

CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS LIQUÉNICOS OBTENIDOS DEL GÉNERO *USNEA* SP.

Laura Katherine Trullo Cometa¹, Paula Andrea Ramírez Galindez¹, Ana Carolina Lemos Delgado¹, Marcelo Alexander Guancha³

¹Aprendiz Tecnoacademia Cali, área de Biotecnología, Centro ASTIN, SENA Regional Valle,

²Bióloga, Instructora SENNOVA, Centro Náutico Pesquero de Buenaventura, SENA Regional Valle.

³Instructor SENNOVA, Centro Nacional de Asistencia Técnica a la Industria, SENA Regional Valle, Calle 5 No. 11-68 Centro Innovación – Tecnoacademia Piso 2.

Resumen

En este trabajo se realizó la caracterización fisicoquímica por medio de métodos de microscopía y test de coloración para la identificación de compuestos de líquenes del género *Usnea*. Las muestras fueron colectadas en la zona rural de Cali vía km 18. Adicionalmente, se observó actividad antimicrobiana al utilizar los siguientes microorganismos patógenos: *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. Los solventes de extracción que se utilizaron fueron Etanol y Diclorometano (DM). El contenido de fenoles totales y actividad antioxidante de extractos liquénicos presentó diferente polaridad. El contenido de fenoles totales fue $190,45 \pm 3,48$ mgAG/gES para DM y de $66,19 \pm 1,09$ mgAG/gES para etanol. La capacidad antioxidante total de inhibición obtenida de los extractos etanólicos y de DM fueron $19,90 \pm 1,99$ y $48,17 \pm 2,89$ μ mol AA/g ES respectivamente. Los resultados obtenidos demuestran que existe un potencial biotecnológico en los metabolitos secundarios provenientes de los líquenes en aplicaciones industriales.

Palabras clave

Líquenes, metabolitos secundarios, ácido úsnico

Introducción

Los líquenes son organismos formados por la simbiosis de un hongo filamentoso y un alga microscópica (clorofita o cianobacteria). En esta asociación, el hongo recibe el nombre de micobionte y el componente fotosintético se denomina fotobionte (Gunasekaran et al., 2016). El hongo se encarga de proteger al alga de las radiaciones directas del sol, le proporciona agua y sales minerales; por su parte, el alga realiza fotosíntesis y suministra al micobionte

alimento y vitaminas (Vaillant, 2014). Los líquenes aprovechan la capacidad del fotobionte para sintetizar hidratos de carbono para su desarrollo y para producir metabolitos secundarios conocidos como sustancias liquénicas o metabolitos liquénicos entre los cuales están: aminoácidos, azúcares, ácidos grasos, lactonas macrocíclicas, aromáticos monocíclicos, quinonas, cromonas, xantonas, terpenoides, esteroides y carotenoides (Rodríguez A et al., 2015). Dentro de las propiedades de estos compuestos se encuentran sus propiedades antibióticas, antibacterianas, antimicobacterianas, antivirales, antitumorales, antiprotozoarias, antimutagénicas, antiinflamatorias, antioxidantes, analgésicas y citotóxicas (Londoño-Bailon et al., 2019). El compuesto más estudiado dentro de estos metabolitos secundarios es el ácido úsnico, el cual se encuentra en cualquier tipo de liquen y se caracteriza porque sus isómeros ópticos muestran un amplio espectro de actividad fisiológica frente a neumococos, estreptococos y estafilococos; además, tienen actividad antibiótica frente a diferentes tipos de *Mycobacterium* (Gunasekaran et al., 2016).

Según Londoño-Bailon et al., 2019; Zizovic et al. (2012), el uso excesivo y frecuente de antibióticos en el tratamiento de infecciones bacterianas trae como efecto el incremento de resistencia a los tratamientos de microorganismos patógenos. Por lo tanto, es necesario buscar nuevas fuentes de compuestos con actividad antibacteriana. Los ensayos de actividad antimicrobiana en este trabajo se desarrollaron utilizando bacterias patógenas *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, dada su relación con enfermedades nosocomiales bacterianas y transmitidas por los alimentos.

Por otro lado, emergen diversas enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, lo que implica la necesidad de descubrir nuevos agentes antioxidantes (Gunasekaran et al., 2016). En particular, los líquenes tienen una cantidad significativa de antioxidantes para eliminar los radicales libres debido a su capacidad de generar metabolitos secundarios en condiciones extremas. Los cuales les permiten a los líquenes generar productos naturales funcionales únicos que otorgan ventajas sobre otras fuentes naturales. Al mismo tiempo, permiten incrementar la probabilidad de encontrar moléculas que pueden aislarse para el desarrollo de nuevos productos farmacéuticos (Londoño-Bailon et al., 2019). Por lo anterior, este estudio tiene como objetivo caracterizar el potencial antibacteriano y antioxidante de extractos de líquenes de la *Usnea* recolectados de las zonas rurales del Municipio de Cali.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo

Para el desarrollo de esta investigación se colectaron muestras del liquen en la zona rural Km 18 vía la mar del municipio de Santiago de Cali departamento del Valle del Cauca-Colombia. Todas las muestras se refrigeraron y se llevaron al laboratorio de Biotecnología de la Tecnoacademia Cali en el menor tiempo posible para su secado y conservación.

Caracterización Química y Microcristalización

La identificación química y microcristalización de las especies de líquenes, fue basada a partir de la metodología abordada por Hernández et al., 2017:

Identificación Química

Se tomó un trozo de muestra, y se le agregó una gota de los siguientes reactivos: Cloro comercial (C), hidróxido de potasio al 10% (K) y sus combinaciones y Lugol (L). Las muestras fueron observadas al estereoscopio para determinar el cambio de coloración de cada una.

Micro cristalización

Se tomaron unos trozos de talo líquénico y se adicionaron gotas de acetona y gota del agente catalizador Glicerina:Alcohol:Agua (1:1:1), Glicerina:Ácido acético (1:3), se flameó hasta la aparición de pequeñas burbujas y posteriormente se

observó en el microscopio.

Preparación de los extractos líquénicos

Las muestras de liquen se lavaron con agua destilada y se secaron a temperatura de 50°C durante 24 h en un horno de convección forzada marca JEIOTECH OF 300H (Korea). Posteriormente, se trituraron en un molino de cuchillas marca Polimix PX-MFC 9D (España) y se realizó un tamizado por 15 min para obtener tamaños de partícula por debajo de 40 µm. Para las extracciones se utilizó como solventes Etanol absoluto y DM. Se realizaron mezclas en proporción 1:1 (liquen: solvente) y se dejó en agitación durante 48 h en un agitador orbital marca IKA – KS260 a 200 rpm (Alemania). Ambas extracciones fueron concentradas a una presión reducida de 7 mbar en un rotaevaporador. Los extractos se almacenaron en recipientes ámbar y se dejaron secar hasta obtener polvo seco a una temperatura ambiente promedio de 30 °C durante 48 h. Finalmente, los recipientes con los extractos secos se almacenaron en una nevera a 4°C

Evaluación de la actividad antimicrobiana

Para realizar esta prueba, se seleccionaron microorganismos teniendo en cuenta su facilidad de crecimiento y requerimiento nutricional en medios de cultivo convencionales, caldo y agar Mueller Hinton, su empleo en ensayos de susceptibilidad a antibióticos y su importancia médica. Los microorganismos seleccionados fueron: *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, ambas cepas ATCC.

Se prepararon suspensiones de 10 ml de cada uno de los microorganismos en tuyos de ensayo utilizando caldo Mueller Hinton y se incubaron durante 24 h en una incubadora marca Zenithlab DNP 9052 A (China). Simultáneamente, se prepararon cajas Petri con agar Mueller Hinton y se inocularon con 10 µL de las suspensiones de microorganismos preparadas. Para la actividad antimicrobiana por la técnica de difusión se utilizaron discos de papel filtro (Whatmann No. 1) de 6 mm de diámetro. A continuación, se impregnaron con 10 µL de los extractos obtenidos (Etanol y diclorometano), los cuales se prepararon previamente a una concentración de 30 mg/L en los solventes respectivos. Los discos impregnados se adicionaron sobre la superficie de cada medio

inoculado con el patógeno específico. Las cajas Petri fueron incubadas a 35 °C por 24 h. Para el control negativo, se consideró el Etanol y el Dicolorometano. Finalmente, se realizó un registro fotográfico para determinar los diámetros de la zona de inhibición, los cuales se estimaron utilizando el software de procesamiento de imágenes (ImageJ).

Determinación de fenoles totales

La cantidad de fenoles totales se determinó de acuerdo a la metodología propuesta por (Londoño-Bailon et al., 2019). Se prepararon 100 mL de solución patrón de ácido gálico de 200 mg/L. Para obtener la curva de calibración, a partir de la solución patrón se prepararon seis diluciones de 0, 2, 4, 6, 8 y 10 mg/L. A cada dilución se agregó 1 ml de Carbonato de Sodio (Na₂CO₃) 1N y 250 µL del reactivo de Foling - Cioaltea. Se prepararon concentraciones de 100 y 50 mg/ml (mg de extracto seco por mililitro de solvente) en Etanol y Diclorometano, respectivamente. A continuación, se tomaron 10 µL de cada uno de los extractos y se adicionó 1mL de Na₂CO₃ 1N y 250 µL del reactivo de Foling - Cioaltea. Tanto los patrones y las muestras se aforaron a 10ml con agua destilada se cubrieron con papel aluminio y se dejaron en la oscuridad por 1 hora. La lectura de las absorbancias se realizó a una longitud de onda de 760 nm. El contenido de fenoles totales se expresó en miligramos de ácido gálico por gramo de extracto seco (mg AG/g ES)

Actividad Antioxidante

La actividad de eliminación de radicales libres de cada uno de los extractos de liquen se determinó utilizando 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) 0,1mM en metanol según lo propuesto por (Bohorquez Fajardo, 2016). Inicialmente, se preparó una curva estándar, utilizando como patrón Ácido Ascórbico (AA) con concentraciones de 0, 1,0 2,0 3,0 4,0 y 5,0 mg/L, a cada solución se le agrego 1 ml de solución de DPPH y se aforaron con metanol a 10 mL. Posteriormente, se tomaron 50 µL de los extractos liquénicos de Etanol y Diclorometano de concentraciones de 100 y 50 mg/ml respectivamente. A cada extracto se le adiciono 1 ml de la solución de DPPH y se aforo con metanol A 10 mL. Las muestras de las soluciones patrón y de extractos liquénicos se dejaron reaccionar por 1h en la oscuridad. La lectura de las absorbancias se realizó a una longitud de onda de 517 nm. La curva de calibración obtenida se trazó como los cambios de

las absorbancias en función de las concentraciones individuales de AA. Los resultados se expresaron como µmol de ácido ascórbico por g de extracto seco (µmol n estar AA/g ES).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización Química, Microcristalización y Actividad Antimicrobiana

Muchas de las sustancias liquénicas pueden ser detectadas macroscópicamente gracias a los colores que adquieren al ser puestas en contacto con diversos reactivos químicos, si bien estos caracteres no son suficientes para la separación entre las especies son de gran valor en la identificación cualitativa de las mismas (Barreno & Perez, 2003). Los mencionados autores, reportan que los test de coloración con reactivos se han utilizado en la liquenología desde el siglo pasado y se pueden realizar con la adición directa de una gota de los mismos en el talo, el apotecio, los sororios, entre otros. Aunque en algunos casos por la ubicación de la concentración de la sustancia en el cuerpo del liquen, se hace necesario la observación al microscopio de liquen.

Tabla 1. Caracterización química del Liquen. Fuente propia.

Especie liquénica	K	C	KC	L
<i>Usnea sp.</i>				

De acuerdo a lo anterior, por medio de la identificación química realizada utilizando los reactivos de: K (solución al 10% de hidróxido de sodio en agua), C (Hipoclorito de Sodio Comercial), sus combinaciones y L(Lugol). En la Figura 1 se evidencia el cambio de coloración de la muestra de liquen utilizando la combinación de K y C, pasando de cloración verde a una tonalidad amarilla (Tabla 1), evidenciando la presencia metabolitos secundarios, particularmente los resultados cualitativos muestran que esta especie de liquen produce ácido úsnico. Los resultados coinciden con la información reportada por (Barreno & Perez, 2003), quienes afirman que en el grupo de los Dibenzofuranos y ácidos únicos hay una reacción positiva ante los reactivos K y C, cuyas tonalidades de cambio de color va del amarillo al naranja. En la tabla 2 .se muestran algunas de las sustancias liquénicas más frecuentes y las reacciones que producen con los químicos más frecuentes para sustancias liquénicas.



Figura 1. Resultados de la caracterización química del Liquen

Tabla 2. Sustancias líquénicas frecuentes y reacciones que produce con reactivos comunes y bajo luz UV

Química	PD	K	C	KC	UV
Ácidos Grasos					
Ácido caperático	—	—	—	—	—
Ácido protoliquesterínico	—	—	—	—	—
Dépsidos del Orcinol					
Ácido ervénico	—	—	—	—	B
Ácido Giroforico	—	—	RS	R	±B
Ácido lecanorico	—	—	R	R	—
Ácido meroclorofeico	—	—	RS-V	RS-V	±B
Ácido olivetórico	—	—	R	R	B
Ácido perlatolico	—	—	—	—	B
Esfaerofirina	—	—	—	—	B
Depsidonas del Orcinol					
Ácido alectoronico	—	—	—	R	B
Ácido lobarico	—	—	—	R/V	B
Ácido fisodico	—	—	—	RS	±B
Dépsidos del □-orcinol					
Atranorina	A Pálido	A Pálido	—	—	-/±B débil
Ácido baeomicésico	A Intenso	A Pálido	—	-/A	A
Complejo Acido Barbatco	—	—	-/N	RS-N	±B
Ácido escuamático	—	—	—	—	B
Ácido tamnolico	N	A Intenso	—	—	—
Depsidonas del □-orcinol					
Argopsinas	N-R	—	—	—	—
Ácido fumarprotocetrarico	R	±M	—	—	—
Acico norestictico	A-N	R Oscuro	—	N/A	—
Pannarina	N-R	—	—	—	—

Ácido fisodalic	R-N	/±M	—	—	—
Ácido protocetrarico	R-N	—	—	RS	—
Ácido psoromico	A Brillante	—	—	—	B
Ácido salicinico	N	R Oscuro	—	N/A	—
Complejo ácido estictico	N	A	—	—	—
Complejo ácido estictico	N	A	—	—	—
Dibenzofuranos y ácidos usnicos					
Ácido pnnarico	—	—	Ol- VE	Ol Oscuro- VE	—
Ácido Usnico	—	—	—	A-N	AT
Xantonas	—	—	—	—	—
Artotelina	—	—	N	N	—
Liquenxantona	—	—	—	—	A
Antraquinonas					
Parietina	—	RV	—	—	—
Triterpenoides	—	—	—	—	—
Zeorina	—	—	—	—	—
Ácido pulvinico y derivados					
Calicina	—	RS	—	—	N oscuro mate
Ácido rizcarpico	—	—	—	—	N
Ácido vulpinico	—	—	—	—	—
A: Amarillo, AZ: Azul, B: Blanco, ±B: Blanquecino, N: Naranja, Ol: Olivaceo, AT: Atenuación, ±M: Parduzco, R: Rojo, RS: Rosa, V: Violaceo, VE: Verde					

Fuente: (Barreno & Perez, 2003)



Figura 2. Micro cristalización ácido úsnico. Tomada al microscopio Leica DM500 objetivo 40X. Fuente propia

La identificación por micro cristalización, consiste en la extracción mediante algún solvente, generalmente acetona, la posterior formación de cristales al eliminar el solvente por evaporación y finalmente se analiza la forma de los cristales. En la figura 3 se muestra los resultados del ensayo de microcristalización.

En la Figura 3 fue posible distinguir distintos cristales que se lograron identificar por su tamaño y forma. El ácido úsnico (Figura 2) se caracteriza por tener forma aguja rectangular y alargada, estos resultados coinciden con los estudios reportados por Hernández, et al., (2017) quienes con el tratamiento de sus especímenes colectados identificaron microcristales de atronorina y ácido úsnico. Finalmente, al realizar las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana con los extractos obtenidos de líquenes se pudo determinar mediante el método de difusión en agar, que la mayoría de extractos presentaron actividad inhibitoria, debido a la presencia de halos de inhibición en las diferentes concentraciones empleadas frente a las dos cepas de bacterias trabajadas (Tabla 3).

Tabla 3.
Resultados actividad antimicrobiana

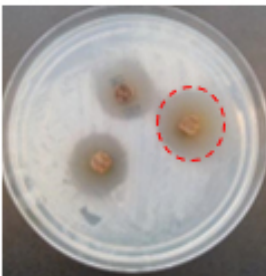
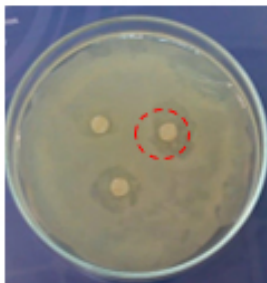
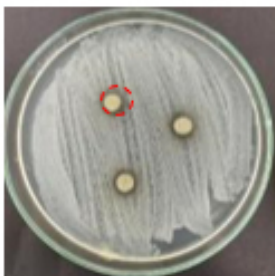
Solvente	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Etanol		
	Halo de inhibición promedio: 18,29±0,069 mm	Halo de inhibición promedio: 14,88±0,167 mm
Diclorometano		
	Halo de inhibición promedio: 10,55±0,632 mm	Halo de inhibición promedio: 9,02±0,083 mm

Figura 3. Pruebas de disco-difusión de los extractos orgánicos con etanol. A. Sensibilidad *P. aeruginosa*. B, C. Sensibilidad *S. aureus*.

Concentración de Fenoles totales

En la tabla 3 se muestran los resultados del contenido de fenoles totales, la curva de calibración obtenida y el coeficiente de correlación. Se observa que el contenido de fenoles totales en los extractos líquénicos utilizando como solvente Diclorometano es mayor ($190,45 \pm 3,48$ mg AG/g ES) con respecto a Etanol ($66,19 \pm 1,09$). (Gunasekaran et al., 2016) determinaron el contenido de fenoles totales de extractos de líquenes del genero *Usnea* sp., se reporta valores entre $43,12 \pm 1,14$ a $48,74$ mg AG/g ES utilizando como solvente metanol y de $63,05 \pm 3,27$ a $101,37$ mg AG/g ES utilizando como solvente Acetona. Aunque los valores no son similares, se evidencia que el contenido de fenoles totales se incrementa al disminuir el grado de polaridad del solvente. Adicionalmente, según (Aoussar et al., 2018) se reporta un contenido de fenoles totales alrededor de 328 ± 27 µg GAE / mg de extracto seco extracto, utilizando como solvente acetona, para la especie *Evernia prunastri*, *Ramalina farinacea* y *Pseudevernia*

furfurácea. Los mencionados autores afirman que el alto contenido de fenoles totales en los extractos líquénicos se debe a la presencia de depsidos, depsidonas y dibenzofuranos, compuestos que a su vez presentan capacidad de eliminar radicales libres. Dado que la concentración de fenoles totales para líquenes es mayor comparada con otros trabajos, como por ejemplo, los obtenidos por (Londoño-Bailon et al., 2019) que obtuvo concentraciones alrededor de 20 mg AG/g ES, (Carlos Fernández-Moriano et al., 2016) con concentraciones entre 20 y 100 µg AG/mg ES. Las diferencias en concentración según (Aoussar et al., 2018) se debe al tipo de especie de liquen y las condiciones ambientales, pero se resalta principalmente que las cantidades de luz disponible influyen en un incremento en la concentración de fenoles principalmente de Ácido Úsnico y Atraborina, dichos compuestos son fotoestables y su función principal en los líquenes es absorber los rayos UV y proteger la capa sensible de los fotobiontes en los líquenes.

Tabla 3. Resultado concentración de fenoles totales en Etanol y Diclorometano. Fuente propia

Extracto	Fenoles Totales mg AG/g ES	Curva de Calibración
 Etanol	66,19±1,09	$Y=0,0651X-0,0599$ $R^2=0,9959$
 Diclorometano	190,45±3,48	

Actividad Antioxidante

Los cambios de absorbancia obtenidos en función de las concentraciones individuales de ácido ascórbico se muestran en la Figura 4. La capacidad antioxidante total de inhibición de radicales de DPPH obtenida de los extractos Etanolicos y de DM fueron $19,90 \pm 1,99$ y $48,17 \pm 2,89$ $\mu\text{mol AA/g ES}$ respectivamente. Se muestra una relación entre el contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante, mayor contenido de fenoles evidencia una mayor capacidad antioxidante. Una relación similar para líquenes fue reportada por (Londoño-Bailon et al., 2019) quienes obtuvieron valores entre $89.05 \mu\text{mol/g}$ y $79.84 \mu\text{mol/g}$ utilizando como patrón Trolox y ABTS como fuente de radicales libres. Según (C. Fernández-Moriano et al., 2016) las especies líquénicas son una fuente potencial de antioxidantes naturales, atribuido a la presencia de polifenoles, cuya concentración está relacionada con una mayor actividad antioxidante. Sin embargo, es necesario realizar aislamiento de los metabolitos secundarios con el objetivo identificar a nivel molecular los compuestos activos y su correlación con la actividad antioxidante.

Conclusiones

En este trabajo se evidencia que los extractos líquénicos utilizando como solventes Etanol y DM, presentan actividad antimicrobiana, así como la presencia de fenoles y compuestos antioxidantes. La capacidad de inhibición de los extractos puede atribuirse a la presencia de ácido úsnico evidenciado en los resultados de caracterización química. En cuanto al contenido de fenoles totales se evidencia

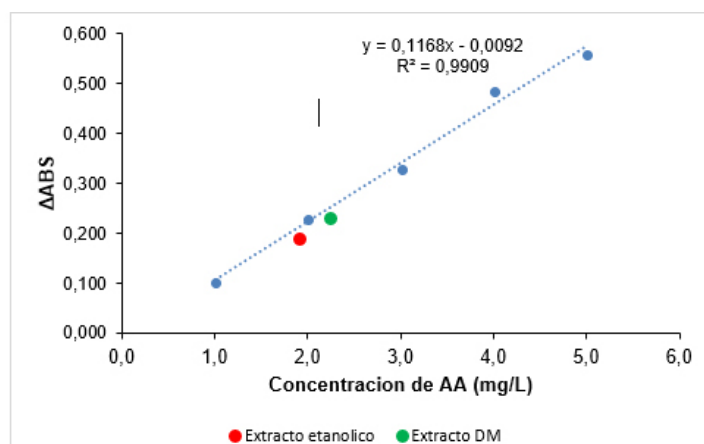


Figura 4. Curva de calibración cambio de absorbancia en función de la concentración de AA en mg/L. Fuente propia

que la polaridad del solvente influye en el proceso de extracción dado que la concentración de fenoles es mayor para DM en comparación con etanol. La misma correlación se observa con la actividad antioxidante. Finalmente, los resultados muestran que los líquenes caracterizados en este trabajo son especies potenciales para el desarrollo de agentes antimicrobianos y antioxidantes.

Bibliografía

- Aoussar, N., Rhallabi, N., Ait Mhand, R., Manzali, R., Bouksaim, M., Douira, A., & Mellouki, F. (2018). Seasonal variation of antioxidant activity and phenolic content of *Pseudevernia furfuracea*, *Evernia prunastri* and *Ramalina farinacea* from Morocco. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 0–5. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2018.03.004>
- Barreno, E., & Perez, S. (2003). *Biología de los líquenes*. In

Consejería del Medio Ambiente, Ordenación del Territorio e Infraestructuras del Principado de Asturias y KRK ediciones. <https://doi.org/10.7723/antiochreview.71.4.0695>

Bohorquez Fajardo, R. (2016). Determinación de actividad antioxidante de extractos de hojas de *Diplostephium phyllicoides* (Kunth) Wedd [Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A.]. <https://doi.org/https://doi.org/10.3929/ethz-b-000238666>

Fernández-Moriano, C., González-Burgos, E., Divakar, P. K., Crespo, A., & Gómez-Serranillos, M. P. (2016). Evaluation of the antioxidant capacities and cytotoxic effects of ten parmeliaceae lichen species. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/3169751>

Fernández-Moriano, Carlos, Gómez-Serranillos, M. P., & Crespo, A. (2016). Antioxidant potential of lichen species and their secondary metabolites. A systematic review. *Pharmaceutical Biology*, 54(1), 1–17. <https://doi.org/10.3109/13880209.2014.1003354>

Gunasekaran, S., Pillai Rajan, V., Ramanathan, S., Murugaiyah, V., Samsudin, M. W., & Din, L. (2016). Antibacterial and Antioxidant Activity of Lichens *Usnea*

rubrotincta, *Ramalina dumeticola*, *Cladonia verticillata* and Their Chemical Constituents. *Malaysian Journal of Analytical Science*, 20(1), 1–13. <https://doi.org/10.17576/mjas-2016-2001-01>

Londoño-Bailon, P., Sánchez-Robinet, C., & Alvarez-Guzman, G. (2019). In vitro antibacterial, antioxidant and cytotoxic activity of methanol-acetone extracts from Antarctic lichens (*Usnea antarctica* and *Usnea aurantiaco-atra*). *Polar Science*, August, 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.polar.2019.08.003>

Rodríguez A, O. E., Andrade B, W. A., Díaz L, F. E., & Moncada, B. (2015). Actividad antimicrobiana de líquenes de la cuenca alta del río Bogotá. *Nova*, 47–64. <https://doi.org/10.22490/24629448.1706>

Vaillant, D. (2014). Los líquenes, una alternativa para el control de fitopatógenos. *Fitosanidad*, 18(1), 51–57.

Zizovic, I., Ivanovic, J., Misic, D., Stamenic, M., Djordjevic, S., Kukic-Markovic, J., & Petrovic, S. D. (2012). SFE as a superior technique for isolation of extracts with strong antibacterial activities from lichen *Usnea barbata* L. *Journal of Supercritical Fluids*, 72, 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2012.07.018>