

Cuaderno



Potencial antimicrobiano de extractos líquénicos de *Parmotrema* sp. y *Usnea* sp.: una evaluación para uso sostenible en el Campus sede Tunja de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia

*Antimicrobial Potential of Lichen Extracts of *Parmotrema* sp. and *Usnea* sp.: an Evaluation for Sustainable Use in the Tunja Campus of the Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia*

Jhonatan Stiven Pulido Ovalle¹, Julián Santiago Pulido Torres², María José Rodríguez Silva³, Luz Ángela Cuellar Rodríguez⁴

Tipo de Artículo: Investigación.

Recibido: 28/05/2025. **Aprobado:** 13/08/2025. **Publicado:** 12/12/2025

Resumen: La resistencia microbiana a antibióticos sintéticos impulsa la búsqueda de alternativas bioactivas sostenibles. Este estudio evaluó la actividad antimicrobiana *in vitro* de extractos de *Usnea* sp.

y *Parmotrema* sp., recolectados sustentablemente en la sede Tunja de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Se utilizaron técnicas de maceración hidroalcohólica y arrastre de vapor.

¹ Autor correspondiente: Jhonatan Stiven Pulido Ovalle. Mayor título: Técnico en Manejo Ambiental. Filiación Institucional: Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. País: Colombia, Ciudad: Tunja. Correo electrónico: jhonatan.pulido02@uptc.edu.co. ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-2342-7053>

² Autor correspondiente: Julian Santiago Pulido Torres. Mayor título: Técnico en Instalaciones eléctricas en baja tensión. Filiación Institucional: Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. País: Colombia, Ciudad: Tunja. Correo electrónico: julian.pulido06@uptc.edu.co. ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-6914-1770>

³ Autor correspondiente: María José Rodríguez Silva. Filiación Institucional: Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. País: Colombia, Ciudad: Tunja. Correo electrónico: maria.rodriguez61@uptc.edu.co. ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-8219-494X>

⁴ Autor correspondiente: Luz Ángela Cuellar Rodríguez. Mayor título: Doctora en Ciencias área Ciencias Biológicas. Filiación Institucional: Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. País: Colombia, Ciudad: Tunja. Correo electrónico: luz.cuellar@uptc.edu.co. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9573-8344>

Cuaderno



Si bien *Parmotrema* sp. presentó mayor volumen extractivo, pero menor bioactividad. *Usnea* sp. mostró inhibición microbiana desde 5 mg/mL, atribuida al ácido úsnico. La actividad fue comprobada frente a cultivos mixtos del microbioma bucal. Se identificaron factores críticos para la conservación, como la estabilidad de compuestos activos. Los resultados respaldan el potencial de *Usnea* sp. para su inclusión en productos farmacéuticos, cosméticos y fitoterapéuticos. El estudio resalta el valor de los líquenes como recurso biocomercial local y promueve su aprovechamiento sostenible en el marco de la bioeconomía, sugiriendo futuras investigaciones en fitoquímica, estandarización de extractos y evaluación toxicológica.

Palabras clave: Líquenes; actividad antimicrobiana; ácido úsnico; bioeconomía; extractos naturales.

Abstract: Microbial resistance to synthetic antibiotics is driving the search for sustainable bioactive alternatives. This study evaluated the *in vitro* antimicrobial activity of extracts from *Usnea* sp. and *Parmotrema* sp., sustainably harvested at the Tunja campus of the Pedagogical and Technological University of Colombia. Hydroalcoholic maceration and steam distillation techniques were used. *Parmotrema* sp. yielded a higher extractive volume but lower bioactivity. *Usnea* sp. showed microbial inhibition at 5 mg/mL, attributed to usnic acid. The activity was tested against mixed cultures of the oral microbiome. Critical factors for conservation were identified, such as the stability of active compounds. The results support the potential of *Usnea* sp. for inclusion in pharmaceutical, cosmetic, and phytotherapeutic products. The study highlights the value of lichens as a local biocommercial resource and promotes their sustainable use within the framework of the bioeconomy, suggesting future research in phytochemistry, extract standardization, and toxicological evaluation.

Keywords: lichens; antimicrobial activity; usnic acid; bioeconomy; natural extracts.

I. Introducción

Los líquenes son organismos complejos y resilientes que surgen de una asociación simbiótica estable entre un micobionte (generalmente un hongo ascomiceto) y un fotobionte (un alga verde o una cianobacteria). Esta relación mutualista permite una compartición eficiente de recursos: mientras que el fotobionte realiza fotosíntesis y aporta carbono orgánico, el micobionte proporciona estructura, protección y acceso a nutrientes minerales [1].

Gracias a esta asociación, los líquenes pueden colonizar una gran variedad de hábitats, desde cortezas de árboles hasta rocas expuestas, incluyendo ambientes extremos como desiertos, tundras alpinas y zonas urbanas contaminadas. Su capacidad para sobrevivir en condiciones adversas, como radiación ultravioleta intensa, sequía prolongada y contaminación atmosférica, ha sido ampliamente documentada, lo que los convierte en bioindicadores ambientales de gran valor [1], [10].

Además de su relevancia ecológica, los líquenes son una fuente rica y diversa de metabolitos secundarios, muchos de los cuales son exclusivos de este grupo de organismos. Entre los compuestos más representativos se encuentran ácidos fenólicos, depsidas, *depsídonas*, xantonas, dibenzofuranos (como el ácido úsnico) y terpenoides, cuyas funciones abarcan desde la protección frente a microorganismos hasta el control de la pérdida de agua y la defensa ante herbívoros [2], [4]. En las últimas décadas, estos metabolitos han despertado el interés de la comunidad científica y biotecnológica por sus destacadas propiedades biológicas: antioxidante, antiinflamatoria, antimicrobiana, antiviral, antitumoral, citotóxica y neuroprotectora [3], [5], [9].

La creciente resistencia de las bacterias patógenas a los antibióticos convencionales constituye uno de los principales desafíos de la medicina moderna. Este fenómeno amenaza con disminuir la eficacia de tratamientos estándar, elevar los costos sanitarios y aumentar la mortalidad por infecciones comunes. En este contexto, los líquenes emergen como una fuente alternativa prometedora de compuestos antimicrobianos naturales. Investigaciones

recientes han demostrado que metabolitos como el ácido úsnico y la *atranorina* presentan actividad frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas, incluidas cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* [5], [7], [11].

En particular, los géneros *Usnea* (líquenes fruticulosos) y *Parmotrema* (líquenes foliosos), ambos pertenecientes a la familia *Parmeliaceae*, han sido ampliamente estudiados por su distribución cosmopolita y su notable producción de metabolitos secundarios bioactivos [8], [12]. Estas especies están presentes tanto en ecosistemas rurales como en entornos urbanos, incluyendo el campus de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (UPTC), sede Tunja, donde colonizan cortezas de árboles, rocas y estructuras artificiales. Su presencia en este entorno se debe a condiciones microclimáticas favorables, baja contaminación atmosférica local y abundancia de sustratos adecuados, lo que convierte al campus en un reservorio natural de diversidad líquénica. Además de su interés farmacológico, estos líquenes son objeto de estudio en áreas como la ecología, fisiología vegetal, bioindicación ambiental, educación ambiental y sistemática. Su estudio no solo contribuye a la búsqueda de compuestos bioactivos, sino también a la comprensión de los servicios ecosistémicos que ofrecen y a la conservación de la biodiversidad local.

No obstante, el aprovechamiento de líquenes debe realizarse bajo principios de sustentabilidad. Su lento crecimiento, su papel en la estabilidad de los ecosistemas y su sensibilidad a los cambios ambientales exigen estrategias de recolección ética y controlada. Una alternativa viable es la utilización de talos desprendidos naturalmente o resultado de podas técnicas, lo cual permite obtener material sin afectar las poblaciones en su estado natural [1], [10].

El presente estudio tiene como objetivo evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* de extractos obtenidos a partir de *Parmotrema* sp. y *Usnea* sp., recolectados sustentablemente en el campus de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, sede Tunja. Para ello, se emplearon técnicas tradicionales de extracción (maceración hidroal-

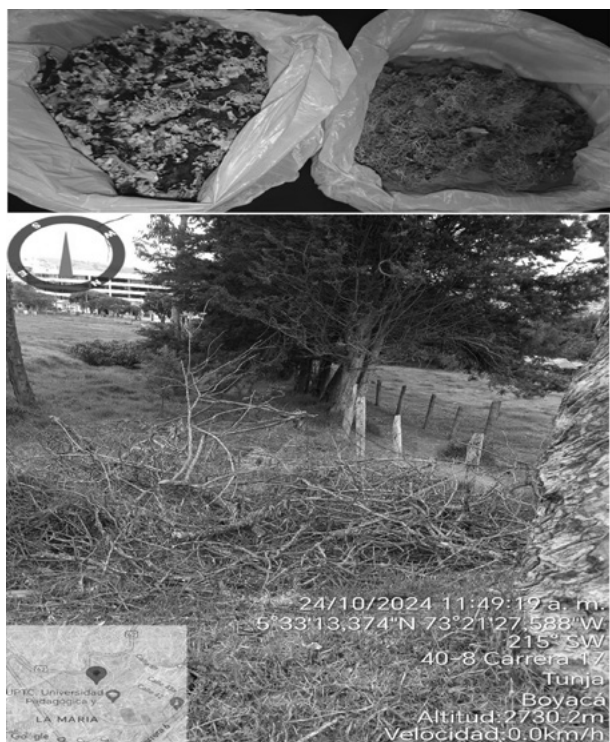
cohólica y arrastre de vapor) junto con ensayos microbiológicos de inhibición. Esta investigación se enmarca en los procesos de la Biotecnología Vegetal y busca determinar el potencial de estos extractos como ingredientes activos no solo en productos farmacéuticos naturales e innovadores, sino también en formulaciones cosméticas, fitoterapéuticas y en aplicaciones bio educativas y ambientales. De esta manera, se promueve un aprovechamiento sostenible de la biodiversidad local, alineado con principios de bioeconomía.

II. Materiales y Métodos

Materiales

Las muestras de líquenes fueron recolectadas de manera sustentable a partir de fragmentos desprendidos por podas o caídas naturales sobre superficies pavimentadas en el campus de la UPTC. Esta estrategia evita el impacto negativo sobre las poblaciones naturales de líquenes, cuya tasa de crecimiento es lenta y cuya sensibilidad ecológica es alta. Tras la recolección, las muestras fueron limpiadas manualmente para eliminar restos vegetales, tierra o partículas contaminantes. Luego, se sometieron a un proceso de secado al aire durante 48 horas en condiciones controladas (ambiente seco y ventilado) y finalmente se almacenaron en sobres de papel kraft lejos a la luz solar directa para preservar la integridad de sus metabolitos secundarios.

Figura 1. Especies recolectadas y evidencia del sitio de obtención en el campus de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, sede Tunja (Boyacá). Izquierda: *Parmotrema* sp. (biotipo folioso). Derecha: *Usnea* sp. (biotipo fruticoso). Abajo: evidencia fotográfica de ramas obtenidas mediante podas institucionales, utilizadas para la recolección del material sin generar impacto adicional sobre el ecosistema



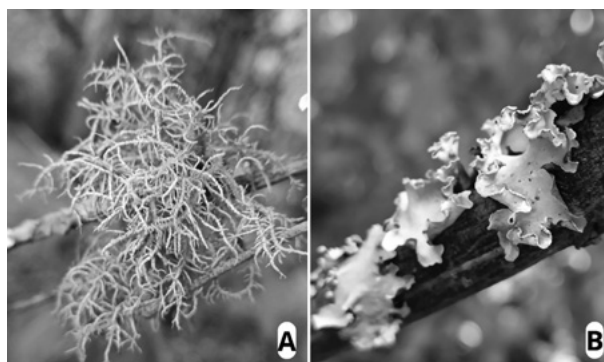
Nota: fuente elaboración propia.

Para los procesos de extracción se emplearon solventes como etanol y metanol en la técnica de maceración directa. En el sistema de arrastre de vapor se utilizaron matraces aforados y otros materiales de laboratorio estándar. Para la caracterización química se aplicó cromatografía en capa fina (TLC), utilizando placas comerciales, así como disolventes orgánicos como acetona y ciclohexano, de acuerdo con protocolos descritos en la literatura especializada.

La evaluación de la actividad antibacteriana se realizó mediante cultivos en medio de agar nutritivo, empleando placas de Petri, asas de siembra e incubación a 34 ± 1 °C. Se utilizaron cultivos mixtos de

bacterias obtenidas del microbioma bucal como modelo de prueba.

Figura 2. Evidencia en campo de A. *Usnea* sp. y B. *Parmotrema* sp., en el campus de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, sede Tunja (Boyacá). Se observan talos en su sustrato original y sus características diagnósticas



Nota: fuente elaboración propia.

Figura 3. Proceso de limpieza manual de talos liquénicos recolectados, seguido de su clasificación preliminar en los géneros *Usnea* sp. y *Parmotrema* sp.



Nota: fuente elaboración propia.

La identificación taxonómica se realizó con base en la revisión de caracteres morfológicos diagnósticos visibles a simple vista y bajo lupa, tales como tipo de biotipo, presencia de cilios marginales, médula central, coloración de la cara inferior y tipo de ramificación.

Métodos

Se aplicaron dos técnicas de extracción por separado:

Maceración: se empleó esta técnica por su efectividad en la extracción de metabolitos secundarios polares y semipolares presentes en líquenes. Para ello, se utilizaron 10 g de muestras secas de *Usnea* sp. y *Parmotrema* sp., las cuales fueron trituradas manualmente con mortero de porcelana hasta obtener un polvo fino, lo que permite aumentar la superficie de contacto con el solvente y mejorar el rendimiento extractivo. Posteriormente, se mezclaron con una solución hidroalcohólica al 70 %, compuesta por etanol y metanol, en una proporción de 1:10 (peso/volumen). La mezcla se dejó en reposo durante un periodo de 7 a 10 días con agitación ocasional, lo que favorece la difusión de los compuestos bioactivos al medio líquido. Finalmente, los extractos fueron separados por filtración utilizando papel Whatman® N.º 1, el cual retiene partículas sólidas finas sin absorber metabolitos, permitiendo obtener un extracto limpio y listo para su posterior aplicación.

Figura 4. Proceso de maceración de líquenes. Se observa la coloración característica de la maceración de *Usnea* sp., así como la presencia de su hilo central de médula, el cual dificulta la maceración mecánica completa de los talos



Nota: fuente elaboración propia.

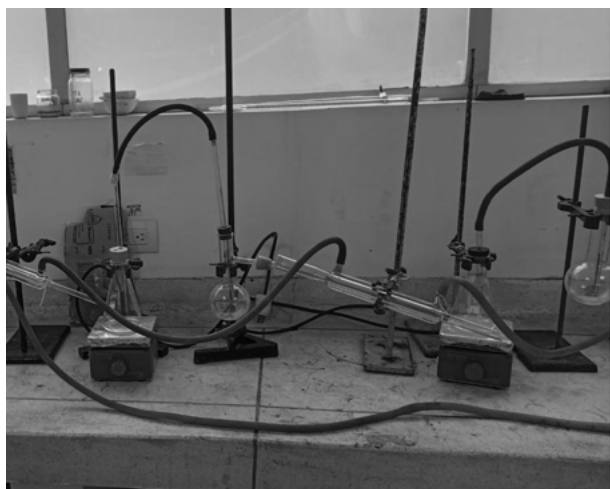
Figura 5. Extractos crudos obtenidos por maceración de líquenes. Frascos rotulados con los géneros *Usnea* y *Parmotrema* durante el proceso de maceración en solventes hidroalcohólicos (metanol y etanol)



Nota: fuente elaboración propia.

Extracción por arrastre de vapor: para la extracción de compuestos liquenicos, se empleó la técnica de arrastre de vapor, adecuada para metabolitos termolábiles con bajo peso molecular. Se colocaron entre 37 g y 40 g de muestra triturada de *Usnea* sp. y *Parmotrema* sp. en un matraz de destilación, al cual se adicionó agua destilada. El sistema se mantuvo en funcionamiento continuo durante 6 a 8 horas, con temperaturas controladas de 45 ± 5 °C, a fin de evitar la degradación térmica de los compuestos bioactivos. Los vapores generados fueron conducidos a través de un refrigerante, donde se condensaron y recolectaron en fracciones líquidas. Posteriormente, estas fracciones fueron separadas, filtradas y almacenadas en frascos ámbar para evitar la foto degradación de los metabolitos extraídos.

Figura 6. Montaje de equipo para extracción por arrastre de vapor. Se observa un matraz de fondo redondo con agua en ebullición conectado a un refrigerante de reflujo, con recolección del destilado en proceso



Nota: fuente elaboración propia.

No se realizó la identificación de los compuestos presentes en los extractos; sin embargo, se recomienda realizar cromatografía en capa fina (TLC) utilizando placas de sílica gel como fase estacionaria y mezclas de acetona: ciclohexano como fase móvil, siguiendo protocolos validados y ampliamente respaldados por la literatura [7], [8]. Este análisis permitiría determinar la presencia de compuestos bioactivos liquénicos, tales como ácido *úsico*, *atranorina* y otros metabolitos secundarios con potencial farmacológico en *Usnea* sp. y *Parmotrema* sp.

La actividad antimicrobiana se evaluó mediante una adaptación del método de difusión en disco, utilizando fragmentos de papel filtro de aproximadamente 1 cm² según la disponibilidad de materiales. Las placas de agar nutritivo fueron inoculadas con cultivos mixtos de origen bucal, obtenidos por hisopado y ajustados visualmente

para asegurar una distribución homogénea. Las placas se dividieron en secciones, y en cada una se colocó un fragmento de papel filtro impregnado con 10 µL del extracto a evaluar.

Posteriormente, las placas fueron incubadas a 34 ± 1 °C durante un periodo de 24 a 48 horas. Se evaluó mediante el conteo de colonias la presencia o ausencia de crecimiento microbiano en la zona de inhibición alrededor del papel filtro impregnado con el extracto. La formación de un halo claro de inhibición, sin crecimiento de colonias en un área definida alrededor del papel, fue interpretada como un resultado positivo, indicando actividad antimicrobiana del extracto. En cambio, la ausencia de halo o el crecimiento directo de colonias en contacto con el papel filtro se consideraron como resultado negativo, es decir, sin evidencia de inhibición. Aunque esta metodología representa una evaluación cualitativa preliminar, permite detectar de manera efectiva la capacidad inhibitoria de los extractos frente a comunidades bacterianas mixtas del microbioma oral. Se recomienda complementar este análisis con mediciones del diámetro del halo y replicaciones estadísticas en estudios posteriores.

Figura 7. Diagrama de flujo del proceso experimental



Nota: adaptado de Jaramillo-Ordoñez [8] y Rodríguez et al. [3].

III. Resultados

3.1 Separación y caracterización inicial del material

Los líquenes recolectados fueron clasificados morfológicamente hasta el nivel de género, aplicando criterios taxonómicos estándares basados en claves especializadas para *Parmeliaceae* y literatura de referencia regional [26], [4]. La identificación se realizó observando el biotipo y caracteres diagnós-

ticos externos con lupa estereoscópica (10–40×). En el caso de *Usnea* sp. (biotipo fruticoso), se constató la presencia de un eje medular central elástico (hilo medular), ramificación isotómica, superficie pubescente y talos colgantes. Para *Parmotrema* sp. (biotipo folioso), se observó la cara inferior negra con venas, cilios marginales, lóbulos sorediados y talos de gran tamaño, consistentes con descripciones previas [1], [5].

Si bien no se realizaron análisis moleculares en esta fase, se reforzó la clasificación mediante comparación con especímenes depositados en el Herbario UPTC y literatura especializada en líquenes neotropicales [2], [4], [26]. La ausencia de estructuras reproductivas clave (apotecios, picnidios) limitó la identificación a nivel de género, lo cual es una práctica habitual en estudios con finalidad bioactiva preliminar, como se ha reportado en trabajos similares en Cuba y otros países latinoamericanos [2], [6], [7].

La identificación morfológica se recomienda complementar con una fase de análisis fisicoquímico mediante cromatografía en capa fina (TLC), enfocada en la detección cualitativa de metabolitos secundarios (ver sección 3.5). Para estudios posteriores, se insta a implementar técnicas adicionales como microscopía de secciones histológicas, análisis de esporas, espectroscopía UV-Vis o HPLC para una validación taxonómica y química más robusta, tal como sugieren autores como [17] y [15].

La decisión de trabajar a nivel de género se fundamentó en criterios de manejo práctico de biomasa. La separación por especie no era viable debido a la limitada cantidad de talos disponibles, lo que hubiese afectado la replicabilidad de los ensayos extractivos, situación también mencionada en estudios de bioprospección líquénica [3], [13].

Las muestras fueron sometidas a secado al aire durante 48 horas, protegidas de la luz, para preservar la integridad de los metabolitos [5]. Luego se pesaron individualmente, obteniéndose 10,05 g por especie para maceración hidroalcohólica y entre 37–40 g por especie para arrastre de vapor, siguiendo protocolos descritos en literatura [23], [24].

La cantidad de biomasa recolectada para cada género indica que tal como lo describe [30], que los géneros más frecuentes fueron *Parmotrema* con 161 registros, seguido de *Usnea* sp. con 141 registros, lo cual indica que, en el campus de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, se encuentra en mayor número de registros el género *Parmotrema* sp., para este ensayo, se tuvo en cuenta una relación en peso similar entre los dos géneros para disminuir variables. Esta diferencia sugiere una mayor abundancia relativa de *Parmotrema* sp., lo que podría relacionarse con su adaptación a las condiciones ambientales locales y plantea la posibilidad de futuras investigaciones ecológicas y etnobotánicas para comprender los factores que determinan esta distribución.

3.2 Resultados del proceso de maceración

Se realizaron extracciones por maceración hidroalcohólica con mezclas específicas para cada género. Para *Parmotrema* sp. se emplearon 8 mL de metanol, 14 mL de etanol y agua destilada; para *Usnea* sp. 15 mL de metanol y 10 mL de agua destilada. Las muestras se dejaron en reposo durante 30 días con agitación ocasional y protegidas de la luz [11], [22].

Reconocemos que la bibliografía citada en este artículo reporta tiempos de maceración típicos en el rango de 3 a 10 días para estudios de líquenes y extractos vegetales similares, lo cual constituye un procedimiento estándar para muchas aplicaciones analíticas.

La extensión del tiempo de maceración a 30 días en este trabajo fue una decisión metodológica deliberada, motivada por dos razones concretas: i) la necesidad de maximizar la extracción de metabolitos de baja solubilidad o de liberación lenta desde la matriz líquénica dada la limitada cantidad de biomasa disponible, y ii) la intención de realizar una evaluación exploratoria sobre el rendimiento extractivo en condiciones de contacto prolongado, ya que en procesos análogos (por ejemplo, en maceraciones tradicionales de matrices botánicas) se ha reportado que periodos más largos pueden incrementar la recuperación de ciertos compues-

tos y modificar el perfil fitoquímico. Estudios sobre maceraciones prolongadas en matrices vegetales y productos tradicionales han documentado cambios en la concentración de compuestos bioactivos tras maceraciones de un mes, lo que respalda la factibilidad de este enfoque cuando se justifica experimentalmente [27].

No obstante, se reconoce que la eficacia de la maceración depende fuertemente del tipo de metabolito, del solvente y de la relación solvente: biomasa; por ello, los resultados obtenidos aquí deben interpretarse como exploratorios. Recomendamos que trabajos posteriores realicen un estudio sistemático de optimización temporal (curva cinética de extracción) comparando puntos temporales representativos (por ejemplo 3, 7, 10, 15 y 30 días) y cuantificando los metabolitos de interés mediante HPLC o UHPLC-MS para establecer el tiempo óptimo de extracción para ácido *úsrico*, *atrano-rina* u otros compuestos liquénicos. Este enfoque permitirá validar empíricamente si la maceración prolongada incrementa el rendimiento o si, por el contrario, favorece degradación o extracción selectiva de compuestos no deseados [28], [29].

Se observaron diferencias organolépticas notables. *Usnea* sp. presentó una textura blanda y homogénea, con un aroma fresco atribuido a compuestos volátiles menores presentes en el talo. No obstante, el ácido *úsrico*, principal metabolito bioactivo de *Usnea*, es un compuesto lipofílico y no volátil; por tanto, no puede considerarse la fuente directa de la volatilidad aromática. La extracción del ácido *úsrico* es favorecida por solventes hidroalcohólicos, lo que concuerda con la mayor actividad observada en los extractos por maceración. *Parmotrema* sp. mostró en cambio una consistencia más rígida y un olor terroso, probablemente asociado a terpenoides y *depsidonas* de mayor tendencia a aportar notas organolépticas amaderadas [22], [8], [5].

El rendimiento diferenció claramente a las dos especies: *Parmotrema* sp. produjo 95,73 g de extracto crudo y *Usnea* sp. 53,04 g. En volumen, se obtuvieron 77 mL de *Parmotrema* y 42 mL de *Usnea*. Estos resultados son consistentes con estudios que reportan mayor cantidad de compuestos solubles

en *Parmeliaceae* foliosas [2], [16]. Sin embargo, no se realizó cuantificación por HPLC debido a limitaciones logísticas, situación similar a la reportada en [22]. Como alternativa, se recurrió a TLC, color, densidad y olor como indicadores cualitativos [12].

3.3 Resultados de la extracción por arrastre de vapor

Los extractos obtenidos mediante arrastre de vapor fueron recolectados tras un proceso de destilación de 6 a 8 horas, mantenido a temperaturas controladas entre 40–50 °C. La biomasa inicial empleada fue de aproximadamente 37–40 g por especie, la cual fue triturada mecánicamente para favorecer una mayor relación superficie-volumen. Durante este proceso, se suspendieron esporas y se tamizaron las médulas de ambos líquenes, obteniendo un material altamente particulado, adecuado para maximizar la eficiencia de extracción de compuestos. Los restos de médula tamizados se conservaron para futuros análisis y aplicaciones.

Los líquidos recolectados fueron almacenados en frascos ámbar con el objetivo de proteger los compuestos extraídos de la fotodegradación. En términos de rendimiento cualitativo, se obtuvo un mayor volumen de extracto en *Parmotrema* sp. (145 mL) en comparación con *Usnea* sp. (33 mL). Este resultado sugiere una mayor proporción de compuestos no volátiles en *Parmotrema* sp., posiblemente asociados a terpenoides, ésteres o ácidos fenólicos de baja masa molecular, los cuales son conocidos por su afinidad con métodos de destilación.

Organolépticamente, los extractos presentaron características distintivas. *Parmotrema* sp. mostró un aroma amaderado y terroso, coherente con la extracción de terpenoides y ésteres. *Usnea* sp. emitió un olor más ácido, fresco y aromático, atribuible a compuestos volátiles menores presentes en el talo. Es importante subrayar que el ácido úsnico y varias *depsidonas* identificadas en *Usnea* son metabolitos no volátiles; por tanto, aunque no explican directamente la volatilidad del aroma, sí son los responsables principales de la actividad biológica

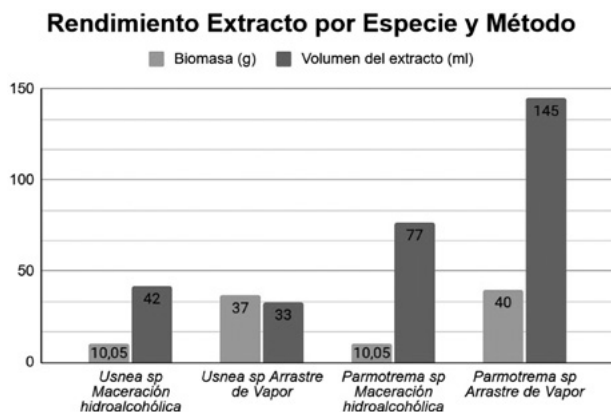
detectada y su extracción depende de la polaridad del solvente empleado [22], [9], [10].

Al finalizar el proceso de destilación, el material sólido residual en el balón fue conservado para evaluaciones posteriores. Al mes de almacenamiento, se observó crecimiento microbiano evidente, principalmente de hongos filamentosos como posibles *Trichoderma* spp. y levaduras ambientales, lo cual indica que, tras el arrastre de los compuestos volátiles, el residuo aún contenía polisacáridos y otros nutrientes aprovechables por microorganismos oportunistas. Este hallazgo también sugiere que los compuestos antifúngicos y antibacterianos se extrajeron eficientemente durante el proceso, quedando ausentes o en concentraciones bajas en el residuo sólido.

3.4 Análisis comparativo del rendimiento extractivo

El análisis descriptivo del rendimiento extractivo (Figura 1) evidencia diferencias claras y consolidadas en la literatura. En *Usnea* sp., la maceración hidroalcohólica presentó un rendimiento de 42 mL con 10,05 g de biomasa, frente a 33 mL con 37 g por arrastre de vapor, lo que coincide con Jaramillo-Ordoñez [8] y su observación de que los metabolitos de *Usnea* sp. son preferentemente solubles en mezclas hidroalcohólicas. Por su parte, *Parmotrema* sp. mostró un rendimiento superior con arrastre de vapor (145 mL con 40 g) en comparación con maceración (77 mL con 10,05 g), lo cual se atribuye a su mayor contenido de compuestos volátiles (terpenoides, ésteres) y coincide con Brakni y Ali [12]. Aunque no se aplicaron pruebas de significancia inferencial debido al enfoque exploratorio, el gráfico descriptivo permite identificar tendencias robustas—eficiencia del arrastre en *Parmotrema* sp. y de la maceración en *Usnea* sp.—y se alinea con estudios de bioprospección líquénica en Latinoamérica [3], [6], [13].

Figura 8. Comparación del rendimiento extractivo entre métodos y especies. Se observan los volúmenes obtenidos (barras azules) y la biomasa utilizada (barras verdes) para maceración hidroalcohólica y arrastre de vapor en *Usnea* sp. y *Parmotrema* sp.



Nota: fuente elaboración propia.

Sería recomendable en trabajos futuros incorporar medidas cuantitativas del diámetro del halo de inhibición y un análisis estadístico descriptivo que incluya valores de media y desviación estándar para comparar tratamientos, así como aplicar pruebas de significancia como ANOVA o la prueba t de Student cuando el diseño experimental lo permita, con el fin de aportar rigor estadístico y facilitar comparaciones bibliográficas.

3.5 Identificación de metabolitos mediante cromatografía en capa fina (TLC)

En el presente estudio no se efectuó un análisis experimental mediante TLC, por lo que la interpretación se fundamentó exclusivamente en información reportada en literatura especializada. Estudios previos han empleado placas con fase estacionaria de sílica gel y fases móviles de acetona y ciclohexano, con detección bajo luz ultravioleta a 254 y 365 nm.

De acuerdo con dichos reportes, en condiciones experimentales similares se han observado bandas fluorescentes compatibles con ácido úsnico en *Usnea* sp. (Rf entre 0,31–0,35) y con atranorina en *Parmotrema* sp. (Rf entre 0,45–0,50), compara-

das con estándares puros. Ambos metabolitos son reconocidos por su potencial bioactivo y se mencionan como compuestos de interés para estudios antimicrobianos.

Se recomienda que investigaciones posteriores incluyan TLC con patrones puros y análisis complementarios (HPLC, UHPLC-ESI-QTOF-MS o espectroscopía) para confirmar y cuantificar la presencia de estos metabolitos en los extractos evaluados.

3.6 Evaluación antimicrobiana

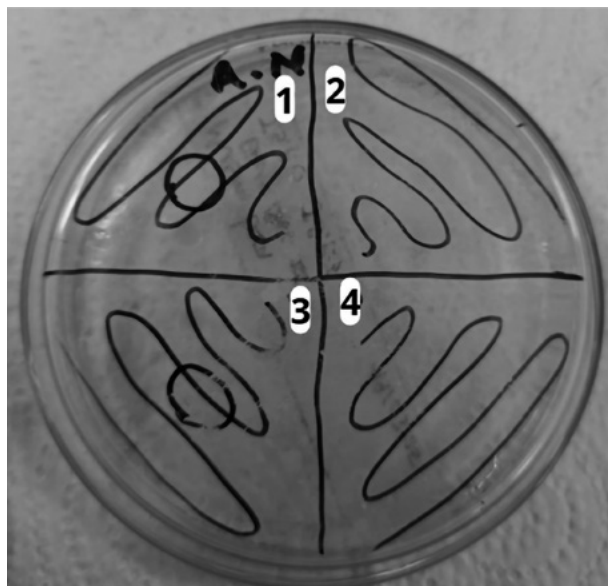
Ante la falta de cepas bacterianas certificadas, se emplearon cultivos mixtos derivados de muestras bucales humanas como modelo microbiológico preliminar para evaluar la actividad inhibitoria de los extractos. Cabe aclarar que, en la primera prueba, se aplicó la técnica de frotis por agotamiento, la cual es adecuada para el aislamiento de colonias individuales, midiendo su capacidad para inhibir el crecimiento (*in vitro*)

3.6.1 Prueba de inhibición de primeros extractos por maceración

Se dividieron placas de agar nutritivo en cuadrantes y se aplicaron 10 µL de cada extracto macerado. A las 24 h de incubación a 37 °C, el extracto de *Usnea* sp. mostró una zona clara de inhibición, mientras que *Parmotrema* sp. no evidenció efecto significativo (Imagen 7). Este comportamiento coincide con el mayor poder antimicrobiano atribuido al ácido úsnico en *Usnea* [8], [12].

Sin embargo, dado el método de siembra empleado, la delimitación de los halos no fue óptima. Además, el control negativo utilizado consistió en cuadrantes sin aplicación de extracto, lo cual no iguala las condiciones experimentales. Para mejorar la confiabilidad, se recomienda que el control negativo consista en papel filtro impregnado con agua destilada estéril, tal como en el tratamiento experimental, para descartar efectos mecánicos o contaminantes.

Figura 9. Prueba preliminar de inhibición bacteriana mediante aplicación por goteo de extractos macerados de líquenes. (1) Extracto hidroalcohólico de *Usnea* sp.; (3) Extracto hidroalcohólico de *Parmotrema* sp.; (2, 4) Controles negativos sin extracto. Evidencia de inhibición del crecimiento bacteriano



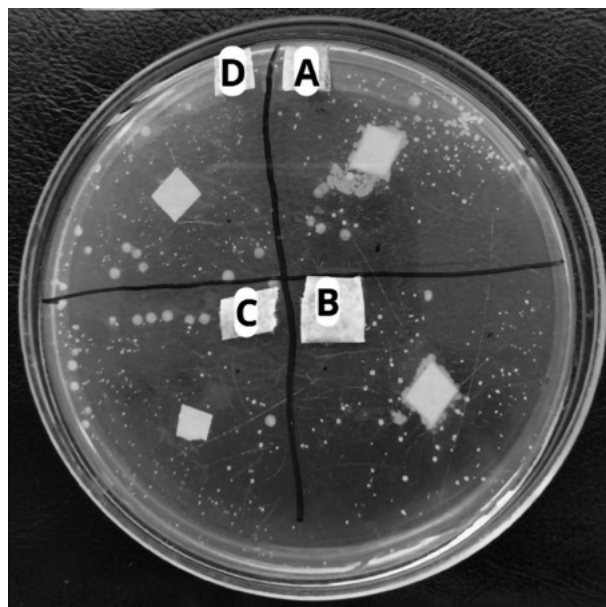
Nota: fuente elaboración propia.

3.6.2 Pruebas de inhibición comparativas entre extractos por el método de maceración y arrastre de vapor

En réplicas posteriores, se impregnaron fragmentos de papel filtro (1 cm²) con cada extracto y se ubicaron en diferentes cuadrantes. Los extractos de *Usnea* sp. mantuvieron actividad en ambos métodos, aunque los macerados presentaron pérdida de eficacia tras dos meses de almacenamiento sin protección lumínica, fenómeno documentado en extractos líquénicos [19]. En *Parmotrema* sp., se observó inhibición solamente a concentraciones ≥ 10 mg/mL, lo que sugiere menor potencia de *atranorina* o baja solubilidad en el medio [2], [12] (Imagen 8 y 9).

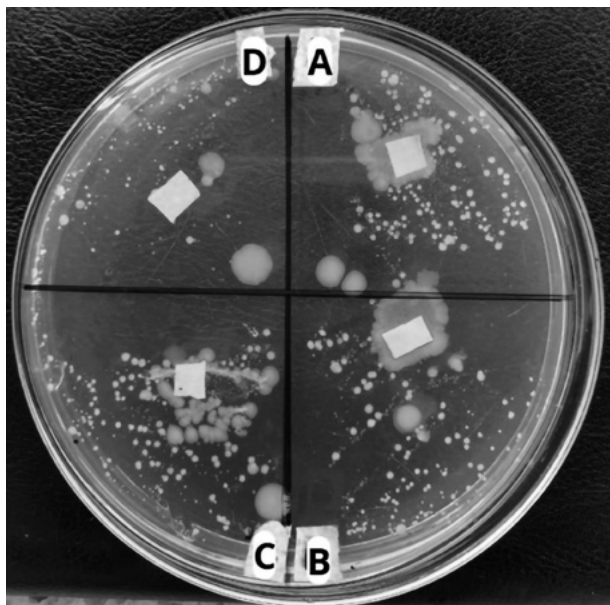
La falta de inhibición de *Parmotrema* a bajas concentraciones coincide con estudios que describen una actividad más débil de *atranorina* [2], [12].

Figura 10. Prueba de inhibición comparativa entre los extractos por maceración y arrastre de vapor. (En el sentido de las agujas del reloj): A y B corresponden a los extractos por maceración. C y D corresponden a los extractos por arrastre de vapor. Evidencia de inhibición de crecimiento de extractos de *Usnea* sp.



Nota: fuente elaboración propia.

Figura 11. Prueba de inhibición comparativa entre los extractos por maceración y arrastre de vapor. (En el sentido de las agujas del reloj): A y B corresponden a los extractos por maceración. C y D corresponden a los extractos por arrastre de vapor. Evidencia de inhibición de crecimiento de extractos de *Parmotrema* sp.



Nota: fuente elaboración propia.

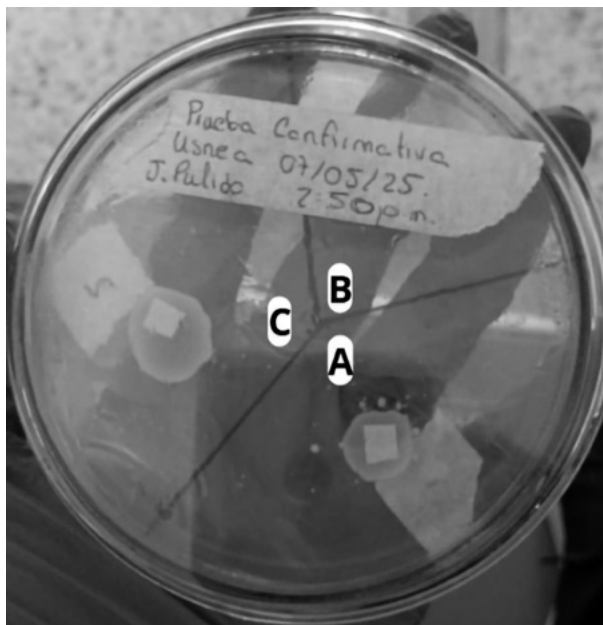
Adicionalmente, se detectó crecimiento de hongos filamentosos y levaduras en los extractos obtenidos por arrastre de vapor que habían sido almacenados por más de un mes, lo cual puede estar relacionado con el contenido residual de polisacáridos y otros compuestos nutritivos que favorecen el desarrollo de microorganismos oportunistas en ausencia de condiciones asépticas estrictas, tal como reportan Vaillant-Flores et al. [6].

Por otro lado, los extractos de *Usnea* sp. mostraron zonas claras de inhibición del crecimiento bacteriano desde concentraciones tan bajas como 5 mg/mL, indicando una mayor eficacia antimicrobiana. Este resultado refuerza la hipótesis de que *Usnea* sp. posee compuestos más activos o mejor extraíbles en condiciones hidroalcohólicas, probablemente derivados del ácido úsnico u otros depsidonas característicos.

3.6.3 Prueba confirmativa de inhibición con los extractos por ambos métodos de *Usnea* sp

Se realizó una tercera réplica de la prueba de inhibición con el fin de confirmar la actividad antimicrobiana de los extractos de *Usnea* sp. obtenidos por dos métodos: maceración hidroalcohólica y arrastre de vapor. Esta prueba se motivó por la evidente superioridad inhibitoria de *Usnea* sp. frente a *Parmotrema* sp., observada en ensayos previos.

Figura 12. Prueba confirmatoria de inhibición entre los extractos por maceración y arrastre de vapor. A. corresponde al extracto por arrastre de vapor, B. corresponde al control negativo con agua destilada estéril y C. corresponde al extracto por maceración. Evidencia de la prueba de inhibición de crecimiento de extractos de *Usnea* sp.



Nota: fuente elaboración propia.

Los resultados positivos de *Usnea* sp. respaldan la bibliografía sobre su actividad antimicrobiana frente a cepas mixtas y puras, incluida *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* [8], [13].

Para el ensayo, se dividió un medio de cultivo en tres secciones iguales. En esta prueba sí se incluyó como control negativo un disco de papel impregnado con agua destilada estéril, lo que permitió confirmar que la inhibición observada se debía al extracto y no a otros factores. En la primera (A), se colocó papel filtro impregnado con extracto de *Usnea* sp. obtenido por arrastre de vapor, con una antigüedad superior a 18 días. Este extracto había sido almacenado en condiciones no completamente estériles, y presentaba indicios visuales de crecimiento fúngico en el frasco de almacenamiento, posiblemente debido a la presencia de polisacáridos residuales.

La segunda sección (B) se utilizó como control negativo, tratada únicamente con agua destilada estéril. En la tercera (C), se aplicó extracto de *Usnea* sp. obtenido por maceración, que llevaba más de tres meses desde su preparación y mostraba la presencia de precipitados con estructuras levaduriformes, indicando posible contaminación o descomposición parcial.

Tras la incubación, se evidenció el crecimiento microbiano en las tres secciones, incluyendo la correspondiente al extracto por arrastre de vapor, lo cual sugiere una pérdida de eficacia antibacteriana con el tiempo, posiblemente por degradación de los compuestos no volátiles o contaminación durante el almacenamiento. Este resultado también pone en evidencia la dificultad de mantener condiciones asépticas durante la conservación de los extractos y la posible presencia de azúcares residuales que actúan como sustrato para hongos oportunistas. Por lo tanto, se destaca la importancia de emplear técnicas de conservación más rigurosas o procesos de purificación posteriores si se busca extender la vida útil de estos bio extractos.

Estos resultados confirman que *Usnea* sp. presenta un mayor potencial antimicrobiano, aunque también evidencian la necesidad de optimizar el método de siembra y la inclusión de controles experimentales adecuados para garantizar la reproducibilidad y la validez de las observaciones.

3.7 Propuesta de integración a productos

Con base en los resultados obtenidos, se sugiere el desarrollo de productos farmacéuticos naturales con los extractos de *Usnea* sp. como base, especialmente por su destacada actividad antibacteriana. Las pruebas de inhibición preliminares demostraron su potencial como ingrediente activo en formulaciones como ungüentos, desodorantes y antisépticos. Se recomienda considerar el método de extracción, tiempo de almacenamiento y tipo de envase como variables críticas para mantener la estabilidad de los metabolitos. Para mejorar la conservación, se sugiere el uso de frascos ámbar, refrigeración y adición de conservantes naturales si fuera necesario.

IV. Discusión

Los resultados obtenidos permiten interpretar de manera integral el comportamiento extractivo y la actividad biológica de dos especies de líquenes: *Usnea* sp. (fruticoso) y *Parmotrema* sp. (folioso). A partir de las diferencias observadas en su morfología, composición química y efecto antimicrobiano, es posible extrapolar implicaciones relevantes tanto para futuras investigaciones como para el desarrollo de productos con base natural.

La caracterización morfológica inicial y la preparación diferencial del material vegetal fue fundamental para establecer una base comparable entre las dos especies. El uso de métodos paralelos de extracción, como la maceración hidroalcohólica y el arrastre de vapor, permitió evidenciar que *Parmotrema* sp. presentó un mayor rendimiento en volumen y peso de los extractos obtenidos, lo que podría atribuirse a su estructura más densa y a la mayor cantidad de compuestos no volátiles disponibles para ser extraídos [1]. Sin embargo, esta mayor cantidad no se tradujo en una mayor eficacia biológica, ya que, como se discutirá más adelante, *Usnea* sp. fue consistentemente más activa frente a cultivos bacterianos.

Con relación al tipo de metabolitos extraídos, los resultados de cromatografía en capa fina (TLC) confirman la presencia de ácido úsnico en *Usnea* sp. y atranorina en *Parmotrema* sp., compuestos bien

conocidos por su actividad bioactiva [2]. La diferencia en el perfil químico entre ambas especies puede explicar en parte los resultados obtenidos en las pruebas de inhibición microbiana. El ácido *úsrico* ha sido ampliamente reportado por sus propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias y citotóxicas [3], mientras que la *atranorina* posee una actividad menos potente y dependiente de su concentración y entorno de aplicación [4].

Los ensayos microbiológicos comparativos confirman estos hallazgos. El extracto macerado de *Usnea* sp. presentó un efecto inhibitorio notable desde concentraciones tan bajas como 5 mg/mL, lo que indica una alta eficacia antimicrobiana incluso con extractos crudos. Esta actividad fue replicada parcialmente con el extracto obtenido por arrastre de vapor, aunque con una ligera disminución atribuible a la degradación de compuestos no volátiles durante el almacenamiento o a la menor afinidad de ciertos metabolitos con este método extractivo. Este comportamiento ha sido reportado previamente, donde se destaca que el ácido *úsrico* es más soluble y estable en mezclas hidroalcohólicas que en sistemas puramente acuosos o no volátiles [5].

En contraste, *Parmotrema* sp. mostró actividad antibacteriana sólo en concentraciones superiores a 10 mg/mL, lo que sugiere una menor potencia o biodisponibilidad de sus compuestos activos. Estos resultados concuerdan con lo reportado por estudios realizados en Cuba, donde se observaron efectos antimicrobianos más discretos para *atranorina* en comparación con otros metabolitos líquénicos [2].

El crecimiento microbiano observado en los extractos almacenados por más de un mes, especialmente en los obtenidos por arrastre de vapor, pone de manifiesto un aspecto relevante: la necesidad de protocolos de conservación rigurosos. La presencia de hongos y levaduras puede deberse a polisacáridos residuales que sirven como sustrato para microorganismos oportunistas. Este fenómeno ya ha sido documentado en estudios que analizan la estabilidad de extractos vegetales y líquénicos durante el almacenamiento [6]. Por lo tanto, resulta imperativo considerar variables como el tipo de

envase, la exposición a la luz y la refrigeración para prolongar la vida útil y la eficacia de los extractos.

Desde una perspectiva aplicada, los hallazgos de este estudio respaldan el potencial uso de extractos de *Usnea* sp. en productos cosméticos y farmacéuticos naturales, especialmente como agentes antimicrobianos en ungüentos, desodorantes o soluciones tópicas. Sin embargo, su implementación requiere estudios más avanzados de caracterización química cuantitativa, análisis de toxicidad, pruebas con cepas bacterianas certificadas y ensayos clínicos en modelos más robustos. La variabilidad en la concentración de metabolitos entre especies, biotipos y condiciones ecológicas locales también debe ser tomada en cuenta, dado que los líquenes son organismos simbióticos extremadamente sensibles a factores ambientales, como el pH del sustrato, la altitud y la contaminación atmosférica [1], [7].

V. Conclusiones

El presente estudio permitió evidenciar diferencias significativas entre los líquenes *Usnea* sp. y *Parmotrema* sp. en cuanto a su morfología, composición química, rendimiento extractivo y eficacia antimicrobiana. Aunque *Parmotrema* sp. presentó un mayor rendimiento en volumen y peso de extracto obtenido por arrastre de vapor, los extractos hidroalcohólicos de *Usnea* sp. demostraron una actividad antimicrobiana más potente, incluso a concentraciones bajas (desde 5 mg/mL), lo que sugiere una mayor concentración o biodisponibilidad de compuestos activos, especialmente ácido *úsrico*.

La actividad antimicrobiana diferencial indica que la calidad bioactiva del extracto no depende únicamente de la cantidad extraída, sino de la naturaleza y estabilidad de los metabolitos secundarios presentes. El ácido *úsrico*, presente en *Usnea* sp., es conocido por su amplio espectro de acción antimicrobiana, lo que explicaría su mayor eficacia frente al extracto de *Parmotrema* sp., cuyo principal metabolito identificado fue la *atranorina*.

Por otro lado, se observó que los extractos obtenidos mediante arrastre de vapor presentaron mayor inestabilidad microbiológica durante el almacenamiento, siendo propensos a la proliferación de hongos y levaduras después del primer mes. Esto resalta la importancia de implementar métodos de conservación adecuados o de preferir técnicas de extracción como la maceración hidroalcohólica, que presentó mejor rendimiento en términos de estabilidad y bioactividad.

Igualmente, este estudio destaca el valor biotecnológico de los líquenes como fuentes naturales de compuestos antimicrobianos, particularmente *Usnea* sp., que surgen como un candidato promotor para el desarrollo de productos farmacéuticos, cosméticos o fitoterapéuticos. Sin embargo, es indispensable continuar con estudios complementarios que incluyan la estandarización de los extractos, análisis de toxicidad, pruebas con cepas bacterianas certificadas y evaluación de variaciones según el entorno ecológico, ya que factores como la altitud, la contaminación atmosférica y el tipo de sustrato influyen en la producción de metabolitos liquénicos.

VI. Referencias

- [1] D. Simijaca, M. Morales-Puentes, y C. Díaz, "Líquenes y contaminación atmosférica en la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Tunja, Boyacá, Colombia," *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, vol. 3, pp. 69–88, 2011, Doi: 10.19053/01217488.282.
- [2] D. Rosabal López, "Potencial terapéutico de los metabolitos liquénicos y su uso en Cuba. Retos y perspectivas," *Rev. Cubana Med. Nat. Tradic.*, vol. 4, 2022. [En línea]. Disponible: <https://revmnt.sld.cu/index.php/rmnt/article/view/208>
- [3] O. E. Rodríguez A., W. A. Andrade B., F. E. Díaz L., y B. Moncada, "Actividad antimicrobiana de líquenes de la cuenca alta del río Bogotá," *Nova*, vol. 13, no. 23, pp. 47–64, 2015. [En línea]. Disponible: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702015000100006
- [4] M. D. Bertoni, M. T. Adler, y M. Maier, "Cultivo 'in vitro' de micobiontes de *Parmotrema eciliatum* y *Flavoparmelia exornata* (*Parmeliaceae*, *Ascomycota* liquenizados) con producción de triglicéridos," *Bol. Soc. Argent. Bot.*, vol. 34, pp. 179–183, 2000.
- [5] C. Illana, "Líquenes usados en perfumería," *Bol. Soc. Micol. Madrid*, vol. 40, pp. 217–213, 2016.
- [6] D. I. Vaillant-Flores, M. Gómez-Peralta, C. R. Romeu-Carballo, R. Ramírez-Ochoa, y Á. Porras-González, "Actividad antifúngica de extractos de tres especies de líquenes en Cuba," *Agron. Mesoam.*, vol. 26, no. 2, pp. 345–350, 2015, Doi: 10.15517/am.v26i2.19328.
- [7] D. I. Vaillant-Flores, "Los líquenes, una alternativa para el control de fitopatógenos," *Fitosanidad*, vol. 18, no. 1, pp. 51–57, 2014.
- [8] C. E. Jaramillo-Ordoñez, "Actividad antifúngica y antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de *Usnea laevis* frente a *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*," *Rev. Med. Hered.*, vol. 31, no. 3, pp. 169–174, 2020, Doi: 10.20453/rmh.v31i3.3806.
- [9] C. Fernández Moriano, M. Gómez-Serranillos, y A. Crespo, "Antioxidant potential of lichen species and their secondary metabolites: A systematic review," *Pharm. Biol.*, vol. 54, pp. 1–17, 2015, Doi: 10.3109/13880209.2014.1003354.
- [10] C. Fernández Moriano, P. Divakar, A. Crespo, M. Gómez-Serranillos, "Neuroprotective activity and cytotoxic potential of two *Parmeliaceae* lichens: Identification of active compounds," *Phytomedicine*, vol. 22, 2015, Doi: 10.1016/j.phymed.2015.06.005.

- [11] M. Kello *et al.*, "Screening evaluation of anti-proliferative, antimicrobial and antioxidant activity of lichen extracts and secondary metabolites *in vitro*," *Plants*, vol. 12, no. 3, p. 611, 2023, Doi: 10.3390/plants12030611.
- [12] R. Brakni y A. M. Ali, "Antibacterial activity of the chloroform, acetone, methanol and aqueous extracts of Algerian lichens," *Jordan J. Pharm. Sci.*, vol. 11, no. 2, 2018. [En línea]. Disponible: <https://journals.ju.edu.jo/JJPS/article/view/101814>
- [13] C. Condò *et al.*, "Lichens as a natural source of compounds active on microorganisms of human health interest," *Appl. Sci.*, vol. 13, no. 3, p. 1976, 2023, Doi: 10.3390/app13031976.
- [14] L. Abuiraq, G. Kanan, M. Wedyan, y A. El-Oqlah, "Efficacy of extracts of some lichens for potential antibacterial activity," Unpublished.
- [15] M. Srinivas, K. V. Siva Shanmugam, y H. G. Neelakantan, "Natural product investigation in lichens: Extraction and HPLC analysis of secondary compounds in mycobiont cultures," in *Methods Mol. Biol.*, vol. 2489, pp. 459–468, 2022, Doi: 10.1007/978-1-0716-2273-5_24.
- [16] S. Komaty *et al.*, "Efficiency and selectivity of ionic liquids in microwave-assisted extraction of major lichen phenolic compounds: A scalable process with recycling of ionic liquids," *Phytochem. Anal.*, vol. 32, no. 4, pp. 592–600, 2021, Doi: 10.1002/PCA.3008.
- [17] D. Parrot *et al.*, "Qualitative and spatial metabolite profiling of lichens by a LC–MS approach combined with optimised extraction," *Phytochem. Anal.*, vol. 26, no. 1, pp. 23–33, 2015, Doi: 10.1002/PCA.2532.
- [18] Ł. Furmanek *et al.*, "A spectrophotometric analysis of extracted water-soluble phenolic metabolites of lichens," *Planta*, vol. 260, no. 2, 2024, Doi: 10.1007/s00425-024-04474-3.
- [19] M. Piñeiro *et al.*, "Biological activities of *Usnea lethariiformis* lichen extracts and UHPLC-ESI-QTOF-MS analysis of their secondary metabolites," *Front. Pharmacol.*, vol. 15, 2025, Doi: 10.3389/fphar.2024.1508835.
- [20] M. Mohammadi, V. Zambare, Z. E. Suntres, y L. P. Christopher, "Isolation, characterization, and breast cancer cytotoxic activity of gyrophoric acid from the lichen *Umbilicaria muhlenbergii*," *Processes*, vol. 10, no. 7, p. 1361, 2022, doi: 10.3390/pr10071361.
- [21] R. Kalra, X. A. Conlan, C. Areche, R. Dilawari, y M. Goel, "Metabolite profiling of the Indian food spice lichen, *Pseudevernia furfuracea* combined with optimised extraction methodology to obtain bioactive phenolic compounds," *Front. Pharmacol.*, vol. 12, p. 629695, 2021, doi: 10.3389/FPHAR.2021.629695.
- [22] M. Kosanić, "Extracts of five *Cladonia* lichens as sources of biologically active compounds," *Farmacia*, vol. 66, no. 4, pp. 644–651, 2018, Doi: 10.31925/FARMACIA.2018.4.13.
- [23] L. J. Rao, "Improved chromatographic method for the purification of phenolic constituents of the lichen *Parmotrema*," Unpublished, 1998.
- [24] R. Frenák *et al.*, "Isolation and identification of lichen substances for biological and ecological roles," in *Lichenology: Past, Present and Future*, Springer Int. Publ., pp. 1–66, 2023, Doi: 10.1007/978-3-031-30037-0_29-1.
- [25] D. Fahselt, "Protocols in lichenology: Culturing, biochemistry, ecophysiology and use in biomonitoring," *Lichenologist*, vol. 34, no. 3, p. 273, 2002, Doi: 10.1006/LICH.2002.0388.
- [26] Sipman, H.J.M. & Aguirre C., J. (1982). Contribución al conocimiento de los líquenes de Colombia - I. Clave genérica para los líquenes foliosos y fruticosos de los páramos colombianos. *Caldasia*, 13(64): 603-634

- [27]** M. Šenica and M. Mikulic-Petkovsek, "Changes in beneficial bioactive compounds in eight traditional herbal liqueurs during a one-month maceration process," *J. Sci. Food Agric.*, vol. 100, 2019, Doi: 10.1002/jsfa.10044.
- [28]** F. Salgado *et al.*, "Secondary metabolite profiling of species of the genus *Usnea* by UHPLC-ESI-OT-MS-MS," *Molecules*, vol. 23, no. 1, p. 54, 2018, Doi: 10.3390/molecules23010054.
- [29]** S. Dresler, I. Baczewska, O. Mykhailenko *et al.*, "Extraction of lichen bioactive compounds using volatile natural deep eutectic solvents and comparative analytical approaches," *Sci. Rep.*, vol. 15, p. 22742, 2025, doi: 10.1038/s41598-025-08069-0.
- [30]** N. Ramírez-Morán, M. León, and R. Lücking, "Uso de biotipos de líquenes como bioindicadores de perturbación en fragmentos de bosque altoandino (Reserva Biológica Encenillo, Colombia)," *Caldasia*, vol. 38, pp. 31–52, 2016, Doi: 10.15446/caldasia.v38n1.57821.