

Identificación de compuestos con actividad antimicrobiana presentes en líquenes del estado de Guanajuato.

Arteaga-Chávez, M.¹; Álvarez-Mejía, C.²; López-Ramírez, V.^{1*}

Datos de Adscripción:

¹ Tecnológico Nacional de México/ITS de Irapuato. Coordinación de Ing. Bioquímica. Carretera Irapuato-Silao km 12.5, C. P. 36821., Col. El Copal, Irapuato, Guanajuato, México.

*Correspondencia: varinia.lr@irapuato.tecnm.mx.

² Tecnológico Nacional de México/ITS de Abasolo, Coordinación de Ingeniería Ambiental, Blvd. Cuitzeo de los Naranjos 401, C. P. 36976, Col. Cuitzeo de los Naranjos, Abasolo, Guanajuato, México.

Resumen - Los líquenes son organismos conformados por la asociación simbiótica entre un micobionte y un fotobionte. Los fotobiontes son responsables de la síntesis de azúcares simples, mientras que los micobiontes sintetizan compuestos con diversas actividades biológicas entre ellos algunos con actividad antimicrobiana. En el presente trabajo se realizó el análisis de los líquenes, *Usnea filipendula*, *Usnea strigosa*, *Cladonia rangiferina*, *Physcia semipinnata*, *Flavoparmelia caperata* y tres especies de *Flavoparmelia spp.*, para determinar si sus extractos orgánicos presentaba actividad antibacteriana frente a cepas patógenas (*Escherichia coli* 72U, *Staphylococcus aureus* 82F, *Klebsiella pneumoniae* 112F, *S. aureus* 23F y *S. aureus* 34F). Los ensayos de inhibición se realizaron en agar infusión cerebro corazón y se determinaron los halos de inhibición. Los resultados obtenidos mostraron que los extractos con acetona de las especies del género *Usnea*, *Cladonia rangiferina* y *Physcia semipinnata* presentan una mayor actividad antimicrobiana. Los compuestos liquénicos más representativos en los extractos fueron el ácido úsnico y el ácido fumarprotocetrárico. El aprovechamiento de los diversos metabolitos sintetizados por líquenes permitirá el empleo de nuevos compuestos con actividad antimicrobiana que puedan ser empleados en el control de patógenos.

Palabras Clave – *Actividad antimicrobiana, Inhibición microbiana, Líquenes, Metabolitos secundarios.*

Abstract - Lichens are organisms formed by the symbiotic association between a mycobiont and a photobiont. Photobionts are responsible for the synthesis of small sugars, while mycobionts synthesize compounds with different biological activities, including some with antimicrobial activity. In this work, the analysis of lichens, *Usnea filipendula*, *Usnea strigosa*, *Cladonia rangiferina*, *Physcia semipinnata*, *Flavoparmelia caperata* and three species of *Flavoparmelia spp.*, was carried out to determine if their organic extracts had antimicrobial activity against pathogenic strains (*Escherichia coli* 72U, *Staphylococcus aureus* 82F, *Klebsiella pneumoniae* 112F, *S. aureus* 23F and *S. aureus* 34F). Inhibition assays were performed on brain-heart infusion agar and inhibition halos were determined.

The results obtained showed that the acetone extracts of the species of the genus *Usnea*, *Cladonia* and *Physcia* have a higher antimicrobial activity. The most representative lichen compounds present in the extracts were usnic acid and fumarprotocetraric acid. The use of the diverse metabolites synthesized by lichens would allow us their use and to take advantage of their antimicrobial activity to control of pathogens.

Keywords - *Antimicrobial activity, Lichens, Microbial inhibition, Secondary metabolites*

I. INTRODUCCIÓN

Los líquenes son organismos producto de una asociación simbiótica entre fotobiontes (algas o cianobacterias) y micobiontes (hongos liquenizados). El micobionte provee metabolitos secundarios, agua y sales minerales, mientras que el fotobionte otorga a la simbiosis, productos fotosintéticos, como azúcares de bajo peso molecular y en algunos casos puede determinar la aptitud del micobionte a soportar las condiciones ambientales (Almer et al., 2023). Los líquenes presentan morfotipos distintivos (costrosos, fruticosos y foliosos) y por no depender del sustrato al que se asocian, su distribución es cosmopolita (Álvarez-Mejía et al., 2022), se pueden desarrollar sobre rocas, cortezas, hojas de árboles, suelos, muros, etc. Además, pueden tolerar la radiación UV debido a la producción de metabolitos secundarios que son sustancias capaces de actuar como antioxidantes, que son sintetizados en bajas concentraciones (Bonny et al., 2009).

Se aplica el término “compuestos liquénicos” o “sustancias liquénicas” a todos los metabolitos sintetizados exclusivamente por líquenes. Los tipos de compuestos liquénicos según su estructura son: antraquinonas, xantonas, derivados de terpenos, dépsidos, depsidonas, depsonas, ácidos orgánicos, dibenzofuranos, entre otros. La mayoría de ellos son sintetizados a partir de las vías de acetil malonato, mevalonato y shikimato (Ren et al., 2023), y se depositan en la medula del cuerpo del liquen (Nash III, 2008). Hasta ahora se han reportado más de mil compuestos liquénicos, aunque de pocos se ha logrado identificar los genes involucrados en su síntesis (Singh, 2023).

Los líquenes son indicadores de contaminación ambiental, y presentan propiedades farmacológicas, médicas, capacidad quelante, participan en reacciones fotoquímicas ligadas a cationes y capacidad pigmentante (Castro, 2010; Elkhateeb et al., 2019; Molnár y Farkas, 2010); así como compuestos con

actividad antimicrobiana frente a bacterias y hongos patógenos (Oh et al., 2018; Furmanek et al., 2022), actividad anticancerígena (Dar et al., 2022), antiviral (Fazio et al., 2007) entre otras.

La búsqueda de compuestos con actividad antimicrobiana es estratégica dada la multiresistencia que muchas especies bacterianas están presentando actualmente. En este trabajo, determinamos la actividad antimicrobiana de metabolitos secundarios provenientes de líquenes presentes en el estado de Guanajuato.

II. PARTE TÉCNICA DEL ARTÍCULO

2.1 Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas fueron proporcionadas por el M. en C. Carlos Lozano García de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN, las cuales fueron identificadas como: *Escherichia coli* 0:157 72U, *Staphylococcus aureus* 34F, *Staphylococcus aureus* 23F, *Klebsiella pneumoniae* 112F y *Staphylococcus aureus* 82F, cultivadas por medio estandar y condiciones reportadas para cada una de ellas, su manejo se realizó a través de agar BHI.

2.2 Muestras de líquenes analizadas

Los líquenes empleados en este trabajo fueron colectados en la Sierra de Santa Rosa, Guanajuato (Latitud 21.1322; Longitud -101.202). Las muestras colectadas se colocaron en sobres de papel manila para su resguardo y traslado. Los líquenes forman parte de la colección del Laboratorio de Diversidad e Interacción Microbiana del Instituto Tecnológico Superior de Irapuato manteniéndose en sobres manila a temperatura ambiente alejados del sol.

2.3. Obtención de extractos orgánicos

Los extractos orgánicos se obtuvieron pesando 0.01 g de una muestra de líquen y adicionando 100 µL de solvente reportado anteriormente para su análisis por cromatografía (Hale, 1969) utilizando acetona, éter de petróleo o acetato de etilo, según sea el caso, macerando la muestra y posteriormente incubando durante 24 h a 4°C para su posterior uso.

2.4 Preparación de pre-inóculos

Se realizaron preinóculos de las cepas bacterianas en tubos de ensayo con 5 mL de caldo infusión cerebro corazón (BHI). Las cepas se incubaron a 37° C durante 24 h para su uso en los ensayos de inhibición. Para que el inóculo fuera apto para emplearse en los ensayos se verificó que la densidad óptica fuera de 0.5 de absorbancia a una longitud de onda de 600 nm, utilizando caldo BHI como blanco.

2.5 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos.

Para los ensayos de inhibición se realizó en cajas Petri donde fueron inoculadas las cepas bacterianas en medio agar infusión-cerebro, corazón como a continuación se describe. Se inocularon 100 µL de los preinóculos de 0.5 de absorbancia a 600 nm en tres cajas, los cuales serán utilizadas para la inhibición de los extractos por cada solvente, (acetona, éter de petróleo o acetato de etilo). El inóculo bacteriano se espatuló con un asa de vidrio

previamente desinfectada con etanol al 96% (v/v) y flameada. Posteriormente se agregaron sobre el medio discos de papel filtro estériles (0.5 cm, de diámetro) previamente tratados con el extracto líquénico como a continuación se menciona. Los discos fueron colocados en un portaobjetos estéril y se les adicionaron 2 µL de extracto líquénico hasta alcanzar 10 µL totales, para posteriormente colocarse en el interior de las cajas Petri. Las cajas se incubaron a 37° C durante 24 h o hasta la aparición de halos de inhibición para su posterior medición.

2.6 Determinación de metabolitos por cromatografía en capa fina.

La identificación de metabolitos secundarios que presentaron actividad antimicrobiana se realizó por medio de cromatografía en capa fina (TLC), en placas de silica gel de 5 x 10 cm (Fluka analytical™ SIGMA-ALDRICH®) a las muestras de líquenes de *Usnea filipendula*, *Usnea strigosa*, *Flavoparmelia spp*, *Physcia semipinnata* y *Flavoparmelia caperata*, que presentaron dicha actividad. La extracción de los compuestos líquénicos fue realizada como anteriormente se describió.

Se empleó una solución de tolueno:ácido acético 170:30, como fase móvil y como agente revelador se utilizó yodo metálico. El factor de retención (Rf) de los compuestos se calculo como se indica en la ecuación 1.

$$R_f = \frac{\text{Distancia que recorre la muestra en la placa de TLC}}{\text{Distancia total de la placa}} \quad (1)$$

Los Rf de los compuestos revelados fueron cotejados en la guía propuesta por Huneck y Yoshimura (1996) para una aproximación de su identidad química.

2.6 Microcristalización de compuestos líquénicos.

La microcristalización de compuestos líquénicos se realizó siguiendo la metodología propuesta por Hale (1969). Se disecta un fragmento de líquen sobre un portaobjetos, posteriormente se adiciona acetona en la muestra y se deja evaporar. Esta acción se realiza hasta la formación de un halo de color blanco en el portaobjetos. Posteriormente, se retira la muestra de líquen y se agrega una gota de G.A (Glicerina-ácido acético, 3:1) o G.E.A (Glicerina-Etanol-Agua, 1:1:1) y se fija con ayuda de un mechero de alcohol suavemente hasta observar pequeñas burbujas. La muestra se deja reposar por 24 h para permitir la formación de cristales los cuales son observados a través del microscopio óptico con el objetivo de 40X. La forma de los cristales se comparó en guías de identificación (Huneck y Yoshimura, 1996) para una identificación probable del compuesto químico.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Los extractos orgánicos de líquenes inhiben de forma diferencial a las bacterias analizadas.

En este trabajo se emplearon extractos orgánicos de especies de líquenes colectados en el estado de Guanajuato. En la Figura 1, se pueden observar la morfología de las especies evaluadas, destacan los morfotipos folioso y fruticoso.

Para evaluar la capacidad inhibitoria de los extractos orgánicos frente a diferentes géneros bacterianos, los ensayos

de inhibición bacteriana se realizaron por triplicado. En la Figura 2, se muestra un ejemplo de los resultados obtenidos en los ensayos de inhibición.

Figura 1

Especies de líquenes analizadas en este trabajo. **A.** *Usnea strigosa* (Us); **B.** *Usnea filipendula* (Uf); **C.** *Flavoparmelia* spp. (Fs2); **D.** *Flavoparmelia* spp. (Fs3); **E.** *Physcia semipinnata* (Ps); **F.** *Flavoparmelia* spp. (Fs1); **G.** *Cladonia rangiferina* (Cr); **H.** *Favoparmelia caperata* (Fc).

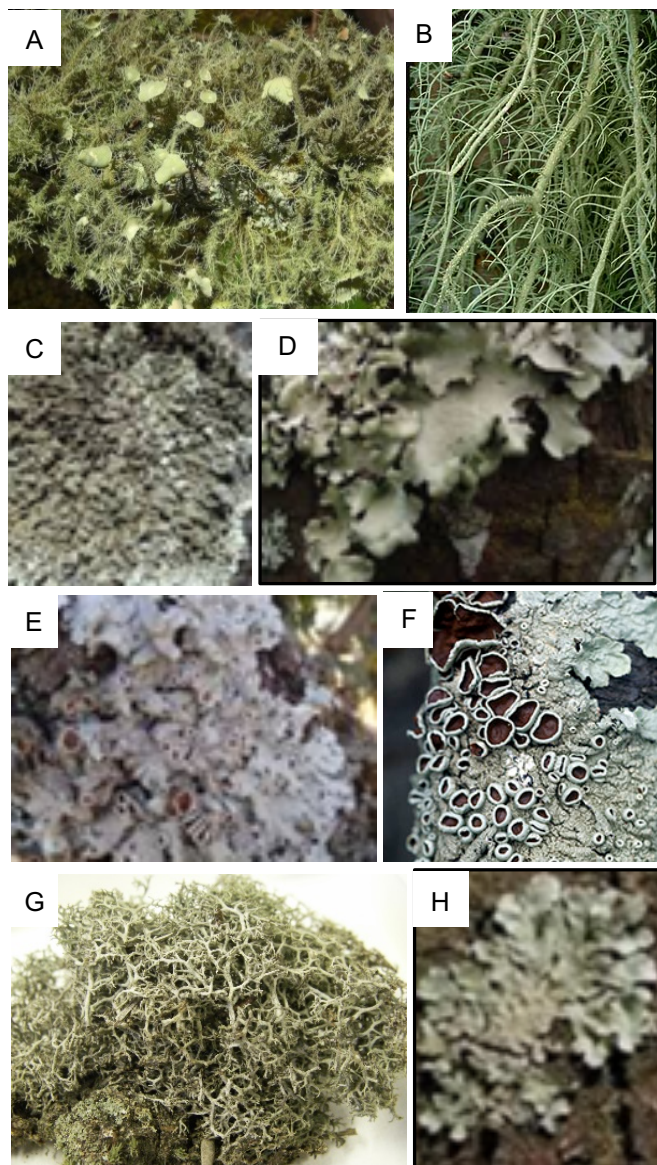
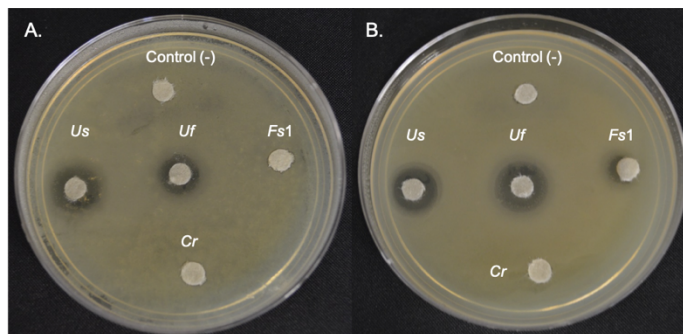


Figura 2

Ensayos de inhibición de especies bacterianas con extractos orgánicos de líquenes. **A.** Inhibición de *S. aureus* 82F con extractos de acetona de *Usnea filipendula* (Uf), *Usnea strigosa* (Us), *Flavoparmelia* spp. (Fs1) y *Cladonia rangiferina* (Cr). **B.** Inhibición de *Escherichia coli* O:157 H772U con extractos de éter de petróleo de *Usnea filipendula* (Uf), *Usnea strigosa* (Us), *Flavoparmelia* spp. (Fs1) y *Cladonia rangiferina* (Cr). El control negativo corresponde al solvente empleado en cada ensayo.



Los resultados de los ensayos de inhibición del crecimiento bacteriano con los diferentes extractos orgánicos de líquenes se reportan como valores promedio de los halos de inhibición (cm) en las Figuras 3-7.

Los extractos orgánicos de las especies de *Usnea filipendula*, seguido de *Usnea strigosa*; fueron los que presentaron una mayor actividad antimicrobiana en las bacterias Gram negativas *Escherichia coli* O:157H7 72U y *Klebsiella pneumoniae* 112F, en comparación con las cepas de *Staphylococcus aureus* 82F. Esta diferenciación en la capacidad inhibitoria de los compuestos líquénicos es similar a lo reportado por Micheletti et al., (2021).

Figura 3

Inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* O:157 H7 72U con los extractos orgánicos de especies líquénicas. Se distingue un efecto mayor con la especie *Usnea filipendula* con el extracto de éter de petróleo.

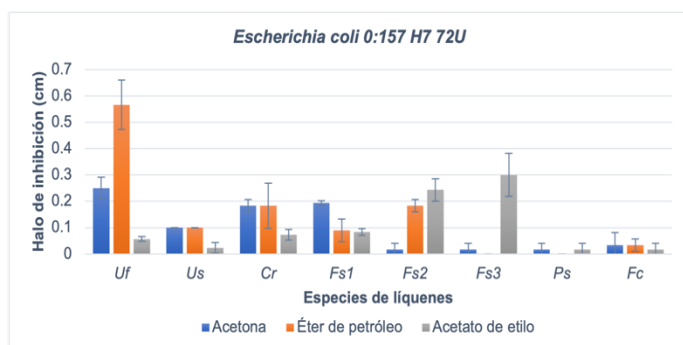


Figura 4

Inhibición del crecimiento de *Klebsiella pneumoniae* 112F con extractos orgánicos líquénicos. Se observa un efecto inhibitorio en los tres extractos, destacándose el extracto con acetato de etilo, en las especies *Usnea*, *Cladonia rangiferina* y *Flavoparmelia* spp. (Fs1).

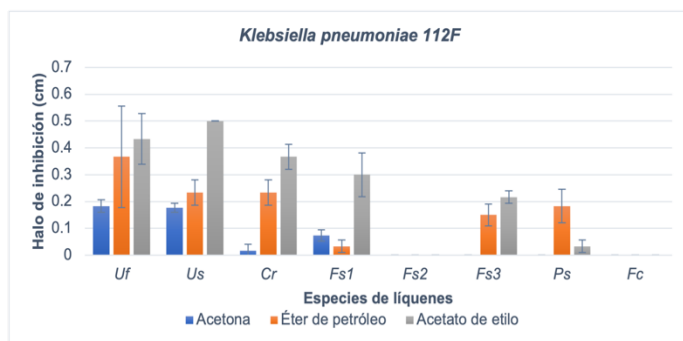


Figura 5
Efecto de inhibición con extractos orgánicos de líquenes en *Staphylococcus aureus* 23F. Se observa que el extracto de acetona de las especies del género *Usnea* muestra el mayor efecto inhibitorio.

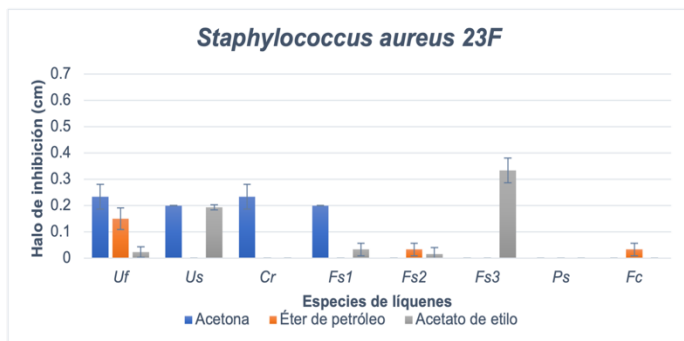


Figura 6
Inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* 34F. Se observa una mayor inhibición con los extractos de acetato de etilo, seguidos por los de acetona

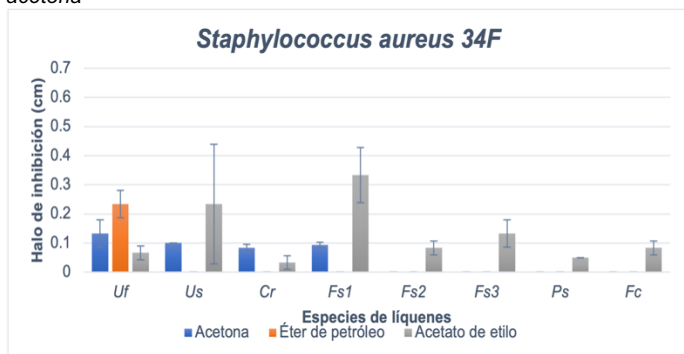
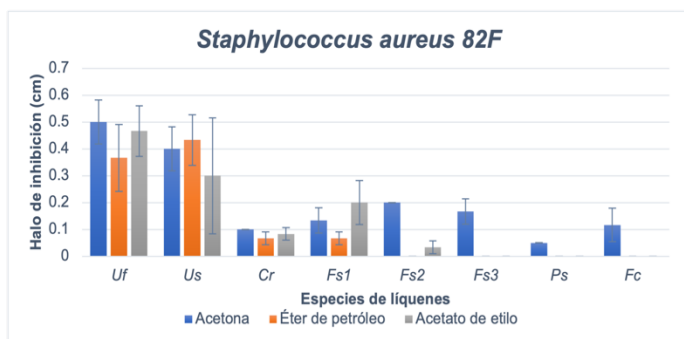


Figura 7
Inhibición del crecimiento en *Staphylococcus aureus* 82F con extractos líquénicos. Para esta cepa, los tres extractos empleados se observó una inhibición, siendo mayoritaria en acetona, seguida por acetato de etilo y finalmente con éter de petróleo, las especies con mayor actividad inhibitoria fueron las especies del género *Usnea*.



Los ensayos de inhibición bacteriana mostraron que los extractos orgánicos de las especies *Usnea filipendula* y *Usnea strigosa*, fueron los que poseen mayor capacidad antimicrobiana seguido de las especies *Flavoparmelia spp.* y *Flavoparmelia caperata*. Las cepas Gram negativo fueron inhibidas en los ensayos teniendo mayor efecto con los extractos orgánicos de acetato de etilo y acetona.

Lo anterior coincide con lo reportado por Robles et al., (1992), donde señala que los compuestos polares son los que poseen mayor actividad antimicrobiana, como es el caso de los extractos orgánicos empleados en este trabajo con acetona, donde se identificaron el mayor número de compuestos líquénicos en los análisis de cromatografía de capa fina en comparación de acetato de etilo en orden de polaridad. Se han reportado que los extractos orgánicos presentan mayor eficiencia en la inhibición bacteriana y de levaduras que los extractos acuosos (Chauhan y Abraham, 2013).

La cepa de *Staphylococcus aureus* 82F es inhibida por parte de los tres extractos orgánicos, principalmente con el solvente de acetona, en comparación con las otras cepas de *Staphylococcus aureus*, que mostraron mayor resistencia ante los compuestos líquénicos. Se ha observado que las cepas patógenas de *S. aureus* pueden ser inhibidas por sustancias líquénicas en rangos de 0.78 a 25 µg/mL (Oh et al., 2018).

3.2 Los compuestos líquénicos presentes en los extractos orgánicos identificados corresponden en su mayoría a ácidos orgánicos.

Aquellos extractos orgánicos en los que se observó una mayor inhibición de las cepas bacterianas se separaron mediante TLC, para conocer su composición. Los Rf de los compuestos identificados se cotejaron en la guía de identificación propuesta por Huneck y Yoshimura (1996).

Los compuestos identificados se muestran en las Tablas 1-3.

Tabla 1. Compuestos líquénicos obtenidos por cromatografía en capa fina de extractos con acetona de los líquenes ensayados.

Liquen	Rf	Metabolito secundario identificado
<i>Usnea filipendula</i>	0.56	Loxodina
	0.59	Ácido úsnico
	0.64	Ácido hipostítico
<i>Usnea strigosa</i>	0.70	Ácido hipoprotocetrárico
<i>Flavoparmelia spp. 1</i>	0.40	Ác. fumarprotocetrárico
	0.70	Ác. hipoprotocetrárico
	0.74	Ácido stítico
<i>Flavoparmelia spp. 2</i>	0.04	Ácido constítico
	0.32	Ácido salazínico
	0.42	Ác. fumarprotocetrárico
<i>Flavoparmelia spp. 3</i>	0.42	Ác. fumarprotocetrárico

Tabla 2. Compuestos líquénicos caracterizados por cromatografía en capa fina de extractos con acetato de etilo de los líquenes evaluados.

Liquen	Rf	Metabolito secundario identificado
<i>Usnea filipendula</i>	0.18	Ácido hipoconstítico
	0.33	Ácido salazínico
	0.36	Ácido pannárico
	0.40	Ác. fumarprotocetrárico
	0.45	Ácido barbatólico
<i>Usnea strigosa</i>	0.28	Ácido caperático
	0.40	Ác. Fumarprotocetrárico
	0.46	Ác. norstítico
<i>Flavoparmelia spp. 1</i>	0.40	Ác. fumarprotocetrárico
	0.46	Ácido norstítico
<i>Flavoparmelia spp. 2</i>	0.18	Ácido hipoconstítico
	0.22	Eritrina
	0.39	Ác.succininprotocetrárico

<i>Flavoparmelia</i> spp. 3	0.50	Ácido lecanórico
	0.40	Ác. fumarprotocetrárico
	0.46	Ácido norstictico

Tabla 3. Compuestos liquénicos identificados por cromatografía en capa fina a partir de extractos con acetona (a) y acetato de etilo (ae) de las especies liquénicas analizadas.

Liquen	Rf	Metabolito secundario identificado
<i>Physcia semipinnata</i> (a)	0.21	Eritrina
	0.29	Ácido salazínico
	0.40	Ác. fumarprotocetrárico
	0.49	4-O-ác. dimetilbarbatico
	0.53	Norlobaridona
	0.59	Ácido úsnico
<i>Physcia semipinnata</i> (ae)	0.69	Ácido hipoprotocetrárico
	0.39	Ác succininprotocetrárico
	0.45	Ácido barbatólico
	0.52	Ácido barbítico
	0.57	Ácido úsnico
<i>Flavoparmetia caperata</i> (a)	0.69	Ác. hipoprotocetrárico
	0.43	Ác. fumarprotocetrárico
	0.52	Ácido barbítico
	0.56	Loxodina
	0.57	Ácido úsnico
<i>Flavoparmelia caperata</i> (ae)	0.66	Norlobaridona
	0.15	Ácido hipocostictico
	0.28	Ácido caperático
	0.36	Ácido pannárico
	0.53	Norlobaridona

Los compuestos liquénicos identificados por TLC mostraron que los solventes empleados extraen preferentemente ácidos orgánicos, siendo el ácido fumarprotocetrárico y ácido úsnico, los que se identificaron en la mayoría de las muestras. De acuerdo a Kosanić et al., (2014), en su evaluación de la inhibición del crecimiento de cepas de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* con extractos orgánicos de *Cladonia rangiferina*, determinaron que el ácido fumarprotocetrárico presente en esta especie liquénica posee junto con el ácido úsnico, actividad antimicrobiana en las cepas evaluadas; dicho efecto se corrobora en este trabajo de investigación.

Otra estrategia de identificación de compuestos liquénicos es la microcristalización. En las muestras de líquenes analizadas se logro cristalizar compuestos asociados en su mayoría a ácidos orgánicos como se observa en la Tabla 4 y la Figura 8.

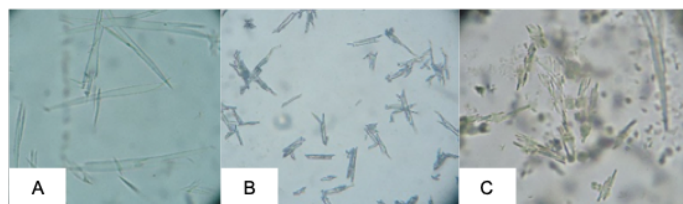
Tabla 4. Compuestos liquénicos cristalizados empleando G.A (Glicerina-ácido acético, 3:1) o G.E.A (Glicerina-Etanol-agua, 1:1:1).

Liquen	Reactivo	Descripción	Metabolito
<i>Usnea filipendula</i>	G.A	Agujas rectas	Ácido úsnico
	G.E.A	amarillas	
<i>Usnea strigosa</i>	G.A	Láminas amarillas	Ácido norstictico
	G.E.A	Agujas finas	Ácido confluentínico
<i>Cladonia rangiferina</i>	G.A	Placas rectangulares	Ácido girofórico
	G.E.A	Agujas cortas	Ácido fumarprotocetrárico
<i>Flavoparmelia</i> spp. 1	G.A	Agujas ramificadas	Ácido perlatórico

<i>Flavoparmelia</i> spp. 2	G.E.A	Agujas rectas amarillas	Ácido úsnico
	G.A	Agujas ramificadas	Ácido perlatórico
<i>Flavoparmelia</i> spp. 3	G.E.A	Agujas delgadas	Ácido imbricárico
	G.A	Prismas rómbicos	Cloroantranorina
<i>Physcia semipinnata</i>	G.E.A	Agujas cortas	Ác. Fumarprotocetrarico
	G.A	Agujas rómbicas	Antranorina
<i>Flavoparmelia caperata</i>	G.A	Cristales translúcidos	Ác. Divaricatico
	G.E.A	Agujas cortas	Ác. Fumarprotocetrarico
<i>Flavoparmelia caperata</i>	G.A	Agujas rectas	Ácido úsnico
	G.E.A	Agujas cortas	Ác. fumarprotocetrarico

A partir de las estrategias implementadas se pudo identificar compuestos liquénicos con actividad antimicrobiana (Arachchige Ishara Shiromi et al., 2021), como es el caso del ácido úsnico, el ácido caperático, el ácido norstictico, la antranorina, entre otros. Incluso algunos de estos compuestos reportan actividad antimicrobiana a concentraciones por debajo de antibióticos tradicionales como la vancomicina (Oh et al., 2018).

Figura 8 Visualización microscópica (40X) de algunos compuestos liquénicos cristalizados con Glicerina:ácido acético 3:1 y Glicerina: alcohol:agua 1:1:1. A) Ácido fumarprotocetrárico; B) Antranorina; C) Ácido úsnico.



IV. CONCLUSIONES

La multiresistencia que presentan actualmente diversas cepas bacterianas hace que sea determinante la identificación y caracterización de nuevos compuestos con actividad antimicrobiana. Los líquenes representan por lo tanto, una oportunidad para ser empleados en tratamiento y control de bacterias patógenas. El estado de Guanajuato posee una diversidad de especies de líquenes, aún por determinar, por lo que es necesario aumentar los estudios de identificación de líquenes en la región, así como la caracterización de los compuestos liquénicos que sistetizan. Este estudio es una aproximación a la descripción metabólica y taxonómica de líquenes presentes en el estado de Guanajuato.

V. AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Tecnológico Nacional de México/Instituto

Tecnológico Superior de Irapuato y al Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico Superior de Abasolo, por todas las facilidades prestadas para la realización de este trabajo.

VI. REFERENCIAS

- Almer, J., Resl, P., Gudmundsson, H., Warshan, D., Andrésón, O. S., Werth, S. (2023). Symbiont-specific responses to environmental cues in a threesome lichen symbiosis. *Molecular Ecology*, 32, 1045-1061. <https://doi.org/10.1111/mec.16814>.
- Álvarez-Mejía, C., Morales-Vargas, A., López-Ramírez, V. (2022). Potencial biotecnológico de los líquenes: una ventana metabólica. *Revista Electrónica de Ingeniería y Aplicación, REIA*, 6(4), 28-39.
- Arachchige Ishara Shiromi P. S., Punvakanthi Hewawasam, R., Udeni Jayalal R. G., Rathnayake, H., Mudiyansele, W., Bandara Wijayaratne, D. G., Wanniarachchi, D. (2021). Chemical Composition and Antimicrobial activity of Two Sri Lankan Lichens, *Parmotrema rampoddense*, and *Parmotrema tinctorum* against Methicillin-Sensitive and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Hindawi. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. <https://doi.org/10.1155/2021/9985325>
- Bonny, S., Hitti, E., Boustie, J., Bernard, A., Tomasi, S. (2009). Optimization of a microwave-assisted extraction of secondary metabolites from crustose lichens with quantitative spectrophotodensitometry analysis. *Journal of Chromatography*, 1216(45), 7651–7656. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.09.009>
- Castro, O. (2011). Contribución al estudio fitoquímico de la *Psiloparmelia distincta* (Nyl.) Hale. *Rev Soc Quím Perú*, 77(1), 56-65. <http://www.scielo.org.pe/pdf/rsqp/v77n1/a06v77n1.pdf>
- Chauhan, R., Abraham, J. (2013). *In vitro* antimicrobial potential of the lichen *Parmotrema* sp. extracts against various pathogens. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 16(7), 882–885.
- Dar, T. U. H., Dar, S. A., Islam, S. U., Mangral, Z. A., Dar, R., Singh, B. P., Verma, P., Haque, S. (2022). Lichens as a repository of bioactive compounds: an open window for green therapy against diverse cancers. *Seminars in cancer biology*, 86(Pt2), 1120–1137. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2021.05.028>
- Elkhateeb, W. A., Daba, G. M. (2019). Lichens, an alternative drugs for modern diseases. *Int. J. Res. Pharm. Biosci.* 6(10), 5–9.
- Fazio, A., Adler, M., Bertoni, M., Sepúlveda, C., Damonte, E., Maier, M. (2007). Lichen Secondary Metabolites from the Cultured Lichen Mycobionts of *Teloschistes chrysophthalmus* and *Ramalina celastri* and their Antiviral Activities. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 62(7-8), 543-549. <https://doi.org/10.1515/znc-2007-7-813>
- Furmanek, L., Czarnota, P., Seaward, M. R. D. (2022). The effect of lichen secondary metabolites on *Aspergillus* fungi. *Archives of Microbiology*, 204:100. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02649-0>.
- Hale, M. (1969). How to know the Liches. United States of America: Wm. C Brown Company Publishers.
- Huneck, S., Yoshimura, I. (1996). Identification of lichen substances. Springer.
- Kosanić, M., Ranković, B., Stanojković, T., Rančić, A., Manojlović, N. (2014). *Cladonia* lichens and their major metabolites as possible natural antioxidant, antimicrobial and anticancer agents. *LWT-Food Science and Technology*, 59(1), 518-525. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.04.047>
- Micheletti, A. C., Honda, N. K., Ravaglia, L. M., Matayoshi, T., Spielman, A. A. (2021). Antibacterial potential of 12 lichen species. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, 93(4):e20191194 DOI 10.1590/0001-3765202120191194.
- Molnár, K., Farkas, E. (2010). Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: a Review. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 65(3-4), 157-173. <https://doi.org/10.1515/znc-2010-3-401>
- Nash III, T. H. (2008). *Lichen Biology*. 2nd ed.; C. U. Press, Ed. New York, USA, 4.
- Oh, Min J., Jeong Kim, Y., Gang, H-S., Han, J., Ha, H-H., Kim, H. (2018). Antimicrobial Activity of Divaricatic Acid Isolated from Lichen *Evernia mesomorpha* against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Molecules*, 23, 3068. doi:10.3390/molecules23123068
- Ren, M., Jiang, S., Wang, Y., Pan, X., Pan, F., Wei, X. (2023). Discovery and excavation of lichen bioactive natural products. *Front. Microbiol.* 14:1177123. doi: 10.3389/fmicb.2023.1177123
- Robles, C., J.; Pastor, A.; Morales, P. (1992). Líquenes y sustancias líquénicas, *Revista Química – PUCP*, 6, 65-76.
- Singh, G. (2023). Linking Lichen Metabolites to Genes: Emerging Concepts and Lessons from Molecular Biology and Metagenomics. *J. Fungi*, 9, 160. <https://doi.org/10.3390/jof9020160>.