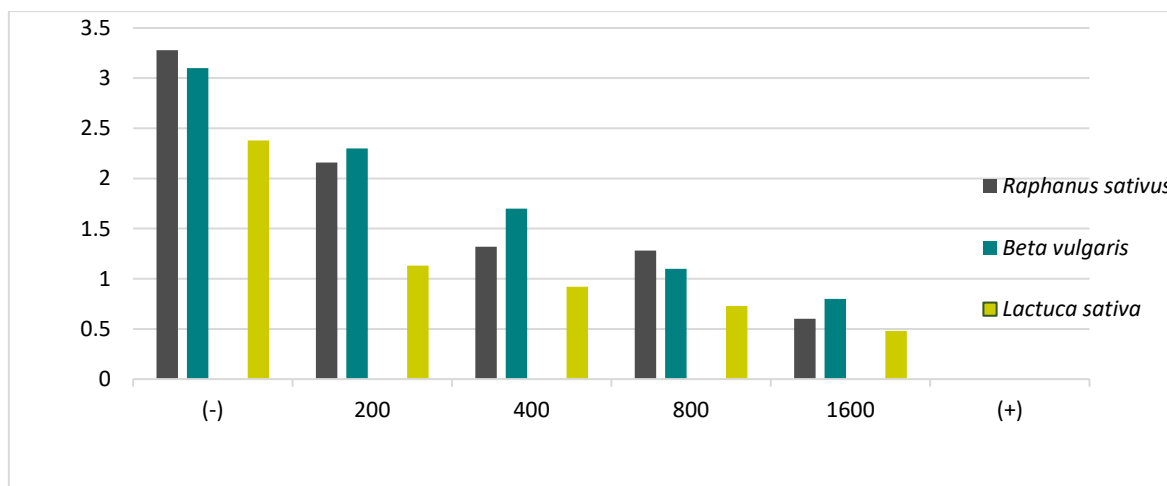
La prueba de sensibilidad para el *Raphanus sativus* se tiene que el T1 en la elongación de la radícula es de 2.8mm y para un T5 es de 0.92 mm y para un porcentaje de germinación en el T1 es de 80% y para un T5 es de 24%.

La prueba de sensibilidad para el *Beta vulgaris* se tiene que con el T1 en la elongación de la radícula es de 2.5mm y para un T5 es de 1.15 mm y para un porcentaje de germinación en el T1 es de 80% y para un T5 es de 24.3%.

La prueba de sensibilidad para el *Lactuca sativa* se tiene que con el T1 en la elongación de la radícula es de 1.8 mm y para un T5 es de 0.93 mm y para un porcentaje de germinación en el T1 es de 60% y para un T5 es de 17.5%.

Se puede observar la prueba de sensibilidad en tres muestras de semilla como es *Raphanus sativa*, *Beta vulgaris* y *Lactuca sativa* que a medida que se incrementa la concentración de tratamiento del extracto acuoso de *Usnea* disminuye la elongación y el porcentaje de germinación.

Figura 5. Comparación de promedio del crecimiento radicular de *Raphanus sativus*, *Beta vulgaris* y *Lactuca sativa*, en la fase acuosa del Liquen *Ramalina*.

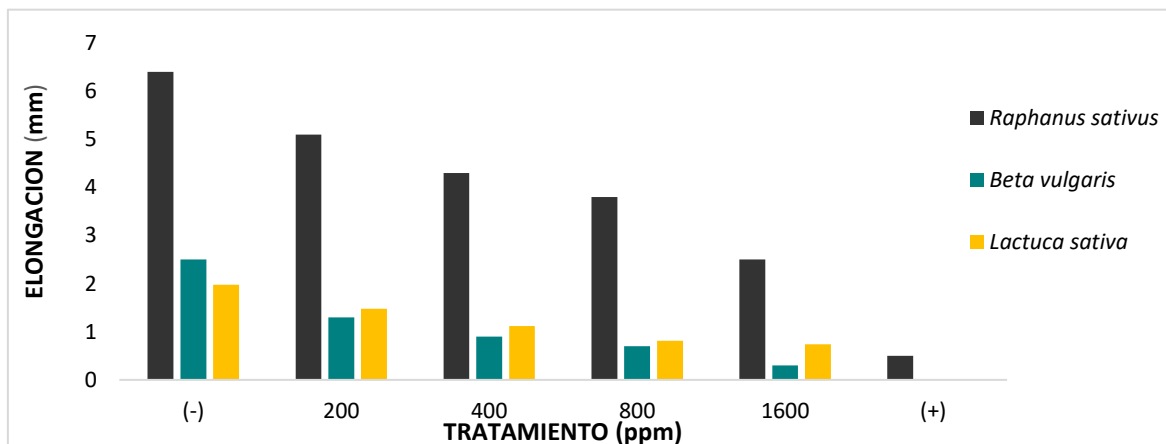


Fuente: Elaboración propia a partir de resultados

Interpretación

Se puede observar que a medida que la concentración es menor el crecimiento radicular es mayor en *Raphanus sativus*, *Beta vulgaris* y *Lactuca sativa*.

Figura 6. Comparación de promedio del crecimiento del hipocótilo de *Raphanus sativus*, *Beta vulgaris* y *Lactuca sativa*, en la fase acuosa del Liquen *Ramalina*.



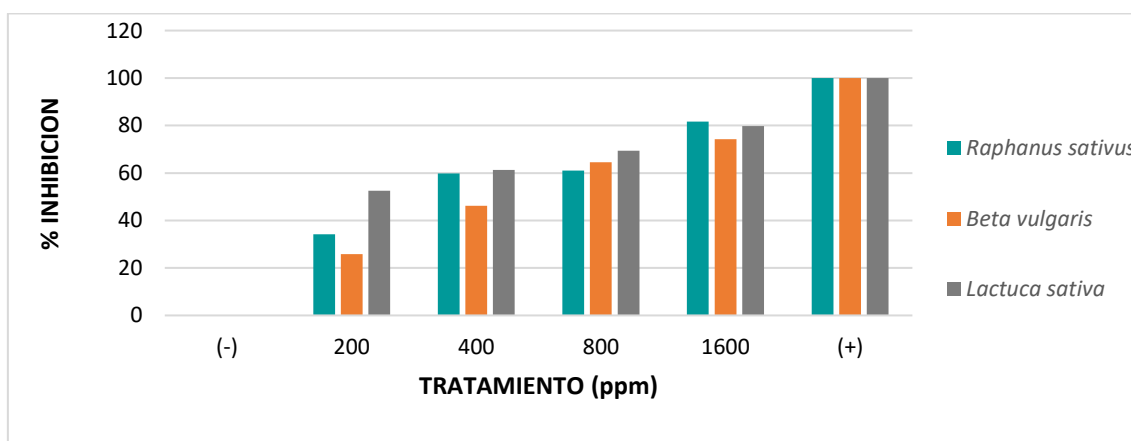
Fuente: Elaboración propia a partir de resultados

Promedio de la elongación de la radícula y el hipocótilo de la *Ramalina*

Los bioensayos de los extractos acuosos y etanólicos de los líquenes de *Ramalina* y *Usnea* se evaluó mediante un análisis de crecimiento de la radícula e hipocótilo. Las diferencias que se observaron en la longitud con respecto al control testigo (negativo) fue la que influyó directamente sobre los resultados del índice de germinación.

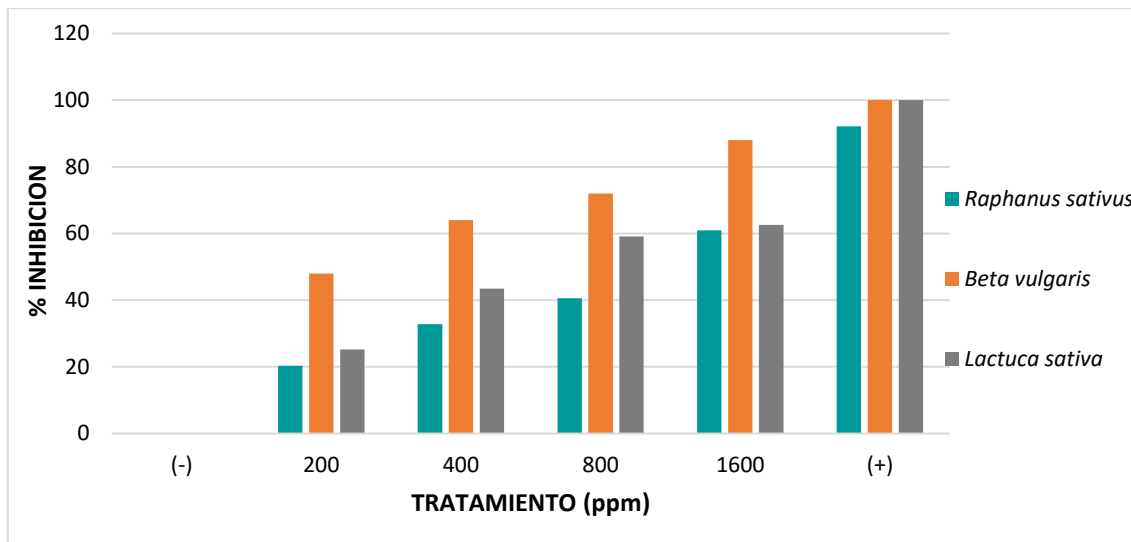
El crecimiento fue menor a medida que aumenta la concentración del extracto, así mismo se puede observar que *Raphanus sativus* tiene mayor crecimiento en el hipocótilo.

Figura 7. Comparación de promedio de la inhibición del crecimiento radicular de *Raphanus sativus*, *Beta vulgaris* y *Lactuca sativa*, en la fase acuosa del Liquen *Ramalina*.



Fuente: Elaboración propia a partir de resultados

Figura 8. Comparación de promedio de la inhibición del crecimiento del hipocotilo de *Raphanus sativus*, *Beta vulgaris* y *Lactuca sativa*, en la fase acuosa del Liquen *Ramalina*.



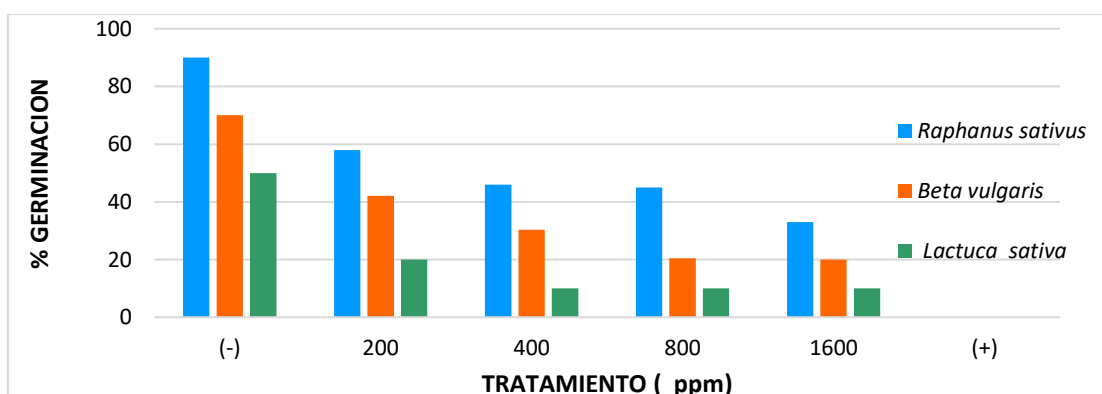
Fuente: Elaboración propia a partir de resultados

Porcentaje de inhibición del crecimiento de la radícula y del hipocótilo

En la *Ramalina* el extracto acuoso hubo una inhibición en el crecimiento de la radícula e hipocótilo (tabla 18 figura) en donde hubo una diferencia estadísticamente significativa en cuanto a los grupos de control.

En donde se puede observar que a medida que la concentración es menor el porcentaje de inhibición es menor y se va incrementado a medida que se incremente la concentración de la ppm tanto en la radícula como en el hipocótilo para las tres muestras de semillas.

Figura 9. Comparación del porcentaje de germinación de *Raphanus sativus*, *Beta vulgaris* y *Lactuca sativa*, en la fase acuosa del Liquen *Ramalina*.

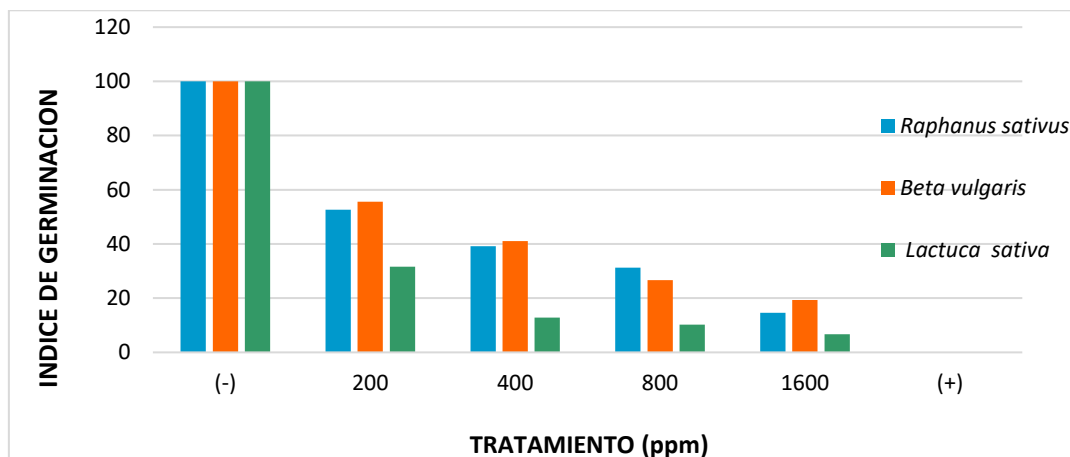


Fuente: Elaboración propia a partir de resultados

Porcentaje de germinación de las semillas

La germinación disminuye a medida que aumenta la concentración, por ende, se vio ostentosa el porcentaje de germinación.

Figura 10. Comparación del índice de germinación de *Raphanus sativus*, *Beta vulgaris* y *Lactuca sativa*, en la fase acuosa del Liqueen *Ramalina*.



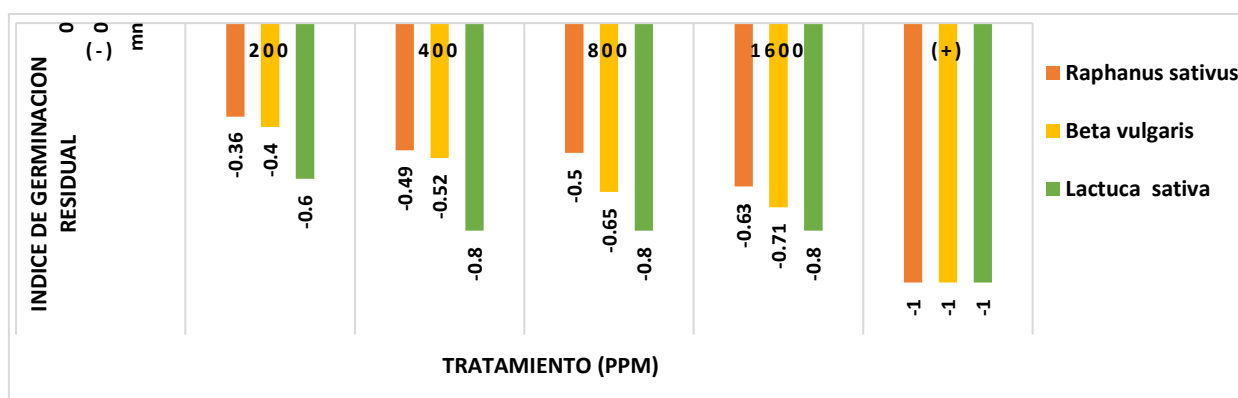
Fuente: Elaboración propia a partir de resultados

Índice de germinación

En este índice, representa el porcentaje de germinación y porcentaje de la radícula durante los ensayos. Las diferencias se observaron con respecto al control negativo.

Por otra parte, los resultados encontrados en los tratamientos T5 (1600ppm) en donde las tres plántulas presentan el IG más bajo.

Figura 11. Comparación del índice de germinación residual normalizado de *Raphanus sativus*, *Beta vulgaris* y *Lactuca sativa*, en la fase acuosa del Liqueen *Ramalina*.

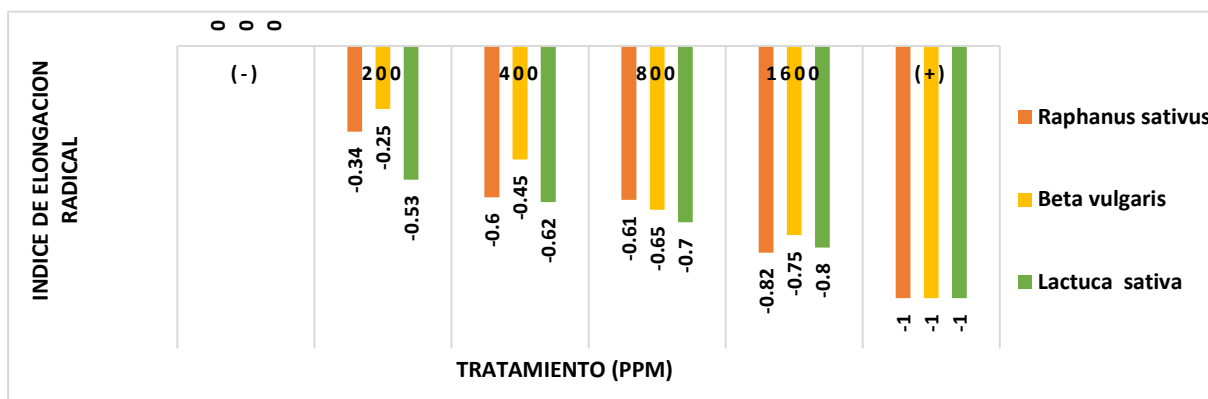


Fuente: Elaboración propia a partir de resultados

Índice de germinación residual normalizado (IGN)

En los datos obtenidos de IGN se observa que en el tratamiento T2:200ppm para *Raphanus sativus*, *Beta vulgaris* y *Lactuca sativa* presentan una toxicidad baja de (-0.36) (-0.4) (-0.6), por otro lado, en el tratamiento T5: 1600 ppm para *Raphanus sativus*, *Beta vulgaris* presento una moderada toxicidad con (-0.63) (-0.71) en cambio a una concentración de (-0.8) presenta una toxicidad muy alta en *Lactuca sativa*. En definición, la toxicidad se incrementa a medida que la concentración incrementa.

Figura 12. Comparación del índice de elongación residual normalizado de *Raphanus sativus*, *Beta vulgaris* y *Lactuca sativa*, en la fase acuosa del Liquen *Ramalina*.

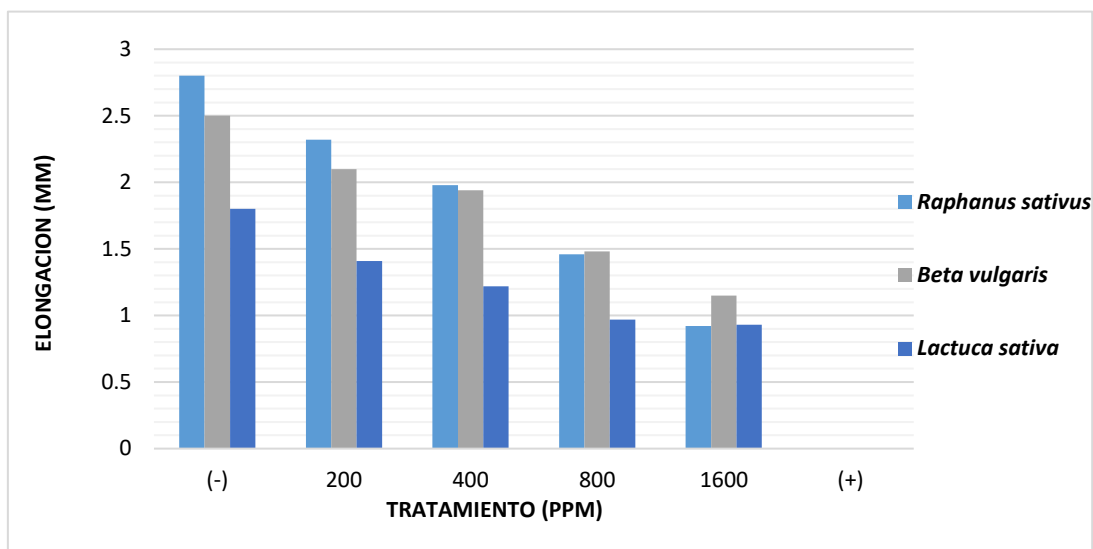


Fuente: Elaboración propia a partir de resultados

Índice de elongación radical residual normalizado (IRS)

En los datos obtenidos IGR, en el tratamiento T2: para *Raphanus sativus*, *Beta vulgaris* y *Lactuca sativa* presentan una toxicidad baja con (-0.34), (-0.25) y (-0.53), por otro lado, el tratamiento T5: 1600 ppm para *Raphanus sativus*, *Beta vulgaris* y *Lactuca sativa* presento una toxicidad muy alta con (-0.82), (-0.75) y (-0.8). a medida que la concentración se incrementa la toxicidad aumenta.

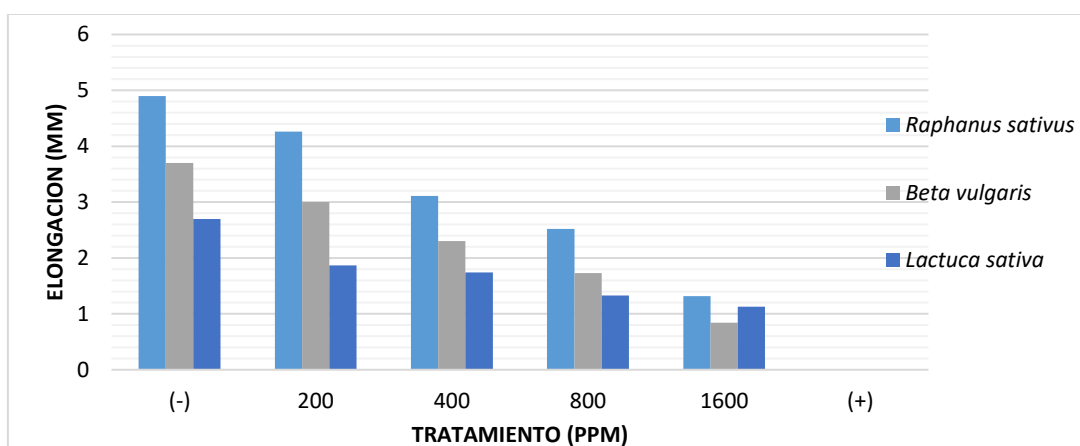
Figura 13. Comparación de promedio del crecimiento radicular de *Raphanus sativus*, *Beta vulgaris* y *Lactuca sativa*, en la fase acuosa del Liquen *Usnea*.



Fuente: Elaboración propia a partir de resultados

Se puede observar que a medida que la concentración es menor el crecimiento radicular es mayor en *Raphanus sativus*, *Beta vulgaris* y *Lactuca sativa*.

Figura 14. Comparación de promedio del crecimiento del hipocotilo de *Raphanus sativus*, *Beta vulgaris* y *Lactuca sativa*, en la fase acuosa del Liquen *Usnea*.



Fuente: Elaboración propia a partir de resultados

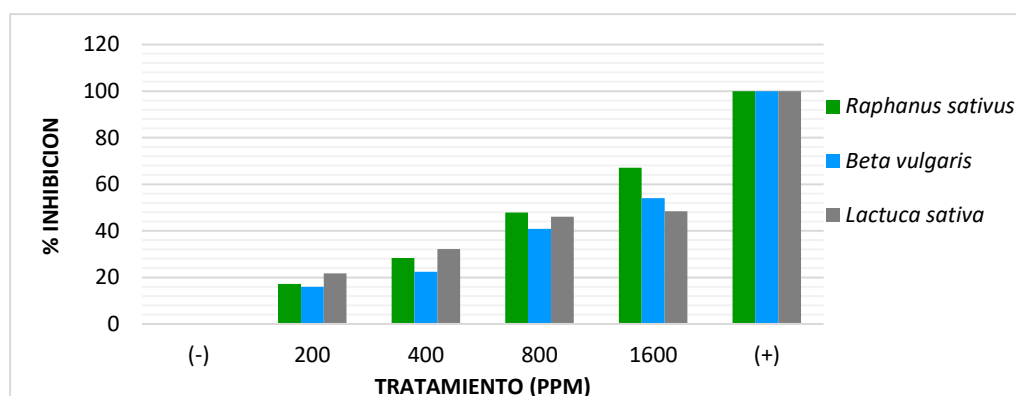
Promedio de la elongación de la radícula y el hipocotilo de la *Usnea*.

Los bioensayos de los extractos acuosos y etanólicos de los líquenes de *Ramalina* y *Usnea* se evaluó mediante un análisis de crecimiento de la radícula e hipocótilo. Las diferencias que se observaron en la longitud con respecto al

control testigo (negativo) fue la que influyo directamente sobre los resultados del índice de germinación.

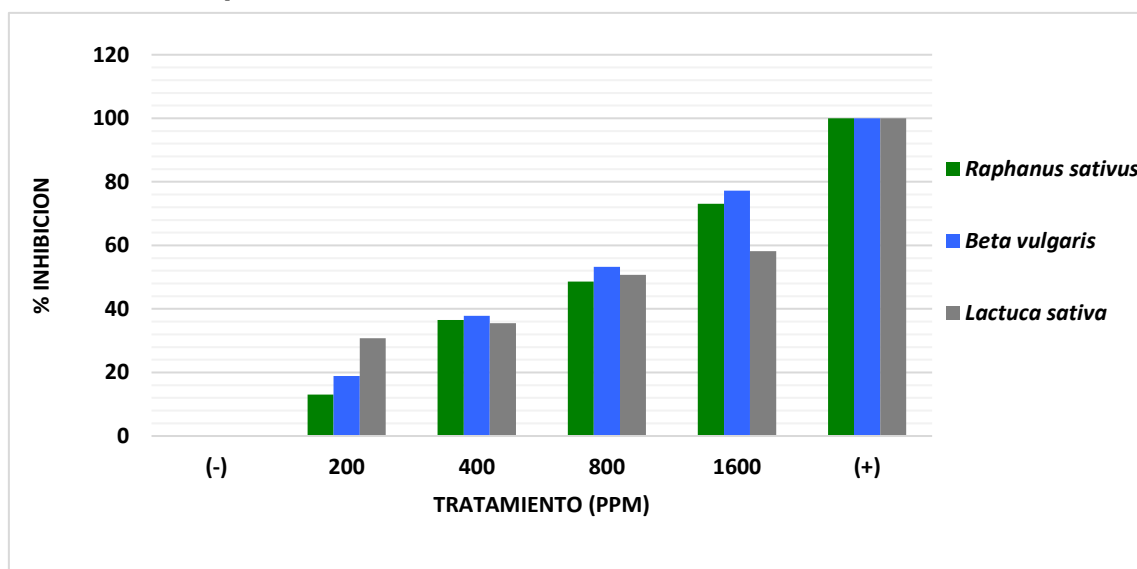
El crecimiento fue menor a medida que aumenta la concentración del extracto, así mismo se puede observar que *Lactuca sativa* tiene menor crecimiento de hipocótilo mientras que *Raphanus sativus* tiene mayor crecimiento en el hipocótilo.

Figura 15. Comparación de promedio de la inhibición del crecimiento radicular de *Raphanus sativus*, *Beta vulgaris* y *Lactuca sativa*, en la fase acuosa del Liqen *Usnea*.



Fuente: Elaboración propia a partir de resultados

Figura 16. Comparación de promedio de la inhibición del crecimiento del hipocotilo de *Raphanus sativus*, *Beta vulgaris* y *Lactuca sativa*, en la fase acuosa del Liqen *Usnea*.



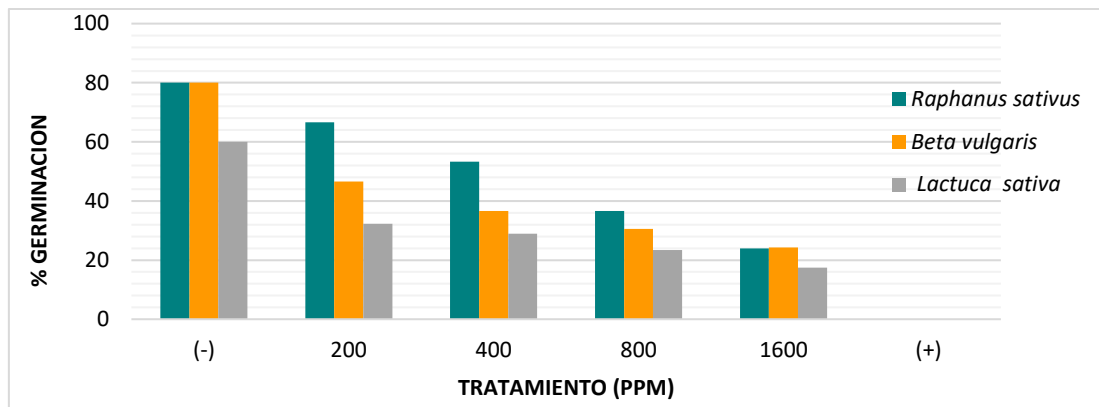
Fuente: Elaboración propia a partir de resultados

Porcentaje de inhibición del crecimiento de la radícula y del hipocótilo

En el extracto acuoso en cuanto a la *Usnea* hubo un crecimiento de la radícula e hipocótilo (tabla16, figura16) en donde hubo una diferencia estadísticamente significativa en cuanto a los grupos de control.

Se puede observar que el porcentaje de inhibición es menor a medida que la concentración es baja como 200 ppm y esto incrementa a medida que la concentración de ppm aumente tanto en la radícula como en el hipocótilo para las tres muestras de semillas.

Figura 17. Comparación del porcentaje de germinación de *Raphanus sativus*, *Beta vulgaris* y *Lactuca sativa*, en la fase acuosa del Liquen *Usnea*.

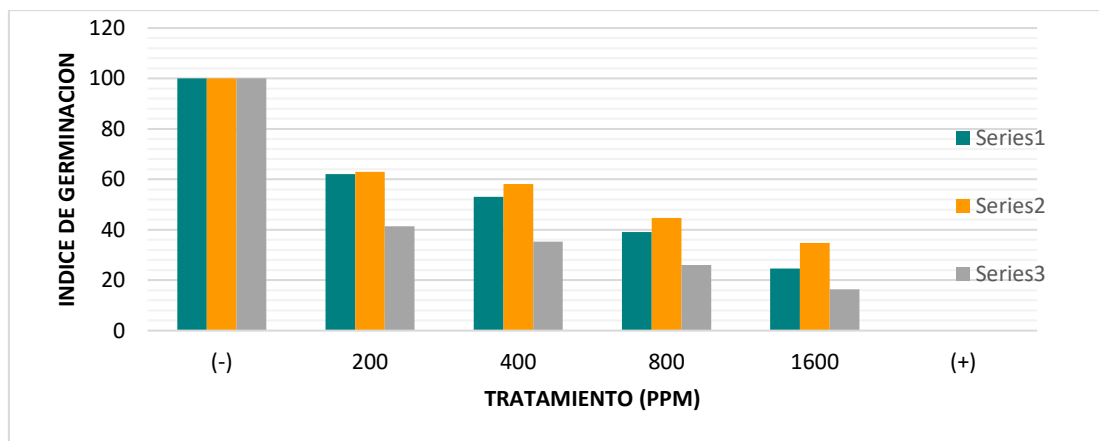


Fuente: Elaboración propia a partir de resultados

Porcentaje de germinación de las semillas

La germinación disminuye a medida que aumenta la concentración, por ende, se vio ostentosa el porcentaje de germinación.

Figura 18. Comparación del índice de germinación de *Raphanus sativus*, *Beta vulgaris* y *Lactuca sativa*, en la fase acuosa del Liquen *Usnea*.



Fuente: Elaboración propia a partir de resultados

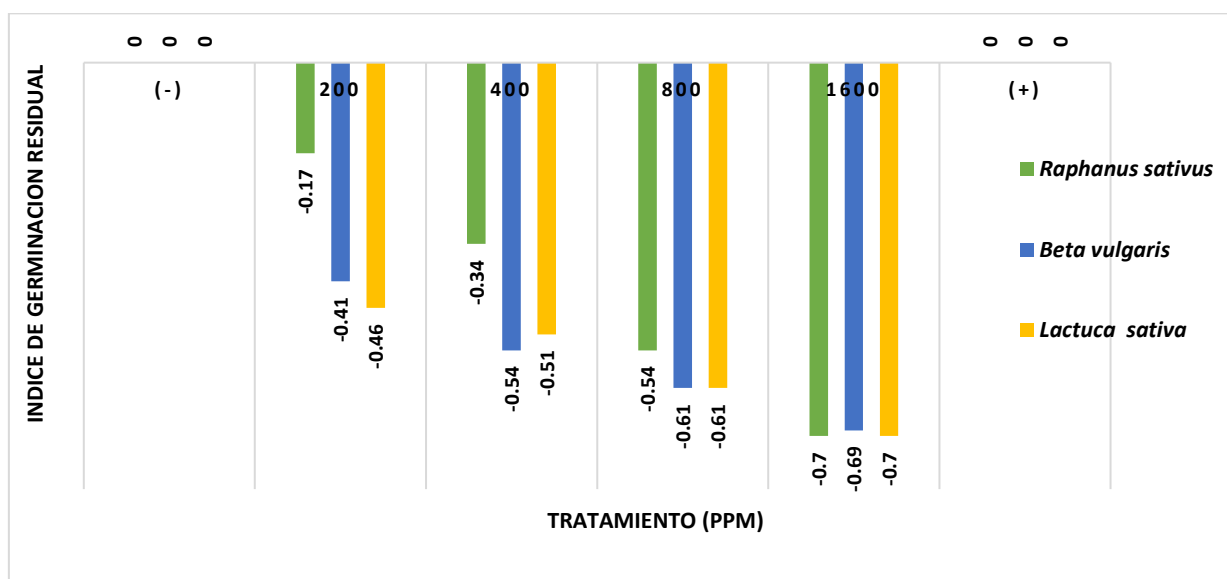
Índice de germinación

En este índice, representa el porcentaje de germinación y porcentaje de la radícula durante los ensayos. Las diferencias se observaron con respecto al control testigo.

Las diferencias se observaron con respecto al control negativo.

Por otra parte, los resultados encontrados en los tratamientos T5 (1600ppm) en donde las tres plántulas presentan el IG más bajo.

Figura 19. Comparación del índice de germinación residual normalizado de *Raphanus sativus*, *Beta vulgaris* y *Lactuca sativa*, en la fase acuosa del Liquen *Usnea*.

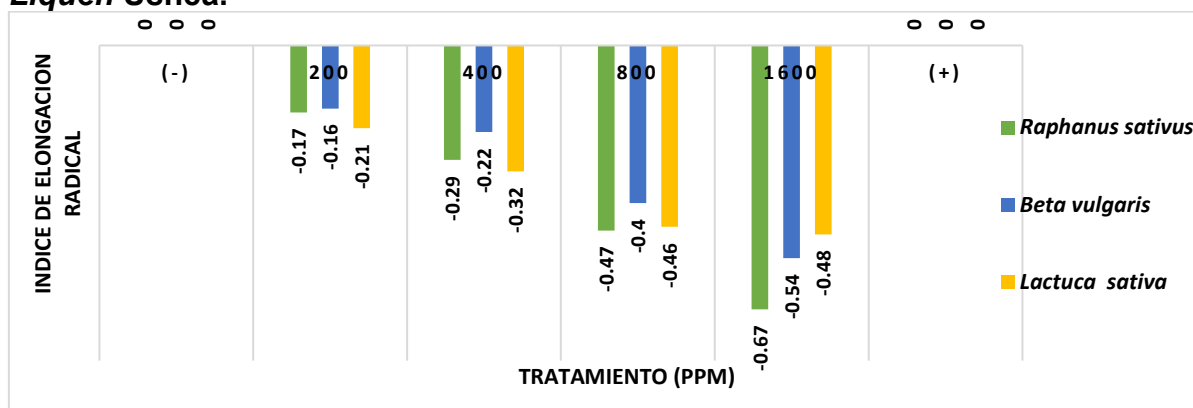


Fuente: Elaboración propia a partir de resultados

Índice de germinación residual normalizado (IGN)

En los datos obtenidos de IGN se observa que en el tratamiento T2:200ppm para *Raphanus sativus*, *Beta vulgaris* y *Lactuca sativa* presentan una toxicidad baja de (-0.17) (-0.41) (-0.46), por otro lado, en el tratamiento T5: 1600 ppm para *Raphanus sativus*, *Beta vulgaris* y *Lactuca sativa* como (-0.7) (-0.69) y (-0.7) presento una toxicidad muy alta En definición, la toxicidad se incrementa a medida que la concentración incrementa.

Figura 20. Comparación del índice de elongación residual normalizado de *Raphanus sativus*, *Beta vulgaris* y *Lactuca sativa*, en la fase acuosa del Liquen Usnea.



Fuente: Elaboración propia a partir de resultados

Índice de elongación radical residual normalizado (IRS)

En los datos obtenidos IGR, en el tratamiento T2: para *Raphanus sativus*, *Beta vulgaris* y *Lactuca sativa* presentan una toxicidad baja con (-0.17), (-0.16) y (-0.21), por otro lado, el tratamiento T5: 1600 ppm para *Raphanus sativus*, *Beta vulgaris* y *Lactuca sativa* presento una toxicidad moderada con (-0.67), (-0.54) y (-0.48). a medida que la concentración se incrementa la toxicidad aumenta.

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

Se evaluó el desarrollo de citotoxicidad de los líquenes en los extractos acuosos y etanólicos frente a organismos específicos como las semillas de la lechuga (*Lactuca sativa*), beterraga (*Beta vulgaris*) y rabanito (*Raphanus sativus*) por varios ensayos. Al evaluar los efectos tóxicos se pudo observar que disminuía el crecimiento de la longitud del control testigo (negativo).

Quispe Choquehuanca, 2019, (26) realizó una investigación citotóxica y genotoxicidad de garbancillo Cav en bioensayos de *Lactuca sativa*, *Beta vulgaris*, *Raphanus sativus*. En cuanto a la elongación de la raíz en la inhibición de crecimiento el 80.3 % para la concentración más alta en el 1600ppm lo cual entre los grupos de control hubo una diferencia altamente significativa, en cuanto a su porcentaje de inhibición del crecimiento de la radícula e hipocótilo hubo una diferencia significativa.

Jaramillo O, Cristina, 2018 (13) el extracto etanólico y metanólico de *Usnea* existió una diferencia significativa en cada uno de los extractos obteniéndose un porcentaje de inhibición al 0.5% siendo 84.11% para extracto etanólico de *Usnea Laevis* y 91.54% para el extracto metanólico de *Usnea Laevis*.

En el **porcentaje de germinación** promedio para todos los ensayos fue menor al poder germinativo inicial de las semillas. El crecimiento del embrión inactivo en la semilla comienza como consecuencia de un proceso trifásico de inhibición del agua de las semillas que finalmente provoca un desprendimiento de la cubierta de la semilla y la aparición de radícula (protrusión). De hecho, la inhibición del agua en las semillas se asocia con la transición de la etapa de reposo metabólicamente inactiva a la etapa de división rápida, donde las células de la fase G1 cambian a la fase G2 que procede a la división celular y el posterior crecimiento de la radícula (**Quispe Choquehuanca, 2019** . (26)

La eficacia de las semillas que no logran la germinación se puede observar con una prueba tetrazolium para viabilidad de esta forma fijar con más seguridad la inhibición de la germinación, la importancia y el valor de un efecto letal.

(Sobrero, Ronco, 2004) (58)

Quispe Choquehuanca, 2019, (26) los resultados obtenidos muestran que los tratamientos T5 (1600ppm) para las tres plántulas presenta el índice de germinación más bajo de (4.44, 5.08, 8.55) las diferencias del IG se observaron respecto al control negativo.

Los valores de **Índice de germinación residual normalizado (IGN)** se puede observar que a un tratamiento de T2 hay una moderada toxicidad y aun tratamiento de T5 es una toxicidad muy alta.

Los valores de Índice de elongación radicular normalizado (IER) mostro que en los tratamientos de T2 se considera como una toxicidad moderada, mientras que en los tratamientos T5 con una toxicidad alta. En general puede inferirse que en la toxicidad el (IGN) (IER) son muy parecidas en las plántulas.

Rodríguez Romero AJ, 2014. (15) El IGN indican si hay un gradiente de toxicidad moderada, y baja y en el lugar alto presenta (-0.5 en el sitio E1) mientras que en la parte baja (-0.21 en el sitio E5) del rio Calma. En total, la toxicidad más baja se mostró en el sitio E3 y esto va incrementándose hacia el lugar de E4. En los valores de IER muestran que en lugar E1, E2, E3 dan valores

positivos en un orden de: E2 (0.39) > E3 (0.35) > E1 (0.19), que da unos valores positivos en la estimulación del desarrollo de la radícula e hipocótilo. Se llega a una conclusión de que los lugares de E4 y E5 presentan una moderada toxicidad mientras que en el lugar de E6 presentan una baja toxicidad.

4.4.2-. Análisis de varianza (ANOVA)

Tabla 15: Resultado del análisis de varianza de la elongación

PRUEBA		F CALCULADO	F TEORICO	P	RESULTADOS
<i>Raphanus sativus</i>	Radícula	33,4303969	4,387374187	0,000262479	Se acepta Ha
	Hipocótilo	11,79982751	4,387374187	0,004635777	Se acepta Ha
<i>Beta vulgaris</i>	Radícula	32,13860594	4,387374187	0,000293732	Se acepta Ha
	Hipocótilo	3,872923781	4,387374187	0,064880206	Se acepta Ha
<i>Láctuca sativa</i>	Radícula	14,9063407	4,387374187	0,002490016	Se acepta Ha
	Hipocótilo	10,05496142	4,387374187	0,007020523	Se acepta Ha

Fuente: Datos estadísticos

Leyenda:

H0: Las diferentes concentraciones producen el mismo efecto sobre la elongación de la radícula e hipocótilo.

Ha: Las diferentes concentraciones producen diferente efecto sobre la elongación de la radícula e hipocótilo.

Si $p < 0.05$ se rechaza H0 y se acepta Ha.

Tabla 16: Resultado del análisis de varianza de la germinación

PRUEBA	F CALCULADO	F TEORICO	P	RESULTADO
<i>Raphanus sativus</i>	53,64325651	4,387374187	6,70606E-05	Se acepta Ha
<i>Beta vulgaris</i>	81,34725656	4,387374187	1,98319E-05	Se acepta Ha
<i>Lactuca sativa</i>	9,615669933	4,387374187	0,007869459	Se acepta Ha

Fuente: Datos estadísticos

Leyenda:

H0: Las diferentes concentraciones producen el mismo efecto sobre la germinación de la radícula e hipocótilo.

Ha: Las diferentes concentraciones producen diferente efecto sobre la germinación de la radícula e hipocótilo.

Si $p < 0.05$ se rechaza H0 y se acepta Ha

Tabla 17: Resultado del análisis de varianza del índice de germinación

PRUEBA	F CALCULADO	F TEORICO	P	RESULTADO
<i>Raphanus sativus</i>	64,1609682	4,387374187	3,97766E-05	Se acepta Ha
<i>Beta vulgaris</i>	30,01586114	4,387374187	0,000356811	Se acepta Ha
<i>Lactuca sativa</i>	0,000293014	4,387374187	0,000293014	Se acepta Ha

Fuente: Datos estadísticos

Leyenda:

H0: Las diferentes concentraciones producen el mismo efecto sobre el índice de germinación de la radícula e hipocótilo.

Ha: Las diferentes concentraciones producen diferente efecto sobre el índice de germinación de la radícula e hipocótilo.

Si $p < 0.05$ se rechaza H0 y se acepta Ha

Análisis e interpretación

Se puede observar que en la tabla 17 el F calculado es superior al F teórico, por lo tanto, se impugna la hipótesis nula (H0) y se accede la Hipótesis alterna (Ha), concluyendo, distintas concentraciones poseen distintos resultados en las semillas. Según la tabla se aprecia que se encontró una diferencia estadísticamente significativa (< 0.05). Así se concluye que cada una de las diferentes concentraciones tiene un efecto distinto sobre las semillas de lechuga, betarraga y rabanito (*Lactuca sativa L*, *Beta vulgaris* y *Raphanus sativus*) que a medida que aumenta la concentración, se aumenta el porcentaje de inhibición.

4.4.3-. Concentración de inhibición media

Tabla 18: Concentración de inhibición media (CI50-120) de la *Ramalina* en *Lactuca sativa*, *Beta vulgaris* y *Raphanus sativus*.

CONCENTRACION DE INHIBICION MEDIA (CI50-120)			
Probability	<i>Beta vulgaris</i>	<i>Lactuca sativa</i>	<i>Raphanus sativa</i>
	CI50-120 (ppm)		
IC/EC 1.00	13.029	.289	5.907
IC/EC 5.00	38.133	1.894	19.711
IC/EC 10.00	67.599	5.157	37.471
IC/EC 15.00	99.469	10.137	57.800
IC/EC 50.00	509.320	176.645	361.266
IC/EC 85.00	2607.915	3078.213	2258.008
IC/EC 90.00	3837.466	6051.229	3483.027
IC/EC 95.00	6802.631	16478.642	6621.310
IC/EC 99.00	19909.944	107908.354	26546.554

Fuente: Datos estadísticos

Análisis e interpretación

En la tabla 18 la concentración letal media de la *Ramalina* extraído en extracto acuoso que inhiben el 50% en las plántulas *Beta vulgaris*, *Lactuca sativa*, *Raphanus sativus* es 509.320, 176.645 y 361.266 ppm respectivamente siendo la especie *Lactuca sativa* la más sensible, porque a menor concentración inhibe más del 50%.

Tabla 19: Concentración de inhibición media (CI50-120) de la *Usnea* en *Lactuca sativa*, *Beta vulgaris* y *Raphanus sativus*.

CONCENTRACION DE INHIBICION MEDIA (CI50-120)			
Probability	<i>Beta vulgaris</i>	<i>Lactuca sativa</i>	<i>Raphanus sativa</i>
	CI50-120 (ppm)		
IC/EC 1.00	19.967	2.614	27.394
IC/EC 5.00	68.227	16.598	75.002
IC/EC 10.00	131.351	44.462	128.310
IC/EC 15.00	204.349	86.438	184.328
IC/EC 50.00	1324.161	1437.129	852.768
IC/EC 85.00	8580.441	23893.829	3945.213
IC/EC 90.00	13348.944	46452.018	5667.620
IC/EC 95.00	25699.633	124431.234	9695.895
IC/EC 99.00	87814.076	790032.937	26546.554

Fuente: Datos estadísticos

Análisis e interpretación

En la tabla 19 la concentración letal media de la *Usnea* extraído en extracto acuoso que inhiben el 50% en las plántulas *Beta vulgaris*, *Lactuca sativa* y *Raphanus sativus* y es de 1324.161, 1437.129 y 852.768 ppm respectivamente siendo la especie *Raphanus sativus* la más sensible.

Análisis y discusión

Quispe Choquehuanca, 2019 (26), determinó la CL50 de todos los alcaloides que son extraídos de las hojas de *Astragalus garbancillo Cav "Salcca salcca"* de las especies biológicas de *Lactuca sativa*, *Beta vulgaris* y *Raphanus sativus* que, de 233.190, 257.865 y 636.634 ppm respectiva en donde la *Lactuca sativa* es la más sensible.

Navarro Guarachi; 2010,p (16) La evaluación de CL50 del ácido úsnico permite clasificar según la prueba Probit como DL50 776.25 mg/kg y según el matemático Reed Muench según este método es ligeramente tóxico ≤ 5000 mg/kg, categorización garantiza los resultados obtenidos.

4.5 Prueba de citotoxicidad en *Allium cepa* de los extractos acuosos y etanólicos de dos especies de líquenes *Usnea sp.* y *Ramalina*

4.5.1-. Registro de signos de fitotoxicidad.

Tabla 20: Cuadro comparativo de los efectos de la exposición de los extractos acuosos y etanólicos de la especie *Usnea sp.*

Parámetro	Extracto acuoso						Extracto etanólico al 70%					
	control-	200 ppm	400 ppm	800 ppm	1600 ppm	control +	control-	200 ppm	400 ppm	800 ppm	1600 ppm	control +
Longitud de raíz	Delgada y muy larga	Delgada	Delgada	Gruesa	Gruesa y pequeña	Gruesa y pequeña	Gruesa	Gruesa	Gruesa y pequeña	Gruesa y pequeña	Gruesa y pequeña	Gruesa y pequeña
Turgencia	Muy duras	Muy duras	Duras	Semiduras	Semiduras	Semiduras	Duras	Duras	Duras	Duras	Semiduras	Semiduras
Forma de Raíz	Rectas	Semirectas	Encrespadas	Encrespadas	Encrespadas	Dobladas	Rectas	Rectas	Rectas	Rectas	Rectas	Rectas
Cambio de color	Blancas	Blancas	Amarillentas	Amarillentas	Marrón	Parduzco	Amarillentas	Amarillentas	Parduzco	Parduzco	Parduzco	Parduzco
Anomalías apicales	No	No	No	No	Puntas necrosadas	Puntas necrosadas	Puntas necrosadas	Puntas necrosadas	Puntas necrosadas	Puntas necrosadas	Puntas necrosadas	Puntas necrosadas

Fuente: Elaboración propia de los datos experimentales

Tabla 21: Cuadro comparativo de los efectos de la exposición de los extractos acuosos y etanólicos de la especie *Ramalina*.

Parámetro	Extracto acuoso						Extracto etanólico al 70%					
	control-	200 ppm	400 ppm	800 ppm	1600 ppm	control +	control-	200 ppm	400 ppm	800 ppm	1600 ppm	control +
Longitud de raíz	Delgada	Delgada	Delgada	Gruesa	Gruesa y pequeña	Gruesa y pequeña	Gruesa	Gruesa	Gruesa y pequeña	Gruesa y pequeña	Gruesa y pequeña	Gruesa y pequeña
Turgencia	Muy duras	Duras	Duras	Semiduras	Semiduras	Semiduras	Duras	Duras	Duras	Duras	Duras	Semiduras
Forma de Raíz	Rectas	Semirrectas	Semirrectas	Encrespadas	Encrespadas	Dobladas	Rectas	Rectas	Rectas	Rectas	Rectas	Rectas
Cambio de color	Blancas	Blancas	Blancas	Amarillentas	Marrón	Parduzco	Amarillentas	Amarillentas	Parduzco	Parduzco	Parduzco	Parduzco
Anomalías apicales	No	No	No	No	Puntas necrosadas	Puntas necrosadas	Puntas necrosadas	Puntas necrosadas	Puntas necrosadas	Puntas necrosadas	Puntas necrosadas	Puntas necrosadas

Fuente: Elaboración propia de los datos experimentales

Análisis y discusión

Signos de fitotoxicidad. Este es un parámetro macroscópico donde las raíces a diferentes concentraciones mostraron alta sensibilidad, con efectos específicos (Tabla 20, Tabla 21), en la morfología de la raíz se muestran engrosamiento, fragilidad y oscurecimiento y en algunas raíces a medida que aumenta la concentración en el extracto acuoso; en cambio en el extracto hidroalcohólico al 70% no se presenta variación de acuerdo a las concentraciones.

Quispe Choquehuanca, 2019 (26), presentó los niveles de los parámetros fisicoquímicos (morfología de las puntas de las raíces y el color de las puntas de las raíces). Estos resultados muestran que todas las concentraciones probadas los extractos acuosos y etanólicos al 70% de dos especies de 2 líquenes (*Usnea* Y *Ramalina*) ocasionaron inhibición en el crecimiento de las raíces a comparación con el control negativo se utilizó concentraciones de 200 ppm, 400 ppm, 800 ppm, 1600 ppm. La raíz tratada con 200 ppm se observó de color blanco, la raíz tratada con 400 ppm se observó ligeramente amarillo con puntas necrosadas y las raíces tratadas a 800 ppm y 1600 ppm mostro una clara diferencia en su apariencia en que se volvió color parduzco con presencia de anomalías apicales, indicando que a medida que se aumentan las concentraciones de este, mayores daños son observados. También se observa que en el extracto etanólico al 70% a diferentes concentraciones no se mostró gran crecimiento de las raíces de *Allium cepa*.

4.5.2-. Promedio del crecimiento radicular.

Tabla 22: Datos de crecimiento radicular en *Allium cepa* de la especie *Usnea sp.*

TRATAMIENTO	CRECIMIENTO RADICULAR (CM) EXTRACTO ACUOSO			PROMEDIO GENERAL X±SD	CRECIMIENTO RADICULAR (CM) EXTRATO HIDROALCOHOLICO			PROMEDIO GENERAL X±SD
	R1	R2	R3		R1	R2	R3	
T1 CONTROL NEGATIVO	4.8	4.7	4.5		1.6	1.5	1.2	
	4.7	4.8	4.4		1.3	1.4	1.1	
	4.8	4.5	4.3		0.9	1.0	1.0	
X±SD	4.8	4.7	4.4	4.6	1.3	1.3	1.1	1.2
T2 200 PPM	4.5	4.5	4.3		0.9	0.8	1.0	
	4.6	4.3	4.2		1.1	0.7	0.9	
	4.3	4.4	4.1		0.8	1.0	0.7	
X±SD	4.5	4.4	4.2	4.4	0.9	0.8	0.9	0.9
T3 400 PPM	4.1	4.2	3.9		1.0	0.8	0.6	
	3.9	4.3	3.5		0.8	0.7	0.5	
	3.8	3.9	3.6		0.7	0.6	0.7	
X±SD	3.9	4.1	3.7	3.9	0.8	0.7	0.6	0.7
T4 800 PPM	3.2	3.1	3.0		0.6	0.5	0.4	
	3.1	3.0	2.8		0.5	0.6	0.5	
	3.0	2.9	2.7		0.4	0.3	0.4	
X±SD	3.1	3.0	2.8	3.0	0.5	0.5	0.4	0.5
T5 1600 PPM	2.5	2.4	2.3		-	-	-	
	2.4	2.3	2.1		-	-	-	
	2.3	2.1	2.0		-	-	-	
X±SD	2.4	2.3	2.1	2.3				
T6 CONTROL POSITIVO	1.5	1.6	1.5		-	-	-	
	1.7	1.4	1.3		-	-	-	
	1.4	1.3	1.2		-	-	-	
X±SD	1.5	1.4	1.3	1.4				

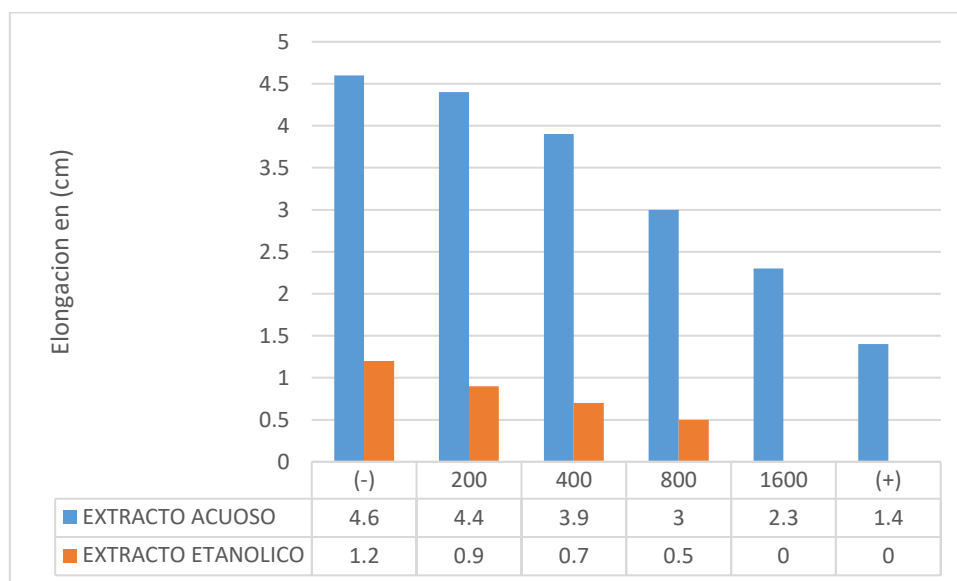
Fuente: Elaboración propia de los datos experimentales

Tabla 23; Datos de crecimiento radicular en *Allium* cepa de la especie *Ramalina*.

TRATAMIENTO	CRECIMIENTO RADICULAR (CM) EXTRACTO ACUOSO			PROMEDIO GENERAL X±SD	CRECIMIENTO RADICULAR (CM) EXTRATO HIDROALCOHOLICO			PROMEDIO GENERAL X±SD
	R1	R2	R3		R1	R2	R3	
T1 CONTROL NEGATIVO	4.5	4.0	3.7		1.5	1.6	1.4	
	4.3	3.7	3.6		1.7	1.4	1.3	
	4.2	3.5	3.7		1.5	1.3	1.1	
X±SD	4.3	3.7	3.7	3.9	1.6	1.4	1.3	1.4
T2 200 PPM	3.4	3.1	2.9		1.3	1.2	0.9	
	3.4	3.0	2.8		1.5	1.3	0.8	
	3.2	2.9	3.1		1.3	1.5	0.9	
X±SD	3.3	3.0	2.9		1.4	1.3	0.9	1.2
T3 400 PPM	2.9	2.8	2.5		0.8	0.9	0.7	
	2.5	2.5	2.1		0.7	0.6	0.5	
	2.7	2.2	2.4		0.8	0.7	0.6	
X±SD	2.7	2.5	2.3	2.5	0.8	0.7	0.6	0.7
T4 800 PPM	2.5	2.3	2.0		0.7	0.5	0.5	
	2.2	2.0	1.8		0.6	0.6	0.6	
	2.1	1.9	1.5		0.5	0.6	0.7	
X±SD	2.3	2.1	1.8	2.1	0.6	0.6	0.6	0.6
T5 1600 PPM	1.8	1.5	1.3		0.5	0.4	0.5	
	1.3	1.3	1.2		0.4	0.3	0.3	
	1.6	1.1	1.0		0.5	0.2	0.4	
X±SD	1.6	1.3	1.2	1.4	0.5	0.3	0.4	0.4
T6 CONTROL POSITIVO	1.1	1.5	0.9		0.6	0.4	0.4	
	1.0	1.3	0.7		0.4	0.5	0.3	
	0.9	1.0	0.8		0.5	0.4	0.3	
X±SD	1	1.3	0.8	1.0	0.5	0.4	0.3	0.4

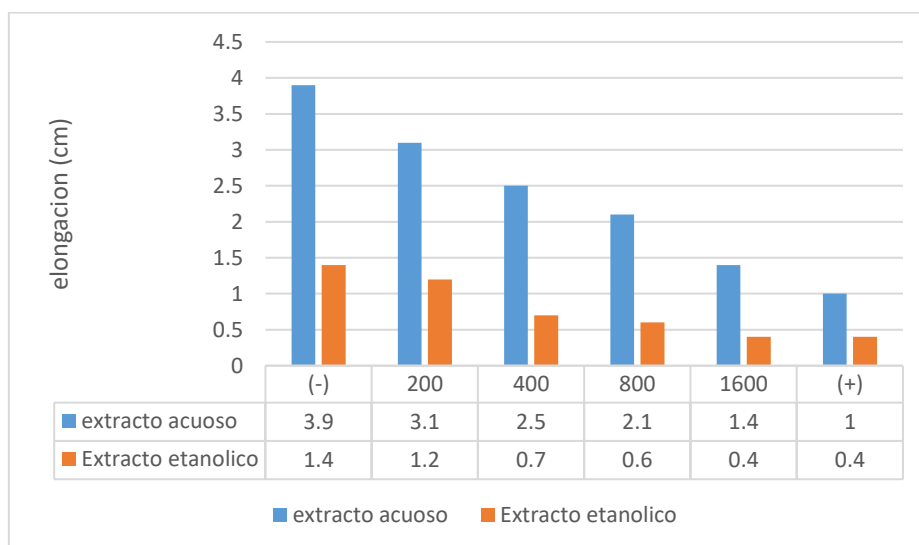
Fuente: Elaboración propia de los datos experimentales

Figura 21. Comparación de promedios del crecimiento radicular de *Allium cepa* expuestos a extractos de la *Usnea*.



Fuente: Elaboración propia a partir de resultados

Figura 22. Comparación de promedios del crecimiento radicular de *Allium cepa* expuestos a extractos de la *Ramalina*.



Fuente: Elaboración propia a partir de resultados

Análisis e interpretación

La prolongación longitudinal de raíces. Los bulbos de *Allium cepa* fue exhibida durante 72 horas en múltiples concentraciones de los extractos acuosos e hidroalcohólico al 70 % de la *Usnea*, se observó una disminución de crecimiento en la prolongación de las mismas, cuando la concentración en el

extracto acuoso; en cambio en el extracto hidroalcohólico se observó que en las diferentes concentraciones hubo un pequeño crecimiento en longitud de las raíces. Al comparar las dos tablas 22 - 23 y las dos figuras N° 21-22, no se encuentra mucha variación respecto a las especies de líquenes.

Mora Recinos P., 2012 (14) El efecto de toxicidad se determinó en forma indirecta, mediante la comparación de la elongación de las raíces de cebollas expuestas al extracto a ensayar contra las de cebollas no expuestas, luego de un período de 48 horas de prueba. La cuantificación del efecto se realizó estableciendo la longitud del crecimiento de los ápices y se calculó el promedio de crecimiento del total de ápices de cada cebolla. se puede observar que el extracto no presentó diferencia significativa con respecto al control negativo ($p > 0.05$), indicando que no presenta actividad citotóxica pues se obtuvo un alto porcentaje de crecimiento (94.5%).

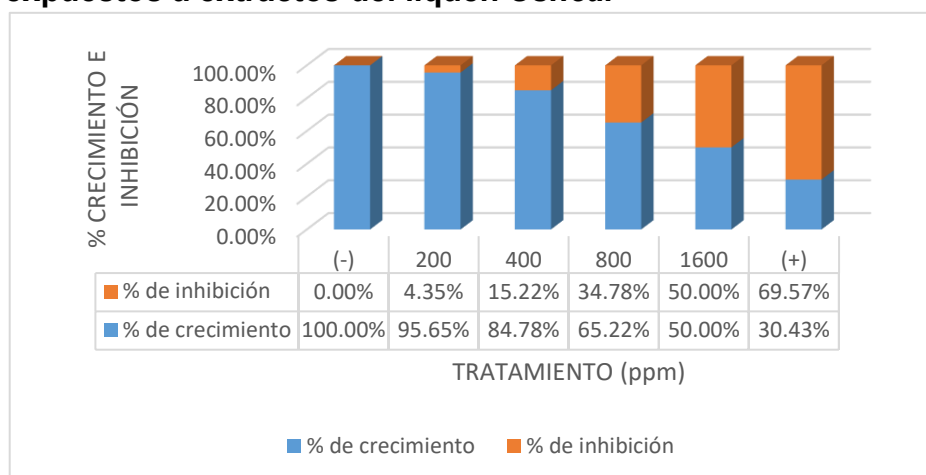
4.5.3-. Porcentaje del efecto de inhibición.

Tabla 24: Datos de % de crecimiento e inhibición de la longitud de raíces en prueba de sensibilidad en *Allium cepa* en el extracto acuoso del líquen *Usnea*.

Tratamiento	Promedio en longitud	% Crecimiento	% Inhibición
Control negativo	4.6	100	0
200 ppm	4.4	95.65	4.35
400 ppm	3.9	84.78	15.22
800 ppm	3	65.22	34.78
1600 ppm	2.3	50	50
Control positivo CuSO ₄ , Cu ⁺²	0	0	100

Fuente: Pruebas biológicas

Figura 23. Comparación de promedios del crecimiento radicular de *Allium cepa* expuestos a extractos del líquen *Usnea*.



Fuente: Elaboración propia

Análisis e interpretación.

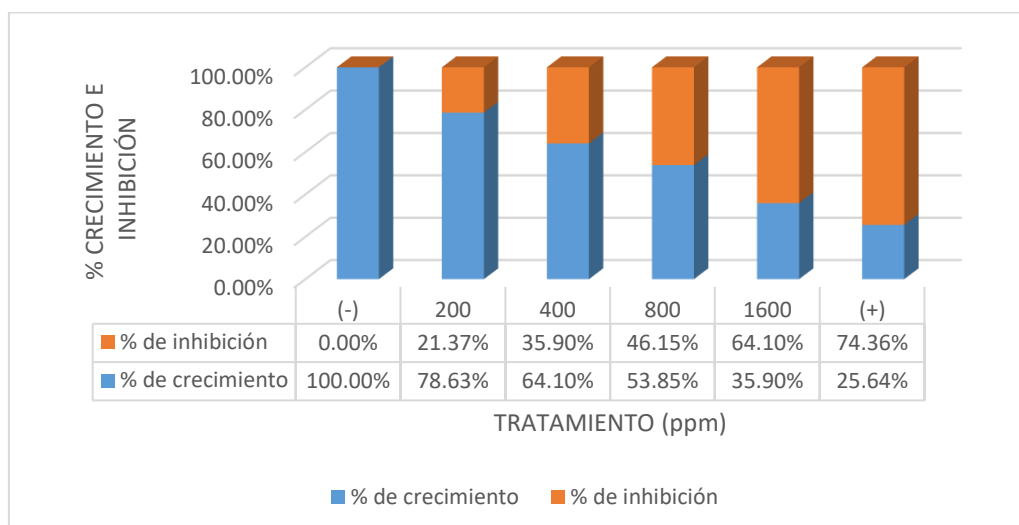
Inhibición significativa en las raíces de las cebollas tratadas con los extractos acuosos y etanólicos de dos especies de líquenes, en la tabla 24 y gráfico 23 se muestra (4.35%, 15.22%, 34.78% y 50%). Una disminución del crecimiento radicular más del 45% indica efectos “subletales” respecto a las plantas, ocasionando a las células a manifestar variaciones genéticas, así mismo originado el retraso en la prolongación radicular. (Causil V, Luis Alfredo). (17) En nuestros resultados se muestra que solo un dato es mayor al 45% el extracto de 1600ppm. esto indica que mientras mayor sea la concentración mayor retraso en el crecimiento radicular se presentara.

Tabla 25: Datos de % de crecimiento e inhibición de la longitud de raíces en prueba de sensibilidad en *Allium cepa* en el extracto acuoso del líquen *Ramalina*.

Tratamiento	Promedio en longitud	% Crecimiento	% Inhibición
Control negativo	3.9	100	0
200 ppm	2.5	64.10	35.90
400 ppm	2.1	53.85	46.15
800 ppm	1.4	35.90	64.10
1600 ppm	1	25.64	74.36
Control positivo CuSO ₄ , Cu ⁺²	0	0	0

Fuente: Pruebas biológicas

Figura 24. Comparación de promedios del crecimiento radicular de *Allium cepa* expuestos a extractos acuosos del líquen *Ramalina*.



Fuente: Elaboración propia a partir de resultados

Análisis e interpretación.

Inhibición significativa en las raíces de las cebollas tratadas con los extractos acuosos y etanólicos de dos especies de líquenes, en la tabla N°25 y grafico N°24 se muestra (35.90%, 46.15%, 64.10% y 74.36%). Una disminución del crecimiento radicular más del 45% indica efectos “subletales” sobre las plantas, generado la dilatación en el crecimiento radicular, de la misma forma alteraciones genéticas de las mismas. (Causil V, Luis Alfredo). (17) En nuestros resultados se muestra que solo un dato es menor al 45% el extracto de 200ppm. esto indica que mientras mayor sea la concentración mayor retraso en el crecimiento radicular se presentara.

A. Concentración de inhibición media CI_{50} .

Tabla 26. Concentración de inhibición media CI_{50-72} en *Allium cepa* extracto acuoso de *Usnea*

Probability	CI_{50-72} (ppm)
IC/EC 1.00	80.596
IC/EC 5.00	188.856
IC/EC 10.00	297.358
IC/EC 15.00	403.920
IC/EC 50.00	1474.767
IC/EC 85.00	5384.577
IC/EC 90.00	7314.199
IC/EC 95.00	11516.361
IC/EC 99.00	26985.664

Fuente: Datos estadísticos

Tabla 27: Concentración de inhibición media CI50-72 en *Allium cepa* extracto acuoso de *Ramalina*

Probability	CI50-72 (ppm)
IC/EC 1.00	11.228
IC/EC 5.00	39.974
IC/EC 10.00	78.664
IC/EC 15.00	124.203
IC/EC 50.00	856.733
IC/EC 85.00	5909.611
IC/EC 90.00	9330.737
IC/EC 95.00	18361.618
IC/EC 99.00	65372.744

Fuente: Datos estadísticos

Análisis y discusión

En la tabla 26 la concentración inhibitoria media del extracto acuoso del liquen *Usnea* que inhibe al 50 % de la especie biológica *Allium cepa* es de 1475.767 ppm. La toxicidad manifestada en unidades es de 0.068 UT, con ello se demuestra que es ligeramente tóxico. Así mismo en la tabla 27, la concentración inhibitoria media del extracto acuoso del liquen *Ramalina* que inhibe al 50 % de la especie biológica *Allium cepa* es de 856.733 ppm. La toxicidad manifestada en unidades es de 0.1168 UT, de la misma forma se demuestra que es ligeramente tóxico.

Mora Recinos P., 2012 (14). En el estudio de citotoxicidad en el extracto acuoso de cianobacterias se obtuvo un 94.5 % de crecimiento demostrando insignificancia, El análisis de varianza y la prueba de Dunnett indicaron que solamente el Paracuat® presentó efecto citotóxico significativo.

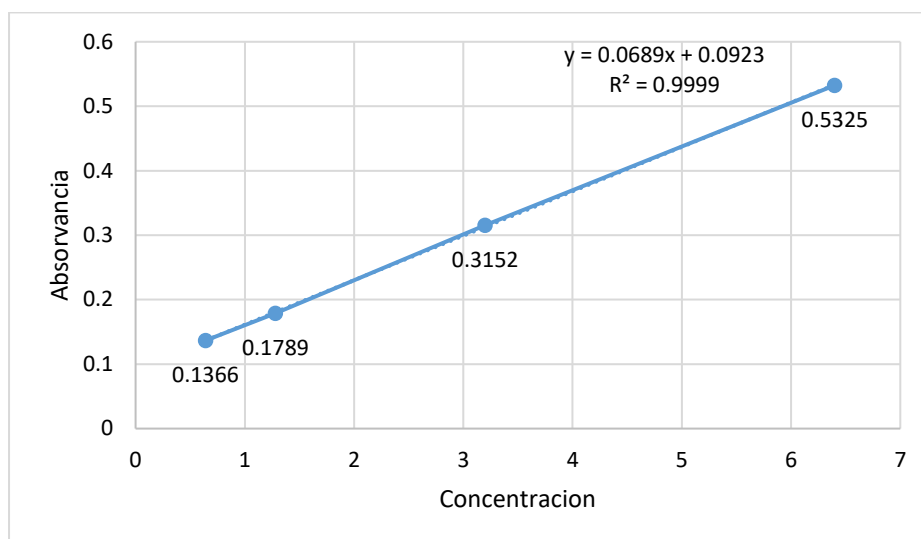
4.6 Cuantificación del ácido úsnico empleando el método de Espectrofotometría UV Visible de dos especies de líquenes (*Usnea sp.* y *Ramalina*), de la comunidad de Pacca, distrito de Anta- Cusco y comparar.

Tabla 28: Resultados obtenidos en el espectrofotómetro de rango de linealidad de la curva patrón.

Ácido úsnico patrón	
Concentración ppm	Absorbancia
0.64	0.1366
1.28	0.1789
3.2	0.3154
6.4	0.5325

Fuente: Elaboración propia de los datos experimentales.

Figura 25. Resultados obtenidos en el espectrofotómetro de rango de linealidad de la curva patrón



Se usó la técnica espectrofotométrica UV-V. La absorbancia máxima obtenida yació 284 nm demostrando a dicha longitud de onda no interfiere el solvente.

Tabla 29: Resultados de la lectura en el espectrofotómetro del líquen *Usnea*

líquen (USNEA)		
N° de lectura	Maceración en agua	Maceración alcohol al 70%
	Absorbancias	
1	0.3243	0.7858
2	0.2829	0.7531
3	0.3129	0.6978
4	0.2785	0.7438
Promedio	0.2996	0.7451

Fuente: Elaboración propia

Tabla 30: Lectura en el espectrofotómetro del líquen *Ramalina*

Líquen (RAMALINA)		
N° de lectura	Maceración en agua	Maceración alcohol al 70%
	Absorbancias	
1	0.1793	0.5858
2	0.1696	0.6531
3	0.1911	0.7478
4	0.1811	0.6238
Promedio	0.1803	0.6526

Fuente: Elaboración propia a partir de base de datos

Tabla 31 Cálculo de la cuantificación de ácido úsnico de *Usnea*

Concentración del promedio de las lecturas del líquen <i>Usnea</i>			
USNEA	Maceración en agua	Maceración alcohol al 70%	
	$y = 0.0689x + 0.0923$		
Donde: $y=0.2996$ $x= ?$ concentración en ppm	$\frac{0.2996 - 0.0923}{0.0689} = x$ $3.001 \text{ ppm} = x$	Donde: $y=0.7451$ $x= ?$ concentración en ppm	$\frac{0.7451 - 0.0923}{0.0689} = x$ $9.47 \text{ ppm} = x$

Fuente: Elaboración propia

Tabla 32 Cálculo de la cuantificación de ácido úsnico de *Ramalina*

Concentración del promedio de las lecturas del líquen <i>Ramalina</i>			
RAMALINA	Maceración en agua	Maceración alcohol al 70%	
	$y = 0.0689x + 0.0923$		
Donde: $y=0.1803$ $x=?$ concentración en ppm	$\frac{0.1803 - 0.0923}{0.0689} = x$ $1.27 \text{ ppm} = x$	Donde: $y=0.6526$ $x= ?$ concentración en ppm	$\frac{0.6526 - 0.0923}{0.0689} = x$ $8.13 \text{ ppm} = x$

Fuente: Elaboración propia

Análisis e interpretación.

La tabla N° 28, Grafico N°25 se muestra los resultados de la lectura de las absorbancias a 284nm con dichos datos obtenidos se determina la zona de linealidad que se muestra en la figura N° 25. En la tabla N° 29 y en Anexo N° 16 se muestra la lectura de absorbancias del líquen *Usnea* macerados en agua y alcohol, obteniendo como 9.47 ppm de ácido úsnico en el extracto alcohólico y un 3.001 ppm en el extracto acuoso. Concluyendo que la concentración de ácido úsnico se encuentra más en el macerado alcohólico que en el macerado con agua.

En la tabla N° 30 y anexo N° 16 se observa las absorbancias del líquen *Ramalina* macerados en agua y alcohol al 70%. Donde muestra como resultado en el extracto alcohólico una concentración de 8.13 ppm de ácido Úsnico y en el extracto acuoso 1.27 ppm. Concluyendo que en extracto alcohólico muestra mayor concentración de ácido Úsnico a

comparación del extracto en agua. Mostrando que el líquen *Usnea* tiene mayor concentración de ácido úsnico en comparación de líquen *Ramalina* que se puede corroborar con los resultados del ANOVA en el anexo N°15. En la tabla 31 y 32 se puede observar el cálculo de la concentración del promedio de las lecturas en maceración de agua y alcohol al 70% de *Usnea sp* y *Ramalina* según el rango de linealidad de la curva patrón.

Según **Nino Mandujano,2010** (57); Demostró que los líquenes de la familia *Parmeliaceae* son las que presentan mayor suma de ácido úsnico con 0,30-0,35, por otra parte, las familias (*siphulaceae*, *stereocaulaceae*, *cladoniaceae*) representan únicamente 0,07 hasta 0,12% de ácido úsnico. Con ello concluye que todos los líquenes ensayados contienen ácido úsnico en desigualdades proporciones.

CONCLUSIONES

1. Los extractos acuosos y etanólicos al 70% de las dos especies de líquenes *Usnea* y *Ramalina* exhiben citotoxicidad en diferentes bioensayos y así mismo se logró cuantificar el ácido úsnico.
2. Se logró recolectar los líquenes *Usnea sp* y *Ramalina sp* en la comunidad de Pacca Provincia de Anta y fue certificada por el Herbario Vargas.
3. Respecto al conocimiento acerca de los líquenes en los pobladores de la comunidad Pacca se observó que de las 40 personas entrevistadas 33 personas indicaron que conocían los líquenes, de éstas solo 29 personas les dan un uso medicinal, ornamental y como tinte natural de lana y 4 personas no los usan, pero si conocen los líquenes.
4. Al realizar el análisis fitoquímico de los extractos etanólico y acuoso de los líquenes *Ramalina* y *Usnea sp* se identificó metabolitos secundarios como flavonoides, triterpenos, fenólicos y taninos por medio de diferentes pruebas de coloración y precipitación.
5. La citotoxicidad para el liquen *Ramalina* en *Artemia salina* con el extracto acuoso presenta una toxicidad alta de 93.548 ppm y toxicidad moderada con el extracto etanólico, en cambio para el liquen *Usnea sp.* con el extracto acuoso según CYTED presenta una toxicidad alta con 95.39 ppm de concentración letal media Cl_{50} y una toxicidad moderada con el extracto etanólico.
6. La citotoxicidad en semillas de los extractos acuosos de *Ramalina* logra una concentración inhibitoria media Cl_{50} de 89.038 ppm para *Lactuca sativa* mostrando que la especie es la más sensible y altamente tóxica, la *Usnea sp* como concentración inhibitoria media Cl_{50} de 97.617 ppm para *Beta vulgaris* siendo la especie altamente tóxica según CYTED.
7. La citotoxicidad de los extractos acuosos de liquen *Usnea* en *allium cepa* expresada como concentración inhibitoria media Cl_{50} fue de 50.57ppm en unidades tóxicas este valor es ligeramente tóxico. Y para la *Ramalina* en extracto acuoso en *Allium cepa* expresada como concentración inhibitoria media Cl_{50} fue de 64.3662 ppm. También se observa que a mayor concentración del extracto será más tóxico.
8. La cuantificación del ácido úsnico presente en las dos especies de líquenes muestran como resultado lo siguiente; en el extracto alcohólico del liquen *Usnea* se obtuvo una concentración de 9.47 ppm de ácido úsnico, en cambio en la especie del liquen *Ramalina* se obtuvo una concentración de 8.13 ppm de ácido úsnico presente en dicho liquen. Al comparar ambas especies se concluye que el liquen *Usnea* tiene mayor proporción de ácido úsnico.

SUGERENCIAS

A LAS AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

1. Incentivar en la investigación y dar mayor importancia a la investigación científica con Líquenes de nuestra región, desarrollando e implementando centros de investigación de Líquenes que puedan cubrir las exigencias de nuestro país.
2. Motivar el estudio de líquenes para la identificación de más acciones farmacológica ya que poseen varios metabolitos aún sin identificar y esto sería de gran utilidad para la sociedad y la medicina.
3. Implementar un centro de investigación de líquenes, por sus efectos benéficos que posee esta especie.

A LOS DOCENTES DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

1. Fomentar la investigación de líquenes a todos los estudiantes, así como enseñarles a trabajar en un equipo multidisciplinario para de esta manera aprovechar la abundante variedad de líquenes que poseemos en nuestra región.
2. Impulsar en los seminarios sobre metodología de investigación en líquenes para que los estudiantes puedan tener una mayor visión en propiedades medicinales que los líquenes puedan tener.
3. Realizar proyectos de investigación de la variedad de líquenes que tenemos en la región de Cusco.

A LOS ALUMNOS DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

1. Realizar más estudios sobre mas propiedades medicinales atribuidos a las especies liquénicas.
2. Realizar otros tipos de estudios que permitan confirmar la actividad citotóxica y genotóxica.
3. Investigar más acerca de la acción antimicrobiana, antifúngica, antioxidante, anticancerígena ya que al recopilar información acerca de los líquenes contaban con estas acciones.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Mandujano Castro N, et al. Estudio fotoquímico del Liquen everniopsis trulla y la determinación de la actividad antioxidante. aporte santiaguino. 2017; 10(1).
2. Cabrera Romero. Estudio fitoquímico de liquen *Thamnolia vermicularis* (Sw.) Ach. ex Schaer) en la provincia del Azuay. studio fitoquímico de liquen *Thamnolia vermicularis* (Sw.) Ach. ex Schaer) en la provincia del Azuay. [Online].; Ecuador-2018 [cited 2020 mayo 21. Available from: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/28875/1/Trabajo%20de%20Titulaci%C3%B3n.pdf>.
3. Nuñez Zapata J. Líquenes de inkaterra hotel- cusco y alrededores. [Online]. Lima; 2008 [cited 2020 Marzo 30. Available from: inkaterra.com/inkaterra-asociacion-org/wp-content/uploads/2013/12/Informe-Final-Líquenes-MAPI.pdf.
4. Pino O. Ensayo de *Artemia* salina: Util herramienta de trabajo para ecotóxicólogos y químicos de productos naturales. Proteccion vegetal. 2010 Enero; 22(34-43).
5. Carrio Ayuso L. Aplicación del liquen para el ser humano. trabajo de tesis. Madrid: Universidad Complutense, Facultad de Farmacia.
6. Perez S. liquency.org. [Online]. [cited 2020 octubre 23. Available from: <https://liquency.org/que-son-los-líquenes/>.
7. Callupe Vargas N. Universidad Nacional Agraria de la Selva. [Online]. Tingo Maria; 2018 [cited 2020 noviembre 2. Available from: https://web2.unas.edu.pe/sites/default/files/web/archivos/actividades_academicas/pr%C3%A1cticas%20pre%20profesionales.pdf.
8. Michael UC. Líquenes. México: Universidad Autónoma de Yucatan, Campus de Ciencias Biologicas y Agropecuarias.
9. Vaillant Flores D. Los líquenes, una alternativa para el control de fitopatógenos. Fitosanidad. 2014 Abril; XVIII(51-57).
10. Barrales Cureño H. Importancia de los líquenes como bioindicadores ambientales y fuente promisor de compuestos anticancer. AP Agro Productividad. 2017 octubre; 10.
11. Carballal Metro R, et al. Introducción a los líquenes. [Online]. [cited 2019 noviembre 25. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/259638914>.
12. Rodríguez O, Andrade W, et al.2015 [cited 2019 noviembre 13. Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v13n23/v13n23a06.pdf>.
13. Jaramillo Ordoñez C. Evaluación de la actividad antifúngica del extracto de *Usnea laevis* en hongos fitopatógenos. Tesis. Ecuador: Universidad Central de Ecuador, Ciencias Biológicas; 2018.
14. Mora Recinos, P. Actividad biocida y estudios de toxicidad de extractos de cianobacterias que se encuentran sobrepobladas en rio Atilan. Tesis. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala; 2012.
15. Rodriguez Romero A. Indices de germinación y elongación radical de *lactuca sativa* en el biomonitorio de la calidad del agua del rio chalma. México: Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas; 2014.
16. Navarro Guarachi E. Determinacion de la actividad Leishmanicida, tripanocida in vitro y valoración de la toxicidad aguda del ácido úsnico in vivo. Tesis. Bolivia: Universidad Mayor de San Andres, Facultad de Ciencias Farmaceuticas y Bioquímicas; 2010.

17. Causil V, Luis Alfredo. Efecto citotóxico del hipoclorito de sodio (NaClO), en células apicales de raíces de cebolla (*Allium cepa* L.). Colombia; 2017.
18. Vaca Meza E. Evaluación de la citotoxicidad en *Artemia salina* del extracto acuoso de las hojas de *Piper aduncum* L. Tesis. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo, Facultad de Farmacia y Bioquímica; 2019.
19. Bardales S, Lozano G. Repositorio Universidad Nacional de Trujillo. [Online]. Trujillo; 2019 [cited 2020 agosto 20]. Available from: <http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/12353/Bardales%20Chavez%20Sandra%20Fiorella.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
20. Mamani Quispe D. Efecto de cuatro concentraciones del extracto acuoso de hojas y flores de *Brassica rapa* L. en el ciclo celular de meristemos radiculares de *Allium sativum* L. Tesis. Puno: Universidad Nacional del Altiplano, Facultad de Ciencias Biológicas; 2017.
21. Espinoza C, Martine R. Evaluación de la toxicidad aguda producida por amoxicilina, dexametasona y diclofenaco, en *Lactuca sativa*. Tesis. Huancayo: Universidad Privada de Huancayo Franklin Roosevelt, Facultad de Ciencias de la Salud; 2016.
22. Marino, Edgar. Repositorio Universidad Nacional de Cajamarca. [Online]. Cajamarca; 2016 [cited 2020 enero 2]. Available from: <http://repositorio.unc.edu.pe/bitstream/handle/UNC/1305/Determinacion%20de%20líquenes.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
23. Velazco Salazar N. Aislamiento y elucidación estructural de los metabolitos bioactivos del líquen *Usnea aurantiacoatra* y su actividad antibacteriana. Tesis. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Escuela Profesional de Química; 2020.
24. Popovici Veá. Evaluación de la actividad citotóxica del extracto seco de la *Usnea Barbata* FH Wigg. *Moleculas*. 2021 Abril;(8).
25. Mujica J, Palomares A. Estudio etnobotánico, etnofarmacológico, Análisis fitoquímico y determinación de la bioactividad de las plantas medicinales. Tesis para optar al título profesional. Cusco: Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Facultad de ciencias de la salud; 2009.
26. Quispe Choquehuanca L. Citotoxicidad Genotoxicidad de los Alcaloides totales extraídos de la hoja de *Astragalus garbancillo* Cav. ``Salcca salcca`` en Bioensayos. Tesis para optar al título. Cusco: Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Facultad de Ciencias de la Salud; 2019.
27. Ambrosio MX. Repositorio Universidad Privada Antonio Guillermo Urrelo. [Online]. Cajamarca; 2017 [cited 2019 diciembre 20]. Available from: <http://repositorio.upagu.edu.pe/bitstream/handle/UPAGU/532/Evaluaci%C3%B3n%20de%20líquenes%20como%20bioindicadores%20de%20contaminaci%C3%B3n%20atmosf%C3%A9rica.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
28. Villamar Valdivia O. Evaluación de la calidad del aire mediante el índice de pureza ambiental y el análisis de metales pesados en el líquen *xanthoparmelia* sp. en la ciudad de puno. Tesis para optar al título. Repositorio de la Universidad del Altiplano Puno. [Online]. Puno; 2018 [cited 2019 diciembre 01]. Available from: http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/10169/Villamar_Valdivia_Oskar_Guillermo.pdf?sequence=3&isAllowed=y.
29. Matías Marin M. Líquenes [Online].; 2015 [cited 2019 noviembre 13]. Available from: <http://www.ugr.es/~cjl/líquenes.pdf>.

30. Nuñez Zapata A, Vela Clavo M. Líquenes de inkaterra hotel - Cusco y . Informe final [Online]. [cited 2019 octubre 31. Available from: <https://www.inkaterra.com/inkaterra-asociacion-org/wp-content/uploads/2013/12/Informe-Final-Líquenes-MAPI.pdf>.
31. Arenas J. Repositorio Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann de Tacna. [Online]. Tacna; 2017 [cited 2019 octubre 31. Available from: http://repositorio.unjbg.edu.pe/bitstream/handle/UNJBG/3156/1262_2017_arenas_p_arijuana_il_faci_biologia_microbiologia.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
32. Zelada R, Pastor A. scielo. [Online].; 2012 [cited 2019 noviembre 20. Available from: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rsqp/v78n4/a06v78n4.pdf>.
33. Araujo Caviro Elena,. Repositorio de la Universidad Complutense de madrid. [Online]. Madrid; 2016 [cited 2019 noviembre 10. Available from: <https://eprints.ucm.es/36353/1/T36949.pdf>.
34. Chavez Castro, Gianmarco Isaac.Capacidad del Liqueen Fruticuloso (*Ramalina Farinacea*) para la bioacumulación de plomo. repositorio Cesar Vallejo. [Online].; 2017 [cited 2019 octubre 25. Available from: http://repositorio.ucv.edu.pe/bitstream/handle/UCV/10872/Chavez_CGI.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
35. Arroyo, Rosario; Serriña, Estela. Estudio químico y morfológico de *Ramalina*. BIOLVEG. [Online].; Málaga 1991 [cited 2019 octubre 28. Available from: http://www.biolveg.uma.es/abm/Volumenes/vol16/16_ARROYO.pdf.
36. Castro Mandujano, O. "aislamiento del ácido úsnico de *flavopermelia* y su determinación cuantitativa". 2010 [cited 2019 diciembre 30. Available from: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rsqp/v76n4/a09v76n4.pdf>.
37. Freire B, S. Citotoxicidad y mitosis. Scielo. [Online].; 2009 [cited 2020 octubre 30. Available from: https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/52501891/Mitosis_y_citotoxicidad_1.pdf?1491444089=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DMitosis_y_citotoxicidad_1.pdf&Expires=1604292508&Signature=V8pPAmSDvHDIfpqxPeIVwkXIE2kPwpqA0RMmpPL6BRmgkJWTNeShp7wc8.
38. Repetto M. Toxicología fundamental. Métodos alternativos, Toxicidad in vitro. III ed. Sevilla, España: Diaz de Santos; 2002.
39. Avalos Soto J. Actividad citotóxica y estudio fitoquímico de los extractos de semilla y hoja de Neem de origen regional comparada con la comercialización en la India. Tesis doctoral. México: Universidad Autonoma de Nuevo León; 2014.
40. Garcia, Mascaraque L. Potencial de los líquenes frente al cancer. Universidad Complutense, Facultad de Farmacia; 2019.
41. Megias Mea. La célula. Ciclo celular. España: Universidad de Vigo, Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud; 2017.
42. Cooper Geoffrey y Hausman Robert. La célula. quinta edición; 2015. Madrid-España
43. Loza Tavera H. Genética y biología molecular. Universidad Nacional Autónoma de México; 2010.
44. Nikoloff N. Genotoxicidad de herbicidas de importancia agroeconómica. Tesis. Argentina. Universidad Nacional de la Plata; 2013.
45. Ortuño BL, Rosa U. Ejecución de bioensayos y asistencia en estudios de impacto ambiental. Guía de aprendizaje. Educación en ciencia y tecnología del mar; 2009.

46. Herrera E. Determinación de la bioactividad de los aceites esenciales de quince especies vegetales, mediante bioensayos de *Artemia salina*. Universidad del Salvador, Facultad de Química y Farmacia; 2001.
47. Cañas Custodia A, Ramirez Avendaño, et al. Determinación de la bioactividad citotóxica in vitro de extractos de veinticinco especies vegetales mediante el ensayo de *Artemia salina*. Licenciado en Química y Farmacia. El Salvador: Universidad de El Salvador, Facultad de Química y Farmacia; 2003.
48. Ocampo, et al. Actividad tóxica de los extractos de la corteza de tallo de *Annona cherimoloides* (Annonaceae) sobre *Artemia salina*. Colombia: Universidad de Caldas; 2012.
49. Gorriti Gutierrez, Arillmi; Zarate Otorola, Rosa. "Bioensayos en especies de bodens con actividad terapéutica" Tesis de la facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor San Marcos. [Online]. [cited 2019 noviembre 28. Available from: http://sisbid.unmsm.edu.pe/bvrevistas/ciencia/v01_n2/bidens.htm.
50. Devnull. Biblioteca portalpez. [Online].; 2007 [cited 2007 Octubre 8. Available from: <http://biblioteca.portalpez.com/la-artemia-salina-vp15740.html>.
51. Laboratorios de Bioensayos de la facultad de ciencias naturales y oconografías de la Universidad de Concepcion. [Online].; 2002. Available from: http://www2.udec.cl/bioensayos/recursos_biologicos.html.
52. Solano, M. Taxonomía Vegetal.. Puno: Universidad Nacional del Altiplano, Escuela Profesional de Ingeniería Agropecuaria; 2015.
53. Andrioli, Nancy Beatriz. Evaluación de agentes químicos con potencial genotóxico en células meristemáticas de *Allium cepa*. Tesis Doctoral. Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales; 2011.
54. Dominguez Xorge, Alejandro. Métodos de investigación científica México: editorial limusa; 1979.
55. Barros Santiago C. Determinación de la concentración letal media, por bioensayos utilizando alvinos de trucha arcoiris. Tesis. Bogotá: Universidad De La Salle; 2015.
56. Pozo Marina. Aplicación de método biológico para evaluar la calidad de agua: germinación de semillas de *Lactuca sativa*. Licenciada en bromatología. Universidad Nacional de Cuyo, Facultad de Ciencias Agrarias; 2020.
57. Concha Cushuallà, B.,. Actividad antioxidante, citotoxicidad y toxicidad aguda del extracto hidroalcoholico seco de *Borago officinalis* (borrago). Tesis. Cusco: Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco; 2006.
58. Sobrero Cecilia, Ronco Alicia. Ensayos de toxicidad aguda con semillas de Lechuga *Lactuca Sativa L.*.
59. Diaz Baez, Ronco, Pica. Ensayo de toxicidad aguda con *Allium cepa L.* Mediante la evaluación de la inhibición del crecimiento promedio de raíces de cebolla. 2004..
60. Saetama Guallpa M. Evaluación toxicológica de soluciones acuosas de ibuprofeno y su posible remoción utilizando biomasa residual de tallos de rosas. Maestria. Ecuador: Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Químicas; 2017.

ANEXOS

ANEXO 1. CERTIFICADO DE HERBARIO VARGAS



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

- **APARTADO POSTAL**
N° 921 - Cusco - Perú
- **FAX:** 238156 - 238173 - 232512
- **RECTORADO**
Calle Tigrú N° 127
Teléfonos: 222271 - 224891 - 224181 - 254398
- **CIUDAD UNIVERSITARIA**
Av. De la Cultura N° 733 - Teléfonos: 228661 - 222512 - 232370 - 232375 - 232226
- **CENTRAL TELEFÓNICA:** 232398 - 252210
243835 - 243836 - 243837 - 243838
- **LOCAL CENTRAL**
Plaza de Armas s/n
Teléfonos: 227571 - 225721 - 224015
- **MUSEO INKA**
Cuesta del Almirante N° 103 - Teléfono: 237380
- **CENTRO AGRONÓMICO K'AYRA**
San Jerónimo s/n Cusco - Teléfonos: 277145 - 277246
- **COLEGIO "FORTUNATO L. HERRERA"**
Av. De la Cultura N° 721
"Estadio Universitario" - Teléfono: 227192

HERBARIO VARGAS CUZ

CERTIFICADO DE DETERMINACIÓN TAXONÓMICA N° 005-2021-HVC-FC-UNSAAC

La directora del Herbario Vargas (CUZ) Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco (UNSAAC), deja constancia que: la señorita **Milagros Reyna Choque Mendoza**, con código de matrícula N° 131151, y la señorita **Mila Yurema Valencia Quispe**, con código de matrícula N° 124939, bachilleres de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, de la Facultad de Ciencias de la Salud, de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, han presentado a la Dirección del Herbario Vargas (CUZ) dos muestras botánicas de líquenes para su determinación taxonómica (expediente N° 13871), para el proyecto de tesis intitulado "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". Las que, al ser diagnosticadas por la Dra. María Encarnación Holgado Rojas, utilizando claves dicotómicas, consulta con bibliografía especializada, concuerdan con las siguientes especies:

N°	Familia	Especie	Nombre Local
1	Parmeliaceae	<i>Usnea</i> sp.	
2	Parmeliaceae	<i>Ramalina</i> sp.	

Se les expide la presente certificación a petición formal de los interesados para los fines que vieran por conveniente.

Cusco, 18 de marzo del 2021


Bilga. María Luisa Ochoa Cámara
Directora del Herbario Vargas CUZ



**ANEXO N° 2: MAPA DE UBICACIÓN DE LA COMUNIDAD DE PACCA
DISTRITO DE ANTA**



Fuente: Instituto Nacional de Estadística e Informática – INEI (Mapa distrital – Anta)

ANEXO N°3: FICHA DEL CONOCIMIENTO DEL ACIDO USNICO

Entrevista para la obtención de datos sobre líquenes realizada en la comunidad de Pacca-Anta-Cusco

Nombre de la persona:.....

Edad:

Sexo: masculino () femenino ()

Estado civil:.....

Número de hijos:.....

Grado de instrucción:

- Analfabeto()
- Primaria completa ()
- Primaria completa ()
- Secundaria incompleta ()
- Secundaria completa ()
- Otros ()

Ocupación:

- Agricultor ()
- Porteador ()
- Obrero ()
- Ama de casa ()
- Pastor ()
- Otros:

1. ¿Usa líquenes?

.....
.....

2. ¿Quién te enseñó y como aprendiste sobre el uso de líquenes?

.....
.....

3. ¿Qué parte de los líquenes usa usted?

.....
.....

4. ¿Conoce la zona de crecimiento de los líquenes?

.....
.....

ANEXO 4

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS (EVALUACION CITOTÓXICA) EN NAUPLIOS DE *Artemia Salina*

TRATAMIENTO	DILUCION (PPM)	ENSAYO 1		ENSAYO 2		ENSAYO 3	
		MUERTOS	VIVOS	MUERTOS	VIVOS	MUERTOS	VIVOS
EE	1000						
	100						
	10						
EA	1000						
	100						
	10						
CN	1000						
	100						
	10						

EE: Extracto etanólico al 70%

EA: Extracto acuoso

CN: Control negativo

ANEXO 5

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE TOXICIDAD CON SEMILLAS

INFORMAR LA LONGITUD EN mm

MUESTRA	CONCENTRACION	LONGITUDES DE LA RAIZ																		PROMEDIO	% INHIBICION				
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	1	1	1	1	1	1	1			2			
CONTROL POSITIVO																									
CONTROL NEGATIVO																									
1																									
2																									
3																									

ANEXO 6

RECOLECCIÓN DE DATOS PARA LA EVALUACIÓN CITOTÓXICA (CL50) EN BULBOS DE *Allium Cepa*

Datos de crecimiento radicular

TRATAMIENTO	CRECIMIENTO RADICULAR					PROMEDIO
	R1	R2	R3	R4	R5	
CONTROL NEGATIVO						
100 ppm						
10 ppm						
1 ppm						
0.1 ppm						
0.01 ppm						
CONTROL POSITIVO						

Datos de inhibición de raíces en prueba de bioensayos

TRATAMIENTO	%INHIBION					PROMEDIO
	R1	R2	R3	R4	R5	
CONTROL NEGATIVO (agua pura)						
100 ppm						
10 ppm						
1 ppm						
0.1 ppm						
0.01 ppm						
CONTROL POSITIVO solucion CuSO ₄ , Cu ⁺² 0.5ppm						

ANEXO 7: PREPARADO DE LOS REACTIVOS PARA LA IDENTIFICACION

- ❖ **Ninhidrina-** 0,2 g de ninhidrina en 100 mL de etanol.
- ❖ **Cloruro Férrico-** 1 g de cloruro férrico en 100 mL de agua destilada.
- ❖ **Solución de Gelatina – Sal-** Se prepara una solución de NaCl al 10%, luego gelatina al 1% en solución acuosa, mezclar ambas soluciones en volúmenes iguales.
- ❖ **Shinoda-** Se usa limadura de magnesio más gotas de ácido clorhídrico concentrado.
- ❖ **Liebermann – Burchard-** Se emplea gotas de anhídrido acético más gotas de ácido sulfúrico concentrado.
- ❖ **Borntrager-** Se emplea solución de hidróxido de sodio al 10%.
- ❖ **Kedde-** 1 g de ácido 3,5 dinitrobenzoico se disuelve en una mezcla de 50 mL de solución de hidróxido de potasio 2 N.
- ❖ **Dragendorff-** 8g de $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ en 20 mL de ácido nítrico ($d = 1,18 \text{g/mL}$) y 27,2 g de KI en 50 mL de agua. Mezclar las 2 soluciones y dejar en reposo durante 21 horas. Decantar y completar a 100 mL.
- ❖ **Mayer-** 1,35 g de HgCl_2 en 50 ml de agua. Agregar 5 g de KI a la solución y diluir a 100 mL.
- ❖ **Rosenheim-** Se usa el ácido clorhídrico concentrado.
- ❖ **Reaccion de la Espuma-** Solamente se agita la muestra problema.
- ❖ **Ehrlich-** Disolver 5 g de p – dimetilsmino benzaldehído en 100 mL de etanol y acidular con ácido clorhídrico.

ANEXO 8: INTERPRETACION DE LAS REACCIONES DEL ANÁLISIS FITOQUÍMICO

1. **NINHIDRINA-**. Detecta la presencia de grupos aminos primarios o secundarios, la reacción es positiva cuando en el tubo aparece una coloración azul o violeta.
2. **CLORURO FERRICO-**. Indica la presencia de grupos fenólicos libres, la reacción es positiva cuando en el tubo aparece una coloración verde azulado, verde, violeta, o azul.
3. **SOLUCION DE GELATINA – SAL-**. Revela la presencia de taninos, la reacción es positiva cuando en el tubo hay turbidez o formación de precipitado.
4. **REACCION DE SHINODA-**. Reacciones ante la presencia de flavonoides excepto chalconas, dihidrochalconas, auronas, catequinas e isoflavonas, es positiva cuando en el tubo aparece una coloración anaranjada, roja, azul o violeta.
5. **REACCION DE LIEBERMANN – BURCHARD-**. Reacciona ante la presencia de triterpenoides y/o esteroides, la reacción es positiva cuando en el tubo aparece una coloración azul, verde o naranja.
6. **REACCION DE BORTRAGER-**. Es positiva para naftoquinonas, antraquinonas, antronas y antranoles cuando en el tubo aparece una coloración roja.
7. **REACCION DE KEDDE-**. Para anillos lactonicos pentaciclicos Alfa – Beta insaturados, la reacción es positiva cuando en el tubo aparece una coloración rojo – violeta durante los primeros 5 minutos.
8. **REACCION DE DRAGENDORFF-**. Indica la presencia de alcaloides, la reacción es positiva cuando en el tubo se observa turbidez o un precipitado de color rojo – naranja.
9. **REACCION DE MAYER-**. Indica la presencia de alcaloides, la reacción es positiva cuando en el tubo se observa turbidez o precipitado blanco.
10. **REACCION DE ROSENHEIM-**. Es positiva ante la presencia de leucoantocianidinas la reacción es positiva cuando en el tubo aparece una coloración rojo o rosado. Las catequinas dan una coloración marrón.
11. **REACCION DE LA ESPUMA-**. Indica la posible presencia de saponinas, la reacción es positiva cuando en el tubo después de agitarlo 15 minutos se observa la presencia de espuma.

12. **REACCION DE EHRLICH-**. Revela la presencia de compuestos con núcleos indólicos con posición alfa libres es positiva cuando en el tubo aparece una coloración entre azul y violeta.

ANEXO 9-. FICHA ETNOTOBATICA *Usnea Spp*

Nombre Común	Barba de capuchino, Musgo de los árboles
Nombre científico	<i>Usnea barbata</i>
Clase	<i>Ascolichenes</i>
Familia	<i>Usneaceae</i>
División	<i>Lichenes</i>
Orden	<i>Lecanorales</i>
Reino	<i>Fungi</i>
Descripción del liquen	Color verde grisáceo la mayoría pálidos fruticosos líquenes que crecen como mini hojas arbustos o borlas anclados en la corteza o ramas. Generalmente crece colgando de ramas.
Usos	Usnea ha sido empleado tópicamente sobre las heridas y sobre las inflamaciones de la piel. Eficaz en las infecciones respiratorias, infecciones urinarias, antiviral, antioxidante, cáncer.
Medio donde habita	En bosque de rebollos en una hondonada



ANEXO 10-. FICHA ETNOTOBATICA *Ramalina*.

Nombre Común	Flor de roca,
Nombre científico	<i>Ramalina striatula</i>
Clase	<i>Lecanoromycetes</i>
Familia	<i>Ramalinaceae</i>
División	<i>Ascomycota</i>
Orden	<i>Lecanorales</i>
Reino	<i>Fungi</i>
Genero	<i>Ramalina</i>
Descripción del liquen	Liquen con talo fruticoso arbustivo a raras veces subpendulo, de hasta 7(-15) cm de largo, moderadamente ramificado desde un grampón o disco de sujeción. La superficie es gris verdoso a gris amarillento, liso, brillante, sin soledias, pseudocifelas lineares, laminares y raras veces marginales, planas o usualmente en ligeras depresiones.
Usos	Es eficaz como bioindicador de contaminación. Utilización en la cosmética. Propiedades aromatizantes. Actividad antibacteriana, antifúngica, antiviral, antitumoral, antiinflamatoria.
Hábitat	Ambientes tropicales y templados del Hemisferio Sur



ANEXO 11-. TÉCNICAS PARA EL PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN

A. Para la citotoxicidad de la *Artemia salina*

1-. Si hubiera algún nauplio muerto o muertos en el control (agua salina), los datos se corrigen usando la fórmula Abbott.

$$\%MORTALIDAD = \frac{\%VIVOS EN CONTROL - \%VIVOS EN TRATAMIENTO}{\%VIVOS EN CONTROL} = Y$$

2-. Se calculó el porcentaje de letalidad por cada una de las concentraciones determinadas mediante la ecuación. 22

$$\%DE LETALIDAD = \frac{\text{nauplios muertos (TM)}}{\text{nauplios puestos inicialmente (TV)}} \times 100$$

3-. Se calculó la concentración letal media CL50 empleando el análisis probit

TABLA. VALORES DE CITOTOXICIDAD DE LA CL50 SEGÚN CYTED

Clasificación citotoxicidad según CYTED			
I	Extremadamente tóxico	1 - 10	ug/ml
II	Altamente tóxico	10 - 100	ug/ml
III	Moderadamente tóxico	100 - 500	ug/ml
IV	Ligeramente tóxico	500 - 1000	ug/ml
V	Prácticamente no tóxico	1000 - 1500	ug/ml
VI	Relativamente inocuo	>1500	ug/ml

Fuente: Quispe Choquehuanca L. (26)

B. Para la toxicidad en semillas de *Lactuca sativa*, *Raphanus sativus* y *Beta vulgaris*.

1. Promedio de la elongación de la radícula y el hipocótilo de las plántulas de cada repetición.
2. Porcentaje de inhibición del crecimiento de la radícula y del hipocótilo.

$$\%INHIBICION = \frac{MUESTRA - CONTROL}{CONTROL} = X 100$$

3. Porcentaje de germinación de las semillas. (56)

$$\%GERMINACION = \frac{SEMILLAS GERMINADAS}{N^{\circ} TOTAL DE SEMILLAS} = X 100$$

4. Porcentaje de germinación relativa de semillas (GRS)

$$GRS\% = \frac{N^{\circ} DE SEMILLAS GERMINADAS CON LA MUESTRA PROBLEMA}{N^{\circ} DE SEMILLAS GERMINADAS EN EL CONTROL} = X 100$$

5. Crecimiento relativo de la radícula (CRR) (61)

$$CRR\% = \frac{LONGITUD PROMEDIO DE LA RADICULA CON LA MUESTRA PROBLEMA}{LONGITUD PROMEDIO DE LA RADICULA EN EL CONTROL} = X 100$$

6. Se calculó el índice de germinación I.G.

$$IG = \frac{(N^{\circ}SEMILLAS GERMINADAS \times LONG. PROMEDIO RAICES) MUESTRA}{(N^{\circ}SEMILLAS GERMINADAS \times LONG. PROMEDIO RAICES) CONTROL} = X 100$$

$$IG\% = \frac{GRS \times CRR}{100}$$

7. Índice del porcentaje de germinación residual normalizado (IGN)

$$IGN = \frac{GERM_x - GERM_{control}}{GERM_{control}}$$

8. Índice de elongación radicular residual normalizado (IER)

$$IER = \frac{ELONG_x - ELONG_{control}}{ELONG_{control}}$$

9. Se calculó la concentración de inhibición media C150

10. Se calculó el análisis de varianzas ANOVA en Minitab

ANEXO 12. ANÁLISIS PROBIT EXTRACTO ACUOSO DE *Ramalina* EN *Artemia Salina*.

Output Created	07-MAY-2022 23:44:55	
Comments		
Input	Data	E:\TESIS TOXICIDAD QF UNSAAC 2022\TESIS TOXICIDAD.sav
	Active Dataset	Conjunto_de_datos2
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	15
Missing Value Handling	Definition of Missing Cases Used	User-defined missing values are treated as missing. Statistics are based on all cases with valid data for all variables in the model.
Syntax	PROBIT Mortalidad OF Total_casos WITH Concentracion /LOG 10 /MODEL PROBIT /PRINT FREQ CI /CRITERIA P(0.15) ITERATE(20) STEPLIMIT(.1).	
Resources	Processor Time	00:00:00.61
	Elapsed Time	00:00:01.13

Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for Concentracion del extracto (PPM)			95% Confidence Limits for log(Concentracion del extracto (PPM)) ^a		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT 1.00	.000	.000	.001	-5.344	-11.366	-3.141
5.00	.000	.000	.016	-3.406	-7.720	-1.797
10.00	.004	.000	.085	-2.373	-5.788	-1.069
15.00	.021	.000	.270	-1.676	-4.494	-.568
20.00	.076	.000	.691	-1.122	-3.475	-.160
25.00	.226	.002	1.588	-.646	-2.613	.201
30.00	.603	.014	3.467	-.220	-1.853	.540
35.00	1.500	.068	7.492	.176	-1.169	.875
40.00	3.559	.282	16.646	.551	-.549	1.221
45.00	8.213	1.021	39.625	.915	.009	1.598
50.00	18.702	3.194	105.364	1.272	.504	2.023
55.00	42.586	8.686	322.399	1.629	.939	2.508
60.00	98.266	21.058	1144.934	1.992	1.323	3.059
65.00	233.203	47.401	4707.339	2.368	1.676	3.673
70.00	579.800	103.340	22526.298	2.763	2.014	4.353
75.00	1549.286	226.955	128834.748	3.190	2.356	5.110
80.00	4628.635	523.353	935364.355	3.665	2.719	5.971
85.00	16576.705	1341.548	9742292.433	4.219	3.128	6.989
90.00	82530.340	4257.993	191388149.755	4.917	3.629	8.282
95.00	890930.286	22809.149	16340033951.993	5.950	4.358	10.213
99.00	77270110.026	504930.569	#####	7.888	5.703	13.858

ANEXO 13-. ANÁLISIS PROBIT EXTRACTO ETANOLICO DE *Ramalina* EN *Artemia Salina*.

```
PROBIT Mortalidad OF Total_casos WITH
Concentracion
/LOG 10
/MODEL PROBIT
/PRINT FREQ CI
/CRITERIA P(0.15) ITERATE(20) STEPLIMIT(.1).
```

Output Created		07-MAY-2022 23:32:04
Comments		
Input	Data	E:\TESIS TOXICIDAD QF UNSAAC 2022\TESIS TOXICIDAD.sav
	Active Dataset	Conjunto_de_datos2
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
Missing Value Handling	N of Rows in Working Data File	15
	Definition of Missing	User-defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics are based on all cases with valid data for all variables in the model.
Syntax		PROBIT Mortalidad OF Total_casos WITH Concentracion /LOG 10 /MODEL PROBIT /PRINT FREQ CI /CRITERIA P(0.15) ITERATE(20) STEPLIMIT(.1).
Resources	Processor Time	00:00:00.64
	Elapsed Time	00:00:00.99

Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Std. Error	Z	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ^a Concentracion del extracto (PPM)	.252	.083	3.044	.002	.090	.415
Intercept	.243	.152	1.600	.110	.091	.394

Probability	95% Confidence Limits for Concentracion del extracto (PPM)			95% Confidence Limits for log(Concentracion del extracto (PPM)) ^a		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT 1.00	.000	.000	.000	-10.184	-30.578	-5.716
5.00	.000	.000	.000	-7.482	-23.011	-4.053
10.00	.000	.000	.001	-6.042	-18.984	-3.160
15.00	.000	.000	.003	-5.071	-16.271	-2.554
50.00	.109	.000	1.446	-.962	-4.947	.160
85.00	1400.340	101.610	17498520.956	3.146	2.007	7.243
90.00	13118.396	492.527	7539032688.270	4.118	2.692	9.877
95.00	361416.930	4349.573	71080721556002.9	5.558	3.638	13.852
99.00	181739230.378	218653.331	2401006585357920000000.0	8.259	5.340	21.380

ANEXO 14-. ANÁLISIS PROBIT EXTRACTO ACUOSO DE *Ramalina* EN *Raphanus sativus*.

```
PROBIT INHIBICION OF TOTAL WITH
CONCENTRACION
  /LOG 10
  /MODEL PROBIT
  /PRINT FREQ CI
  /CRITERIA P(0.15) ITERATE(20)
STEPLIMIT(.1).
```

Output Created	07-MAY-2022 23:22:56	
Comments		
Input	Data	E:\TESIS TOXICIDAD QF UNSAAC 2022\DATOS PROBIT.sav
	Active Dataset	Conjunto_de_datos1
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	5
Missing Value Handling	Definition of Missing	User-defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics are based on all cases with valid data for all variables in the model.
Syntax		PROBIT INHIBICION OF TOTAL WITH CONCENTRACION /LOG 10 /MODEL PROBIT /PRINT FREQ CI /CRITERIA P(0.15) ITERATE(20) STEPLIMIT(.1).
Resources	Processor Time	00:00:00.69
	Elapsed Time	00:00:01.17

Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Std. Error	Z	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ^a CONCENTRACION	1.302	2.004	.650	.516	-2.626	5.231
Intercept	-3.331	5.505	-.605	.545	-8.835	2.174

Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for CONCENTRACION			95% Confidence Limits for log(CONCENTRACION) ^a		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ,010	5.907			.771		
,050	19.711			1.295		
,100	37.471			1.574		
,150	57.800			1.762		
,500	361.266			2.558		
,850	2258.008			3.354		
,900	3483.027			3.542		
,950	6621.310			3.821		
,990	22094.152			4.344		

ANEXO N°15 ANÁLISIS DE ANOVA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO ÚSNICO

UNIANOVA concentracion BY Maceracion Liquen

```

/METHOD=SSTYPE(3)
/INTERCEPT=INCLUDE
/POSTHOC=Maceracion Liquen(TUKEY)
/PLOT=PROFILE(Maceracion*Liquen)
/CRITERIA=ALPHA(.05)
/DESIGN=Maceracion Liquen Maceracion*Liquen.
    
```

Between-Subjects Factors

	Value Label	N
Maceración	1,0	Maceración en Agua 8
	2,0	Maceración alcohol 70% 8
Liquen	1,00	USNEA 8
	2,00	RAMALINA 8

Descriptive Statistics

Dependent Variable: Concentracion (PPM)

Maceración		Mean	Std. Deviation	N
Maceración en Agua	USNEA	3.0050	.32512	4
	RAMALINA	1.2725	.12685	4
	Total	2.1388	.95383	8
Maceración alcohol 70%	USNEA	9.4700	.52884	4
	RAMALINA	8.1275	1.00361	4
	Total	8.7988	1.03270	8
Total	USNEA	6.2375	3.47950	8
	RAMALINA	4.7000	3.72352	8
	Total	5.4688	3.57077	16

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Concentracion (PPM)

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	187,030 ^a	3	62.343	177.026	.000
Intercept	478.516	1	478.516	1358.760	.000
Maceracion	177.422	1	177.422	503.796	.000
Liquen	9.456	1	9.456	26.850	.000
Maceracion * Liquen	.152	1	.152	.432	.523
Error	4.226	12	.352		
Total	669.772	16			
Corrected Total	191.256	15			

a. R Squared = ,978 (Adjusted R Squared = ,972)

ANEXO 16. CÁLCULO DE LA CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO ÚSNICO DE DOS ESPECIES DE LÍQUENES

A. Calculando la concentración del promedio de las lecturas del liquen *Usnea sp* según el rango de linealidad de la curva patrón.

$$y = 0.0689x + 0.0923$$

1.-Maceracion en agua

Donde:

$$y=0.2996$$

x= ? concentración en ppm

$$\frac{0.2996 - 0.0923}{0.0689} = x$$

$$3.001 \text{ ppm} = x$$

2.-Maceracion en alcohol al 70%

Donde:

$$y=0.7451$$

x= ? concentración en ppm

$$\frac{0.7451 - 0.0923}{0.0689} = x$$

$$9.47 \text{ ppm} = x$$

B. Calculando la concentración del promedio de las lecturas del liquen *Ramalina* según el rango de linealidad de la curva patrón.

$$y = 0.0689x + 0.0923$$

1.-Maceracion en agua

Donde:

$$y=0.1803$$

x=? concentración en ppm

$$\frac{0.1803 - 0.0923}{0.0689} = x$$

$$1.27 \text{ ppm} = x$$

2.-Maceracion en alcohol al 70%

Donde:

$$y=0.6526$$

x= ? concentración en ppm

$$\frac{0.6526 - 0.0923}{0.0689} = x$$

$$8.13 \text{ ppm} = x$$

ANEXO 17. REGISTRO FOTOGRÁFICO

I. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA



FOTO N°1. Recolección de *Usnea*



FOTO N°2. Recolección de *Ramalina*



FOTO N°3. Secado



FOTO N°4 Secado de los dos líquenes



FOTO N° 5. Maceración del líquen *Usnea*



FOTO N°6. Maceración del líquen *Ramalina*

1- TAMIZAJE FITOQUÍMICO



FOTO N°7. Extractos acuoso y etanólico secos de *Usnea* y *Ramalina*



FOTO N°8. Reacción de coloración con el extracto acuoso *Usnea*



FOTO N°9. Reacción de coloración con el extracto acuoso *Ramalina*



FOTO N°10. Reacción de coloración con el extracto etanólico *Usnea*

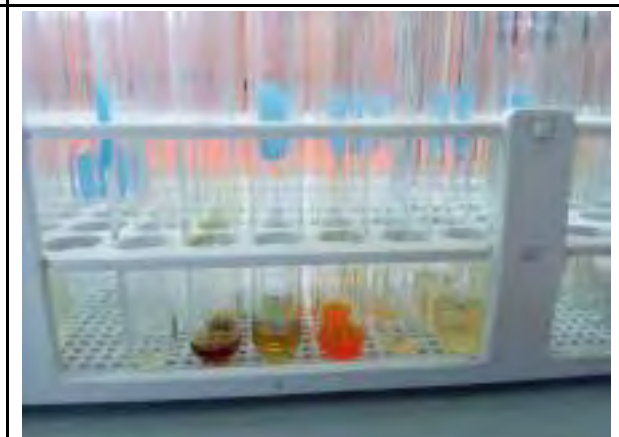


FOTO N°11. Reacción de coloración con el extracto etanólico *Ramalina*

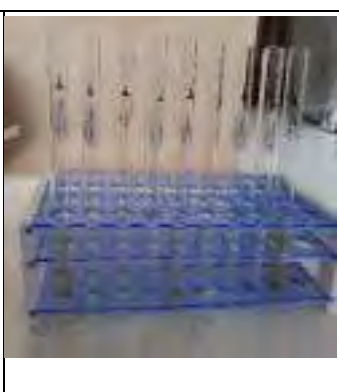
Fuente: Elaboración propia

Se puede observar las reacciones de coloración determinando la presencia de distintos metabolitos secundarios de los extractos acuosos y etanolicos de la *Usnea, Ramalina*.

BIOENSAYO en *Artemia salina*

		
<p>FOTO N°12. <i>Artemia salina</i></p>	<p>FOTO N°13. Levadura (alimento)</p>	<p>FOTO N°14. Preparación del agua del mar</p>

	
<p>FOTO N°15. Incubación de los huevos en <i>Artemia salina</i></p>	<p>FOTO N°16. Eclosión de la <i>Artemia salina</i></p>

			
<p>FOTO N°17. Selección de los nauplios</p>	<p>FOTO N°18. Diluciones de la muestra y control</p>	<p>FOTO N°19. Cuento de los nauplios</p>	<p>FOTO N°20. Observación de la <i>Artemia salina</i></p>

Fuente: Elaboración propia

BIOENSAYO EN *Lactuca sativa*

A. DESARROLLO DE LA PRUEBA



FOTO N°21. dilucion de los extractos de los líquenes



FOTO N°22. Placas con dilución de extractos de líquenes.

B. EVALUACION DEL EFECTO SUBLETAL: INHIBICION DE LA ELONGACION DE LA RADICULA E HIPOCOTILO



FOTO N°23. Elongación de la radícula e hipocotilo

C. EVALUACION DEL EFECTO LETAL: INHIBICION DE LA GERMINACION



FOTO N°24. Germinacion de *Lactuca sativa*.

Fuente: Elaboración propia

Se puede observar la germinación de la semilla de *Lactuca sativa*.

BIOENSAYO EN *Beta vulgaris*



FOTO N°25. Colocación de las semillas *Beta vulgaris*

B. EVALUACION DEL EFECTO SUBLETAL: INHIBICION DE LA ELONGACION DE LA RADICULA E HIPOCOTILO



FOTO N°26. Comparación de la elongación de la radícula e hipocotilo

C. EVALUACION DEL EFECTO LETAL: INHIBICION DE LA GERMINACIÓN

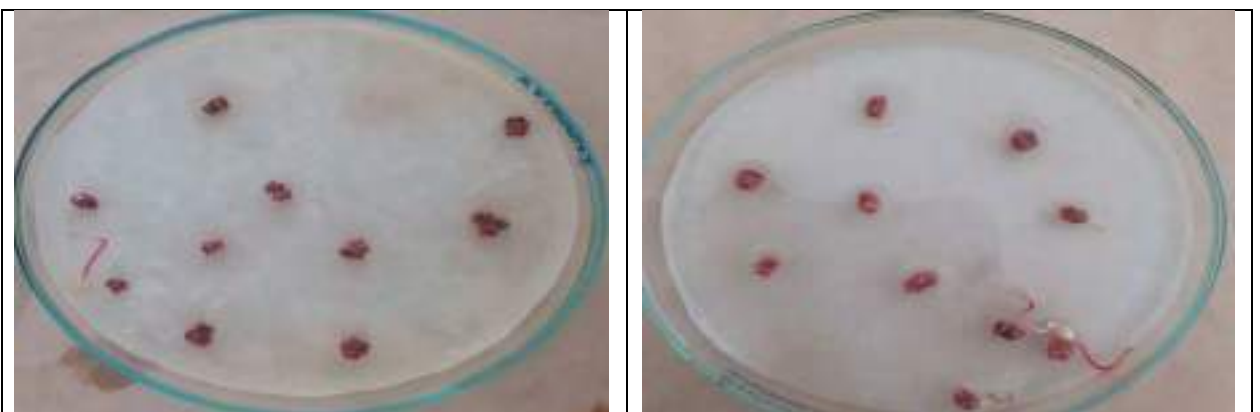


FOTO N°27. Se puede observar la germinación de las semillas de *Beta vulgaris*.

Fuente: Elaboración propia.

BIOENSAYO EN *Raphanus sativa*

A. DESARROLLO DE LA PRUEBA



FOTO N°28. Colocación de semillas, crecimiento y Medición de raicillas

B. EVALUACION DEL EFECTO SUBLETAL: INHIBICION DE LA ELONGACION DE LA RADICULA E HIPOCOTILO



FOTO N°29. Elongación de la radícula e hipocótilo
Usnea

FOTO N°30. Elongación de la radícula e hipocótilo
Ramalina

Fuente: Elaboración propia

Se puede observar la elongación de la radícula e hipocótilo de los extractos acuosos de la *Ramalina* e *Usnea*.

C. EVALUACIÓN DEL EFECTO LETAL: INHIBICIÓN DE LA GERMINACIÓN



FOTO N°31. Control (-)



FOTO N°32. 200ppm



FOTO N°33. 400 ppm



FOTO N°34. 800 ppm



FOTO N°35. 1600 ppm



FOTO N°36. Control (+)

Fuente: Elaboración propia

Se puede observar la germinación de las semillas *Raphanus sativa*.

BIOENSAYO EN *Allium cepa*

A. DESARROLLO DE LA PRUEBA



FOTO N°37. Limpieza y pelado de los bulbos



FOTO N°38. Retiro de raicillas



FOTO N°39. Bulbos sumergidos hasta el disco germinativo

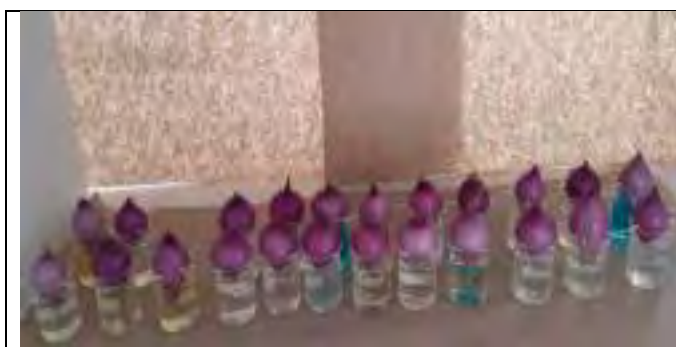


FOTO N°40. Montaje de prueba



FOTO N°41. Enraizamiento de los bulbos de *allium cepa*

B. EVALUACIÓN MACROSCÓPICA: EFECTO FITOTÓXICO Y ELONGACIÓN

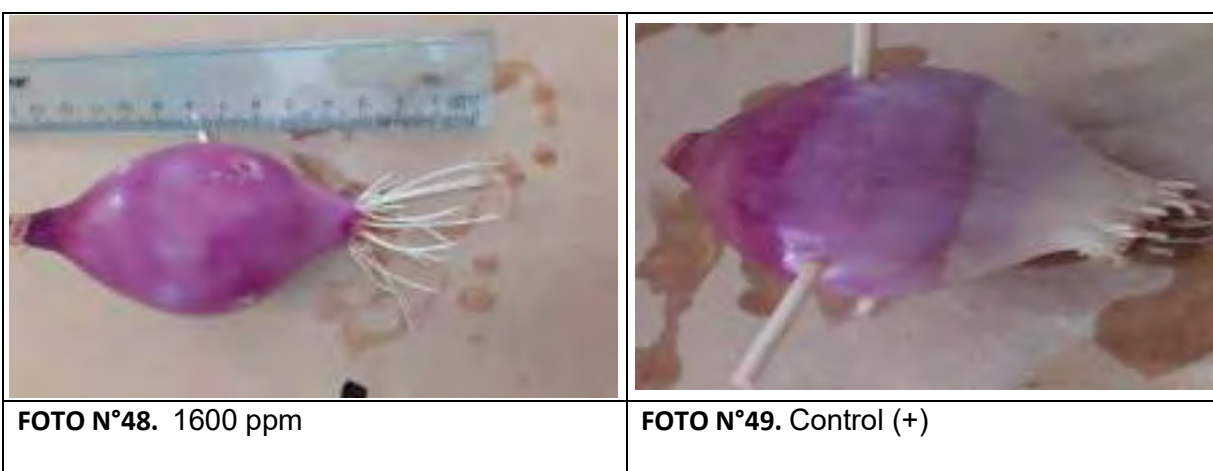
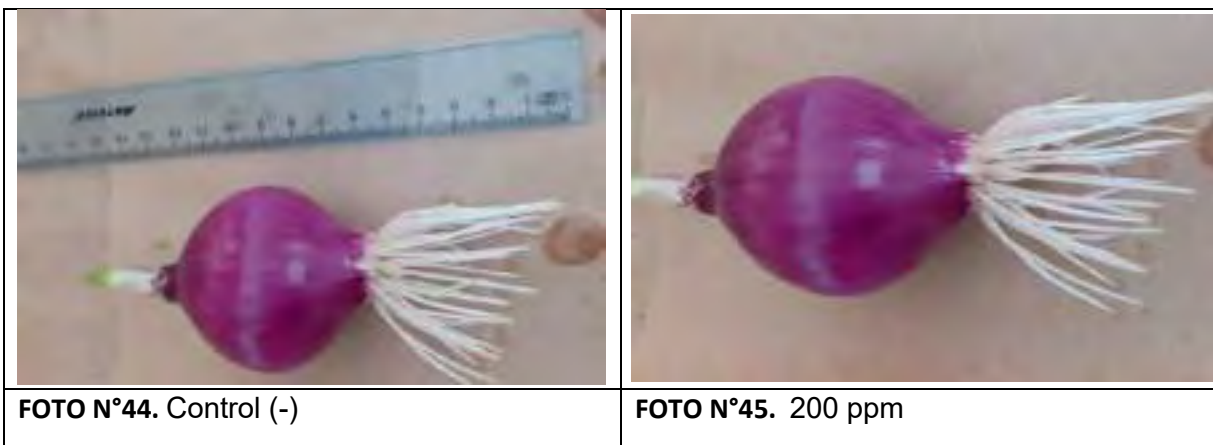


FOTO N°42. Comparación de la longitud de las raíces del extracto acuoso



FOTO N°43. Comparación de la longitud de las raíces del extracto alcohólico al 70%

C. EVALUACIÓN DEL EFECTO SUBLETAL: INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE LAS RAICES



Fuente: elaboración propia

Se observa la elongación de las raicillas de los bulbos de *Allium cepa* tratados con extractos de los líquenes *Usnea* y *Ramalina*.

CUANTIFICACIÓN DEL ÁCIDO ÚSNICO



FOTO N°50. Patrón ácido úsnico



FOTO N°51. Muestra de los extractos de líquenes



FOTO N° 52. Se procedió a pipetear



FOTO N°53. Dilución del extracto seco



FOTO N°54. Preparación de la curva patrón



FOTO N°55. Lectura de absorbancias

ANEXO N°18 SISTEMATIZACIÓN DE LA INFORMACIÓN DE LOS POBLADORES DEL ANEXO PACCA

Tabla 33: Datos de edad y sexo los pobladores de la comunidad Pacca.

Años	SEXO		EDAD
	MASCULINO	FEMENIDO	PORCENTAJE (%)
De 20-35	4	6	25
De 36-45	7	5	30
De 46-a mas	5	13	45
TOTAL	16	24	100

Fuente de información: Entrevistas a los pobladores de la comunidad Pacca.

Tabla 34: Pobladores y su grado de instrucción

Grado de instrucción	Frecuencia a cerca del conocimiento	Porcentaje (%)
Analfabeto	12	36.36
Primaria incompleta	10	30.30
Primaria completa	8	24.24
Secundaria incompleta	3	9.09
TOTAL	33	100.00

Fuente de información: Entrevistas a los pobladores de la comunidad Pacca.

Tabla 35: Principales ocupaciones de los pobladores de la comunidad Pacca

OCUPACION	FRECUENCIA	PORCENTAJE (%)
Agricultor y porteador	11	27.5
Obrero	9	22.5
Ama de casa y artesana	12	30
Otros	8	20
TOTAL	40	100

Fuente de información: Entrevistas a los pobladores de la comunidad Pacca.