

UNIVERSITATEA "OVIDIUS" DIN CONSTANȚA

ȘCOALA DOCTORALĂ DE MEDICINĂ

DOMENIUL DE DOCTORAT: **MEDICINĂ DENTARĂ**

**Contribuții privind studiul activităților
antitumorale și antibacteriene
ale extractelor de *Usnea barbata* (L.)F.H.Wigg.
în patologia oro-dentară**

Rezumatul tezei de doctorat

Conducător de doctorat

Prof.univ.dr. Victoria Badea

Student doctorand

Farm. primar Violeta Popovici

CONSTANȚA,

2019

*“Există în lume un mijloc de exprimare accesibil tuturor:
e limbajul entuziasmului, al lucrurilor făcute cu dragoste și perseverență
în căutarea a ceva ce-ți dorești sau în care crezi...”
(Paulo Coelho)*

La realizarea acestei teze de doctorat am beneficiat de îndrumarea și de colaborarea unor oameni cu remarcabile calități profesionale și morale, cărora doresc să le mulțumesc, din toată inima.

Sunt recunoscătoare pentru privilegiul de a o avea conducător de doctorat pe Doamna Prof. univ. dr. Victoria Badea, un profesionist de elită și în același timp, un om deosebit; îi mulțumesc din tot sufletul pentru entuziasmul, deschiderea și dăruirea cu care mi-a îndrumat pașii în studiile efectuate pe parcursul acestor ani și pentru căldura, sinceritatea și fermitatea cu care m-a sprijinit de fiecare dată, în momentele de cumpănă.

Doresc să mulțumesc referenților pentru răbdarea cu care au analizat studiile cuprinse în toate rapoartele de cercetare, care au precedat această teză de doctorat.

Alese gânduri de recunoștință se îndreaptă acum către Doamna Decan al Facultății de Farmacie din Constanța, Conf. univ. dr. Laura-Adriana Bucur, care încă din primul an de studii doctorale mi-a călăuzit fiecare pas al cercetării farmacognostice și mi-a fost alături „cu timp și fără timp”, pe tot parcursul lucrării până la finalizarea ei.

Un gând cald de mulțumire adresez Domnișoarei Conf. univ. dr. Antoanela Popescu precum și Doamnei Șef lucrări dr. Verginica Schroder, pentru studiile efectuate împreună.

În ultimul an de studii doctorale am beneficiat de două colaborări de prestigiu: studiile pe culturile de celule tumorale au fost efectuate la Institutul de Cercetări Biologice din Iași, iar analiza UHPLC a extractului lichenic uscat s-a realizat la Centrul de Cercetare pentru Analiza Instrumentală “SCIENT” din București.

Calde mulțumiri adresez așadar, Doamnei Director Gabriela Vochița și întregii echipe de la Institutul de Cercetări Biologice Iași, pentru eforturile depuse în vederea achiziționării liniei de celule tumorale CAL 27 (ATCC® CRL-2095™), pentru desfășurarea în cele mai bune condiții a studiilor pe culturile de celule tumorale și pentru comunicarea promptă și eficientă din tot acest timp.

Mulțumesc de asemenea, colectivului Centrului de Cercetare pentru Analiză Instrumentală “SCIENT” din București, pentru disponibilitatea și profesionalismul cu care au colaborat la efectuarea analizei UHPLC a extractului utilizat la studiul acțiunii antitumorale.

Mulțumesc Domnului Profesor Eugen Popa din Vatra Dornei care m-a orientat către alegerea acestei specii de licheni, precum și Doamnei Conf. univ.dr. Mariana Arcuș de la Catedra de Botanică Farmaceutică a Facultății de Farmacie din Constanța pentru confirmarea identității speciei studiate.

Mulțumesc tuturor cadrelor didactice care au contribuit la formarea mea profesională.

Doresc să aduc mulțumiri familiei mele, colegilor și tuturor celor apropiați care s-au implicat în desfășurarea cercetării doctorale și m-au susținut în perioada anilor de studiu.

În încheiere – dar nu și în ultimul rând, mulțumirea și recunoștința mea se îndreaptă către Î.P.S. Prof.univ. dr. Teodosie Petrescu, pentru încrederea și aprecierea pe care mi le-a arătat întotdeauna și pentru sprijinul necondiționat, moral și material, în efortul de a duce la bun sfârșit teza de doctorat.

CUPRINS

INTRODUCERE	5
PARTEA GENERALĂ.....	6
PARTEA PERSONALĂ.....	7
STUDIUL I. ANALIZA FARMACOGNOSTICĂ A SPECIEI <i>USNEA BARBATA</i> (L.) F.H.WIGG.....	8
I.1. Recoltarea materialului vegetal	8
I.2. Obținerea produsului vegetal	8
I.3. Determinarea identității produsului vegetal.....	9
I.3.1. Examenul macroscopic.....	9
I.3.2. Examenul microscopic.....	9
I.4. Determinarea purității produsului vegetal	10
I.5. Determinarea pierderii prin uscare pentru <i>Usnea barbata</i> (L.)F.H.Wigg	10
I.6. Obținerea extractelor din <i>Usneae lichen</i>	10
I.7. Identificarea metaboliților activi	11
I.8. Determinarea conținutului de polifenoli și de acid usnic din extractele de <i>Usnea barbata</i> (L.)F.H. Wigg și evaluarea acțiunii lor antioxidante.....	11
I.8.1. Determinarea conținutului de polifenoli totali	11
I.8.2. Analiza polifenolilor din extractele de <i>Usneae lichen</i> prin cromatografia de lichide de înaltă performanță	12
I.8.3. Determinarea conținutului de acid usnic	12
I.8.4. Evaluarea capacității antioxidante a extractelor de <i>Usneae lichen</i> prin metoda DPPH	13
I.9. Obținerea extractului acetonc uscat din <i>Usneae lichen</i> și analiza acestuia printr-o metodă cromatografică de lichide de ultra-înaltă performanță.....	13
I.9.1. Obținerea extractului acetonc uscat din <i>Usneae lichen</i>	13
I.9.2. Cromatografia de lichide de ultra-înaltă performanță (UHPLC).....	14

STUDIUL II. CERCETĂRI PRIVIND PROPRIETĂȚILE CITOTOXICE ALE EXTRACTULUI USCAT DE USNEA BARBATA (L.) F.H.WIGG. PE ARTEMIA SALINA L.	14
II.1. Material și metodă	15
II.2. Rezultate și discuții.....	15
STUDIUL III. EVALUAREA ACȚIUNII ANTITUMORALE A EXTRACTULUI ACETONIC USCAT DIN USNEAE LICHEN PE CARCINOMUL LINGUAL CU CELULE SCUAMOASE, CAL 27 (ATCC® CRL-2095™).....	15
III.1. Pregătirea materialului de lucru	16
III.2. Determinarea modificărilor morfologice	16
III.3. Dozarea proteinelor totale	16
III.4. Determinarea viabilității celulare prin metoda MTT	17
III.5. Evaluarea apoptozei celulare prin tehnica citometriei în flux	17
III.6. Evaluarea acțiunii extractului acetonc de uscat de <i>Usneae lichen</i> asupra activității enzimelor antioxidante din celulele tumorale CAL 27.....	17
III.6.1. Determinarea activității superoxid-dismutazei.....	18
III.6.2. Determinarea spectrofotometrică a activității catalazei.....	18
III.6.3. Determinarea activității peroxidazei.....	18
STUDIUL IV. STUDII PRIVIND EFECTELE ANTIBACTERIENE ALE EXTRACTELOR DIN USNEA BARBATA (L.) F.H. WIGG PE SPECII BACTERIENE IZOLATE DIN OROFARINGE	18
CONCLUZII FINALE.....	19
REFERINȚE BIBLIOGRAFICE	21

INTRODUCERE

În ultimii ani s-a observat o tendință de completare a acțiunii medicamentelor de sinteză, cu remedii naturale, dat fiind faptul că medicamentele de sinteză au, pe lângă beneficiile terapeutice, multiple efecte secundare și adverse [29, 45, 48, 59].

O problemă de interes medical mondial o constituie apariția rezistenței bacteriilor patogene la antibioticele uzuale; acest fenomen a impus realizarea de cercetări ample pentru descoperirea unor noi structuri cu efect antibacterian [48-72]. În acest scop, echipe complexe de cercetători studiază mecanismele de apariție a rezistenței la antibiotice, urmărind, în același timp, noi modalități de obținere a unor remedii naturale alternative, cu acțiune antibacteriană [52, 85, 86, 116].

Un alt aspect remarcabil este faptul că, multe specii vegetale au proprietăți antioxidante, mai ales datorită conținutului de polifenoli; aceștia au rol important, atât în creșterea și dezvoltarea normală a plantelor, cât și în optimizarea abilităților de apărare împotriva stresului oxidativ [30, 180, 181]. Stresul oxidativ este implicat în generarea și evoluția unui număr de peste 200 de afecțiuni severe printre care: afecțiunile cardiovasculare, boala Parkinson, boala Alzheimer, boala parodontală și diferitele forme de cancer, printre care și cancerul orofaringian [172, 184].

Boala parodontală sau *parodontita* este o boală multifactorială în care, asocierea dintre acțiunea bacteriilor ce formează placa dentară și factorii genetici are o deosebită importanță în apariția și evoluția ei ulterioară.

Cancerul reprezintă o clasă eterogenă de afecțiuni, caracterizate prin diviziunea necontrolată a celulelor și abilitatea acestora de a invada, din aproape în aproape, țesuturile din vecinătate și de a metastaza, pe cale limfatică sau hematogenă, loco-regional sau la distanță, în alte țesuturi și organe; are o incidență globală estimată la 6 milioane de cazuri pe an, fiind a doua cauză majoră de deces, după bolile cardiovasculare [7].

Tumorile maligne oro-maxilo-faciale se caracterizează în general prin: creștere tumorală de tip infiltrativ-distructiv cu invazie locală și diseminare metastatică loco-regională și la distanță (cu formarea metastazelor cervicale, sau în organele mai îndepărtate) [27, 28].

Este cunoscut faptul că majoritatea chimioterapicelor de sinteză utilizate în prezent în terapia antitumorală dezvoltă în timp rezistență și prezintă toxicitate neselectivă împotriva

celulelor normale; aceste efectele secundare, cumulate cu reacțiile adverse și cu multiplele interacțiuni medicamentoase, constituie dezavantajele majore ale chimioterapicelor [107-114, 169].

Așadar, obținerea de noi medicamente antibacteriene și antitumorale rămâne o provocare clinică majoră. În acest context, plantele reprezintă o sursă valoroasă de compuși naturali biologic activi, iar cercetările se îndreaptă către utilizarea lor în terapia antiinfecțioasă și anticanceră [260, 261]; constituenții izolați pot fi utili ca agenți terapeutici alternativi sau, ca nuclee de bază pentru noi produse de sinteză, cu activitate sporită și / sau toxicitate redusă [10, 30, 169-172,].

În categoria plantelor care prezintă remarcabile proprietăți antitumorale, antibacteriene și antioxidante se regăsesc și lichenii [5, 33-38, 45, 59, 111, 159, 160].

Aceștia constituie un grup unic în lumea plantelor și, în același timp, sunt cele mai răspândite organisme simbiote din natură, habitând mai mult de 8% din suprafața terestră a pământului [1, 11, 13, 20, 26].

Un reprezentant important al lichenilor este genul *Usnea* Dill. ex. Adans., cu peste 350 specii răspândite pe întreaga suprafață a globului; în literatura de specialitate se arată clar, faptul că numeroase specii aparținând acestui gen, sunt utilizate în medicina tradițională de mii de ani, în tratarea diferitelor afecțiuni [1, 26, 53].

Reprezentanți ai genului *Usnea* Dill. ex Adans se regăsesc și în România [25, 228]; astfel, plecând de la toate considerentele menționate anterior, s-a conturat ideea realizării acestei teze de doctorat, în care s-a urmărit evidențierea acțiunilor antitumorale, și antibacteriene ale extractelor de *Usnea barbata* (L.) F.H. Wigg., recoltată din munții Călimani (900 m), județul Suceava, care ar putea avea aplicabilitate în terapia afecțiunilor oro-dentare.

Prezenta teză de doctorat are ca scop studiul potențialului terapeutic al speciei *Usnea barbata* (L.) F.H.Wigg., aducând o contribuție personală la datele actuale existente în literatura de specialitate.

PARTEA GENERALĂ

În primul capitol al tezei este descrisă specia de licheni luată în studiu, *Usnea barbata* (L.) F.H.Wigg, menționând încadrarea ei sistematică. S-a realizat o prezentare generală lichenilor, prezentând pe scurt particularitățile morfo-fiziologice ale acestora, ca rezultat al simbiozei între o

ciupercă și o algă/cianobacterie; a fost analizat apoi genul *Usnea*, descriind pe larg metaboliții primari și secundari și acțiunile biologice ale acestora. Către finalul primei părți s-au concentrat toate aceste noțiuni prezentate anterior către caracterizarea speciei *Usnea barbata* (L.)F.H.Wigg., cu prezentarea proprietăților anatomo-morfologice și chimice menționând și aplicațiile fitoterapice actuale ale acesteia.

În capitolul al doilea a fost prezentat stresul oxidativ, ca rezultat al super-producției de radicali liberi ai oxigenului (SRO), s-a evidențiat rolul acestora în generarea unei vaste patologii sistemice.

În capitolul al treilea au fost prezentate cele mai frecvent întâlnite afecțiuni oro-maxilo-faciale: caria dentară, boala parodontală și tumorile maligne oro-maxilo-faciale, subliniind etiologia și tratamentul lor.

PARTEA PERSONALĂ

Partea a doua a tezei este structurată în 4 studii, în care s-au realizat pe rând:

- analiza farmacognostică a speciei *Usnea barbata*(L.) F.H.Wigg.;
- determinarea proprietăților citotoxice ale extractului uscat de *Usnea barbata* (L.)F.H.Wigg. pe *Artemia salina* L.;
- evaluarea acțiunii antitumorale a extractului acetonc uscat din *Usnea* lichen pe carcinomul lingual cu celule scuamoase CAL 27;
- determinarea efectelor antibacteriene ale extractelor din *Usnea barbata* (L.) F.H. Wigg pe specii bacteriene izolate din orofaringe.

Studiul I. Analiza farmacognostică a speciei *Usnea barbata*(L.) F.H.Wigg.

Ipoteza de lucru: extractele obținute din *Usnea barbata* (L.)F.H.Wigg conțin metaboliți secundari care ar putea fi utilizați în fitoterapie; această specie ar putea prezenta un conținut ridicat de compuși fenolici cu proprietăți antioxidante.

Scopul studiului: obținerea unor extracte din talul uscat al speciei *Usnea barbata* (L)F.H. Wigg. în diferiți solvenți, care permit identificarea și determinarea cantitativă a constituenților chimici; evaluarea activității antioxidante a extractelor și evidențierea corelației între conținutul polifenolic și potențialul antioxidant al acestora.

I.1. Recoltarea materialului vegetal

Recoltarea materialului vegetal s-a realizat în luna martie a anului 2016.

Zona de habitat a speciei *Usnea barbata* (L.)F.H.Wigg., este o pădure deasă de conifere (brazi, molizi și pini) situată în zona montană înaltă (munții Călimani), la o altitudine de aproximativ 900 m; clima specifică acestor locuri este umedă și rece.

Talurile pendante ale lichenilor sunt agățate pe ramurile și pe trunchiul arborilor-gazdă; cei mai numeroși și mai bine dezvoltați reprezentanți ai speciei se regăsesc către vârful acestora, la înălțimi de peste 2 m. Talurile de *Usnea barbata* (L.)F.H.Wigg. au fost culese manual, direct de pe ramurile coniferelor.

I.2. Obținerea produsului vegetal

Materialul vegetal proaspăt recoltat a fost curățat de impurități și a fost uscat la temperatura constantă, sub 25°C, într-o încăpere aerisită, la adăpost de razele soarelui. *Usneae lichen* este reprezentat de talul uscat al speciei *Usnea barbata* (L.)F.H.Wigg.

După uscare, produsul vegetal obținut a fost păstrat o perioadă lungă de timp în aceleași condiții, în vederea utilizării lui la studiile care au urmat.

I.3. Determinarea identității produsului vegetal

I.3.1. Examenul macroscopic

Material și metodă

Materialul luat în lucru a fost reprezentat de talul uscat al lichenului *Usnea barbata* (L.) F.H.Wigg. S-au observat cu ochiul liber, într-o primă etapă, caracterele macroscopice ale lichenului și s-a efectuat identificarea lui după dimensiuni, culoare, miros și gust. În etapa următoare *Usneae lichen* a fost măcinat și s-au observat particularitățile elementelor componente.

Rezultate și discuții

Prin examenul macroscopic a fost identificat talul speciei *Usnea barbata* (L.) F.H.Wigg și au fost observate proprietățile sale generale: talul lichenului este verde-cenușiu deschis, moale, filiform, pendent, lung de 15-20 cm; prezintă ramificații dichotomice, cu ramuri numeroase, care se întrepătrund, fixate de un peduncul opac de culoare verde cenușiu mai închis. Mirosul plantei uscate este aromat, specific, iar gustul este amar.

După evaluarea tuturor acestor aspecte morfologice, s-a stabilit că produsul vegetal recoltat aparține speciei *Usnea barbata* (L.) F.H. Wigg., realitate confirmată și de Catedra de Botanică Farmaceutică a Facultății de Farmacie din Constanța.

În urma măcinării, au rezultat 2 componente distincte care confirmă structura unui tal fruticos, așa cum este menționat în literatura de specialitate: un cordon central, alb-gălbui, rămas intact după măcinare și o parte sub formă de pulbere de culoare verde-cenușie. Cordonul central are aspectul unui fir alb-gălbui, subțire, care atunci când este umed, se întinde ca o bandă de cauciuc.

I.3.2. Examenul microscopic

Material și metodă

Părțile obținute prin măcinarea *Usneae lichen* (cordonul central mărunțit prin tăiere cu foarfeca și pulberea) au fost prelucrate prin clarificare și apoi au fost analizate la microscop.

Rezultate și discuții

Prin examinarea microscopică, s-au identificat componentele simbiote, ale lichenului, alga

și ciuperca:

- partea interioară a lichenului - cordonul central, omogen, constituit din hife miceliene compacte,
- partea exterioară constituită din alga cianofită; clorofila existentă în algă conferă lichenului culoarea specifică, verde-cenușie.

În primul preparat microscopic, realizat din axul central, s-a observat clar componența omogenă, reprezentată de hifele miceliene compacte; în al doilea preparat microscopic, realizat din pulbere, s-au observat fragmente de algă și rare hife miceliene.

I.4. Determinarea purității produsului vegetal

Determinarea purității unui produs vegetal cuprinde următoarele etape: determinarea impurităților din aceeași plantă și determinarea corpurilor străine de planta producătoare [233].

Rezultate și discuții

Conform cu prevederile FR X, produsul nu a prezentat impurități de niciun fel, astfel încât, poate fi considerat 100 % pur [234]. Acest rezultat este foarte important pentru evaluarea calității lichenului *Usnea barbata* (L.)F.H.Wigg. recoltat, deoarece relevanța determinărilor ulterioare depinde foarte mult de puritatea produsului vegetal analizat.

I.5. Determinarea pierderii prin uscare pentru *Usnea barbata* (L.)F.H.Wigg

Material și metodă

Materialul vegetal a fost reprezentat de talul mărunțit al lichenului *Usnea barbata* (L.)F.H.Wigg., iar metoda utilizată este prevăzută în Farmacopeea Română Ediția a X-a (FR X) și în European Pharmacopoeia 9.0. (EP 9). [234, 235].

Rezultate și discuții

Pierdere prin uscare (PPU) calculată conform Farmacopeei Române Ediția a X-a este un parametru foarte util în determinările cantitative care au fost efectuate, deoarece raportările de fac la cantitatea de lichen uscat.

I.6. Obținerea extractelor din *Usneae lichen*

În vederea obținerii extractelor de *Usnea barbata* (L.) F.H.Wigg. recoltată din munții Călimani, județul Suceava, s-a utilizat ca materie primă produsul vegetal uscat.

În acest prim studiu s-au realizat 3 tipuri de extracte, utilizând ca solvenți: apa distilată, alcoolul etilic absolut și acetona. Extractul acetonc și cel etanolic s-au obținut prin macerare la rece, iar extractul apos s-a obținut prin metoda refluxării la cald.

Rezultate și discuții

Cele 3 extracte obținute au culori și aspecte diferite: extractul apos este ușor opalescent și are colorație galben-brună, cel acetonc este limpede și de culoare galben-pai, iar cel etanolic este limpede și galben-brun, similar ca și colorație cu extractul apos.

I.7. Identificarea metaboliților activi

În extractele obținute au fost identificați *compuși cu caracter reducător* (polifenoli) și *polizaharide*, în extractul apos prin următoarele reacții:

- reacția cu reactivul Fehling, cu formarea precipitatului roșu-cărămiziu;
- reacția cu reactivul Folin Ciocâlțeu, cu formarea colorației albastre;
- reacția cu reactivul Tollens, cu formarea oglinzii de argint;
- reacția de precipitare cu metanol, cu formarea precipitatului alb floconos.

I.8. Determinarea conținutului de polifenoli și de acid usnic din extractele de Usnea barbata (L.) F.H. Wigg și evaluarea acțiunii lor antioxidante

În studiul de față, în scopul determinării constituenților de bază ai *Usnea barbata* (L.) F.H.Wigg., s-au preparat extracte în diferiți solvenți: apă, acetonă și etanol 96%.

Identificarea și determinarea conținutului în acid usnic și polifenoli a fost realizată prin metoda HPLC; dozarea polifenolilor s-a efectuat și printr-o metodă colorimetrică, conform Farmacopeei Europene 9.0.

I.8.1. Determinarea conținutului de polifenoli totali

În acest scop, a fost utilizată o metodă colorimetrică, menționată în Farmacopeea Europeană 9.0 [234].

Principiul metodei: Metoda se bazează pe determinarea intensității colorației albastre a oxizilor de molibden formați prin reducerea de către polifenoli a reactivului Folin-Ciocalteu (acid fosfomolibdoframic).

Rezultate și discuții

Deoarece s-a realizat această determinare în patru extracte obținute în diferiți solvenți, apă, etanol 40%, etanol 96%, acetonă, rezultatele obținute au fost sintetizate și analizate comparativ, ulterior.

Analizând datele prezentate, s-a observat că în extractul etanolic 40% se regăsește cel mai mare conținut de polifenoli totali, urmat la foarte mică distanță de valoarea calculată pentru extractul etanolic 96%.

În extractul apos și în maceratul acetonc, valorile polifenolilor totali au fost apropiate, dar mai mici decât în extractele etanolice.

I.8.2. Analiza polifenolilor din extractele de *Usneae lichen* prin cromatografia de lichide de înaltă performanță

Pentru separarea, identificarea și cuantificarea compușilor fenolici, a fost adaptată o metodă HPLC standardizată pentru determinarea polifenolilor totali, descrisă de monografia USP 30-NF25 [236]. S-au utilizat ca substanțe de referință 11 polifenoli-standard.

Rezultate și discuții

Se observă că în extractele de *Usneae lichen* studiate s-a identificat doar o parte din cei 11 polifenoli utilizați ca substanțe de referință.

Polifenolii menționați s-au regăsit numai în extractele etanolic și apos, iar unii dintre ei au fost comuni ambelor extracte de *Usneae lichen*.

În maceratul acetonc nu s-a regăsit niciunul din cei 11 polifenoli standard.

I.8.3. Determinarea conținutului de acid usnic

Acidul usnic este unul dintre cei mai răspândiți metaboliți secundari ai lichenilor; are structură dibenzofuranică și poate fi izolat din majoritatea speciilor genului *Usnea* Dill.ex Adans., având multiple acțiuni farmacodinamice cunoscute [144, 150, 155, 161, 162, 165].

Material și metodă

Pentru separarea, identificarea și cuantificarea acidului usnic, a fost adaptată o metodă HPLC standardizată pentru determinarea polifenolilor totali, așa cum este descrisă în literatură; substanța de referință utilizată a fost acidul usnic.

Rezultate și discuții

S-a observat că, cel mai mare conținut de acid usnic, se regăsește în extractul acetonc urmat de extractul etanolic. Extractul apos din *Usneae lichen* conține cea mai redusă cantitate de acid usnic.

I.8.4. Evaluarea capacității antioxidante a extractelor de *Usneae lichen* prin metoda DPPH

Material și metodă

Capacitatea antioxidantă a fost determinată spectofotometric prin metoda de scavenging a radicalilor DPPH, metodă standardizată pentru evaluarea capacității compușilor fenolici de inactivare a radicalilor liberi.

Această metodă se realizează prin măsurarea capacității de neutralizare a radicalilor DPPH (difenilpicrilhidrazil) de către soluțiile analizate; culoarea violet a soluției inițiale de DPPH la 517 nm, este modificată în galben deschis, deoarece acesta apare sub formă redusă după contactul dintre soluția DPPH și polifenoli [89-105, 325].

Rezultate și discuții

S-a observat că extractul etanolic are cea mai mare activitate antioxidantă, urmat de extractul apos și de extractul acetonc.

La concentrația cea mai mare, extractul de *Usnea barbata* în etanol are o activitate de captare a radicalilor liberi DPPH mai mare de 50%, fiind astfel posibilă stabilirea IC₅₀ pentru acest extract.

I.9. Obținerea extractului acetonc uscat din *Usneae lichen* și analiza acestuia printr-o metodă cromatografică de lichide de ultra-înaltă performanță

I.9.1. Obținerea extractului acetonc uscat din *Usneae lichen*

Material și metodă

Pentru obținerea extractului uscat, *Usneae lichen* a fost măcinat sub formă de

pulbere și menținut cu acetonă, într-o instalație de refluxare continuă de tip Soxhlet. După finalizarea refluxării, s-a realizat evaporarea solventului iar extractul acetonic uscat a fost transferat într-un vas de sticlă cu capac etanș și păstrat la congelator, la o temperatură mai mică de -20°C , până la procesarea ulterioară [120].

Rezultate și discuții

Extractul uscat obținut are o consistență păstoasă, colorație verde-brună, miros acetonc puternic și gust iute.

I.9.2. Cromatografia de lichide de ultra-înaltă performanță (UHPLC)

Material și metodă

Identificarea și determinarea conținutului de acid usnic a fost efectuată prin metoda UHPLC. eșantion de analiză: extractul uscat de *Usneae lichen*, solubilizat în DMSO. Solubilizarea în DMSO a fost realizată deoarece acetona nu este un solvent adecvat pentru analiza UHPLC (absoarbe puternic și deformează picul soluției de analizat); de asemenea, în vederea studiilor pe culturi celulare, DMSO, spre deosebire de acetonă, nu este toxic celular [263]. Substanța de referință: acid usnic în DMSO

Rezultate și discuții

Conținutul de acid usnic determinat în extractul acetonc uscat este semnificativ mai mare decât în maceratul acetonc.

În cromatogramele soluțiilor diluate s-a observat și prezența altor compuși organici, încă neidentificați, care potențează efectul terapeutic al extractului uscat.

Studiul II. Cercetări privind proprietățile citotoxice ale extractului uscat de *Usnea barbata* (L.)F.H.Wigg. pe *Artemia salina* L.

Ipoteza de lucru: componenții chimici existenți în extractul uscat de *Usneae lichen* au acțiune citotoxică, care ar putea provoca moartea larvelor de *Artemia salina* L.

Scopul studiului: evaluarea preliminară a potențialului citotoxic al extractului uscat de *Usneae lichen* pe *Artemia salina* L.

II.1. Material și metodă

Acest studiu preliminar de citotoxicitate s-a realizat pe larvele de *Artemia salina* L., care au fost puse în contact cu soluții diluate ale extractului uscat de *Usneae lichen* (EUB).

Cuantificarea efectelor la nivel macroscopic s-a realizat prin măsurarea nivelului de supraviețuire al larvelor de *Artemia salina* L., în condițiile expunerii la concentrații diferite de extract uscat de *Usneae lichen* în DMSO un timp limitat.

II.2. Rezultate și discuții

Contactul larvelor de *Artemia salina* L. cu soluția salină și DMSO a arătat că cele 2 soluții nu au efect citotoxic asupra acestora.

După contactul cu EUB, s-a calculat DL50, rezultatele obținute arătând că extractul uscat de *Usneae lichen* prezintă acțiune citotoxică evidentă, direct proporțională cu doza și cu timpul de contact.

Studiul III. Evaluarea acțiunii antitumorale a extractului acetonc uscat din *Usneae lichen* pe carcinomul lingual cu celule scuamoase, CAL 27 (ATCC® CRL-2095™)

Ipoteza de lucru: extractul uscat de *Usneae lichen* are acțiune antitumorală pe carcinomul lingual cu celule scuamoase.

Scopul studiului: evaluarea acțiunii antitumorale în funcție de concentrația extractului și de timpul de expunere și determinarea mecanismelor posibile prin care se produce moartea celulelor tumorale CAL 27.

III.1. Pregătirea materialului de lucru

Celulele liniei tumorale umane CAL 27 (ATCC® CRL-2095™) reprezentate de celule epiteliale scuamoase izolate din carcinomul lingual au fost numărate, evaluându-se în același timp și viabilitatea celulară.

III.2. Determinarea modificărilor morfologice

Această determinare s-a realizat prin aplicarea soluțiilor diluate din extractul uscat de *Usneae lichen* pe culturile de celule tumorale CAL 27. Modificările morfologice ale celulelor CAL 27 după contactul cu soluțiile testate au fost detectate la microscop.

Rezultate și discuții

Analiza culturilor celulare la microscop, după contactul acestora cu EUB au evidențiat ca morfologia celulelor CAL 27 s-a modificat diferit, în funcție de vârsta culturii celulare, durata de expunere și concentrația soluției de EUB testată.

Obsevațiile anterioare au dus la concluzia că modificările morfologice s-au datorat exclusiv extractului uscat de *Usneae lichen*.

III.3. Dozarea proteinelor totale

Dat fiind faptul că proteinele sunt elemente fundamentale menținerii vieții, se apreciază că scăderea cantității proteinelor totale conduce la moartea celulară. Pornind de la aceste considerente, ipoteza de lucru a acestui subcapitol este că aplicarea diferitelor concentrații de EUB generează moartea celulelor tumorale CAL 27 prin acest mecanism.

Principiul metodei

Colorantul Coomassie Brilliant Blue G (CBBG) în contact cu proteinele, generează un complex de culoare albastră; concomitent cu formarea complexului albastru are loc și o modificare a capacității maxime de absorbție.

Rezultate și discuții

Analizând rezultatele obținute se observă că cantitatea de proteine solubile din celulele tumorale

CAL 27 este direct proporțională cu concentrația EUB.

III.4. Determinarea viabilității celulare prin metoda MTT

Principiul metodei:

Metoda colorimetrică cu bromură de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazoliu (MTT) are la bază capacitatea dehidrogenazelor mitocondriale din celulele vii de a converti substratul hidrosolubil galben (MTT) în formazan, de culoare albastru închis, insolubil în apă; cantitatea de formazan produsă este direct proporțională cu numărul de celule vii [315, 316, 318].

Rezultate și discuții

Cea mai intensă activitate citotoxică s-a manifestat la contactul de 24 de ore al celulelor CAL 27 cu EUB.

III.5. Evaluarea apoptozei celulare prin tehnica citometriei în flux

Principiul metodei

Anexina V marcată cu fluorocrom este utilizată pentru detectarea fosfatidil-serinei expusă la suprafața membranei celulelor apoptotice cu ajutorul citometriei în flux. Conjugarea dintre Anexina V și fluoresceină (FITC - Fluorescein isothiocyanat) facilitează cuantificarea rapidă a celulelor apoptotice marcate fluorescent. Prelucrarea celulelor în vederea evaluării rezultatelor se realizează utilizând kit-ul “eBioscience™ Annexin V-FITC Apoptosis Detection [344].

Rezultate și discuții

Analiza datelor obținute arată că extractul acetonc uscat de *Usneae lichen* induce apoptoza celulelor tumorale CAL 27 direct proporțional cu concentrația soluției utilizate și cu timpul de expunere.

III.6. Evaluarea acțiunii extractului acetonc de uscat de *Usneae lichen* asupra activității enzimelor antioxidante din celulele tumorale CAL 27

Ipoteza de lucru: extractul acetonc uscat de *Usneae lichen* are acțiuni de stimulare a enzimelor antioxidante din celulele CAL 27.

Scopul studiului: determinarea activității principalelor enzime antioxidante din celulele CAL 27: SOD, CAT și POD și evaluarea nivelului de stimulare a acestora de către extractul uscat de *Usneae lichen*, în

contextul efectului citotoxic exercitat de EUB pe celulele tumorale și în corelație cu concentrația extractului și cu timpul de contact.

III.6.1. Determinarea activității superoxid-dismutazei

III.6.2. Determinarea spectrofotometrică a activității catalazei

III.6.3. Determinarea activității peroxidazei

 Rezultate și discuții

Se remarcă o stimulare ușoară a activității SOD de către EUB, prrcum și o stimulare puternică a activităților CAT și POD. S-a analizat efectul EUB pe enzimele antioxidante, în strânsă legatură cu citotoxicitatea sa pe celulele CAL 27 și cu influența sa asupra concentrației de proteine totale din celulele CAL 27, determinări realizate în cadrul aceluiași studiu (subcapitolele III.4. si III.5.).

Studiul IV. Studii privind efectele antibacteriene ale extractelor din *Usnea barbata* (L.) F.H. Wigg pe specii bacteriene izolate din orofaringe

Ipoteza de lucru: existența unor posibile efecte antibacteriene ale extractelor în etanol, acetonă și apă din *Usneae lichen*.

Scopul studiului: evaluarea intensității efectului inhibitor asupra speciilor bacteriene izolate din oro-faringe, pentru fiecare tip de extract de *Usneae lichen* în parte.

 Rezultate și discuții

Comparând acțiunea antibacteriană a extractelor acetonice și etanolice de *Usneae lichen* pe ambele genuri de coci Gram-pozitivi testate, s-a observat că zonele de inhibiție sunt foarte apropiate ca dimensiuni în cazul *Staphylococcus aureus* și *Streptococcus oralis*, în timp ce la *Staphylococcus epidermidis* sunt considerabil mai mari.

Se poate afirma, prin analiza rezultatelor, că extractele apoase sunt practic lipsite de activitate antibacteriană.

Dintre bacilii Gram-negativi, *Escherichia coli* este parțial sensibil, deoarece pe zonele de inhibiție existente se dezvoltă tulpini mutante rezistente. *Pseudomonas aeruginosa*, însă, renumit prin

rezistența sa la agenți antibacterieni, a înregistrat nivele mari de sensibilitate comparativ cu *Escherichia coli*.

CONCLUZII FINALE

1. Cercetările fitochimice efectuate pe *Usnea barbata* (L.)F.H.Wigg au evidențiat: mucilagii, polifenoli și alți compuși cu caracter reducător, precum și acid usnic.
2. În extractele etanolice se regăsește cel mai mare conținut de polifenoli totali; în extractul apos și în cel acetonc, valorile conținutului de polifenoli totali calculate au fost foarte apropiate, fiind mai mici decât în extractele etanolice.
3. Rezultatele determinării HPLC au dovedit că extractul acetonc obținut prin macerare prezintă cel mai ridicat conținut de acid usnic, urmat - în ordine descrescătoare - de extractul etanolc și de cel apos.
4. Extractele acetonc, etanolc și apos din *Usneae lichen* au acțiune antioxidantă direct proporțională cu conținutul de polifenoli; extractul etanolc prezintă cea mai intensă activitate antioxidantă.
5. Extractul acetonc uscat din *Usneae lichen* prezintă un conținut de acid usnic de 8 ori mai mare decât maceratul acetonc.
6. Extractul acetonc uscat de *Usnea barbata* (L.)F.H.Wigg. prezintă acțiune citotoxică evidentă, cuantificată prin procentul mare de mortalitate al naupliilor de *Artemia salina* L. direct proporțională cu doza și cu timpul de contact.
7. Extractul acetonc uscat de *Usnea barbata* (L.)F.H.Wigg. are efect citotoxic pe linia celulară tumorală CAL27, direct proporțional cu concentrația soluțiilor folosite.

Citotoxicitatea EUB poate fi explicată și prin scăderea proteinelor totale, dependentă de concentrația extractului;

Citotoxicitatea indusă de EUB este mai mare după 24 ore, comparativ cu cea înregistrată după 48 ore – ușor mai scăzută; această mică diferență se datorează, probabil, fenomenelor reparatorii intracelulare.

8. Inducerea apoptozei este direct proporțională cu concentrația EUB și cu timpul de contact.
9. EUB stimulează activitatea principalelor enzime antioxidante: activitatea SOD este stimulată ușor, în timp de activitățile CAT și POD cresc semnificativ; creșterea semnificativă a activității CAT și POD comparativ cu SOD s-ar putea justifica prin creșterea producției de H_2O_2 (substratul pe care acționează ambele enzime) cauzată de declanșarea de către EUB a procesului de formare a SRO în mitocondrii.
10. Din punct de vedere oxido-reducător, EUB acționează pro-oxidant pe celulele tumorale, determinând o super-producție de SRO; prin inducerea unui stres oxidativ puternic în celulele tumorale, EUB scade viabilitatea celulară, producând moartea acestora prin apoptoză.
11. Extractele alcoolice și acetonică din *Usneae lichen* au efect antibacterian:
Staphylococcus aureus s-a dovedit a fi sensibil la acțiunea extractelor alcoolice și acetonică din *Usnea barbata* (L.) F.H.Wigg.
Pseudomonas aeruginosa prezintă o sensibilitate semnificativă la acțiunea extractelor acetonică și etanolice de *Usnea barbata* (L.) F.H.Wigg.
12. Rezultatele prezentului studiu demonstrează că extractele de *Usnea barbata* (L.) F.H.Wigg. ar putea fi utilizate eficient în infecții orodentare în care sunt implicate bacterii rezistente la terapia antibacteriană obișnuită, completând astfel tratamentul cu antibiotice clasice.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

1. Prateeksha, G., Paliya, B.S., Bajpai, R. et al., The genus *Usnea*: A potent phytomedicine with multifarious ethnobotany, phytochemistry and pharmacology, RSC Adv., 2016; 6: 21672 –21696
2. *** Index Fungorum, *Usnea barbata* (L.) F.H. Wigg., www.indexfungorum.org/names/NamesRecord.asp?RecordID=408326
3. Devisha, D., Sarkar, S., Recent advancement in periodontics, I.J.S.N., 2019, 10 (1): 1-4.
4. *** WHO, Noncommunicable diseases country profiles 2018, <https://www.who.int/nmh/publications/ncd-profiles-2018/en/> Publication date: September 2018 .
5. Ozturk, S., Erkisa, M., Oran, S., Ulukaya, E., Celikler, S. & Ari, F., Lichens exerts an anti-proliferative effect on human breast and lung cancer cells through induction of apoptosis, Drug and Chemical Toxicology, 2019, DOI: 10.1080/01480545.2019.1573825
6. Kriebel K, Hieke C, Müller-Hilke B, Nakata M., Kreikemeyer B, Oral Biofilms from Symbiotic to Pathogenic Interactions and Associated Disease - Connection of Periodontitis and Rheumatic Arthritis by Peptidylarginine Deiminase, Front. Microbiol., 2018; 9(53):1-14
7. Monea A., Monea, M., et al., Tongue microflora and periodontal disease, European Scientific Journal , 2014; 10(36):12-17
8. *** National Cancer Institute, „What is cancer”, www.cancer.gov/about-cancer/understanding/#related-diseases. Accesat, iunie 2019
9. *** National Cancer Institute, „What you need to know about oral cancer.” www.cancer.gov/cancertopics/wyntk/oral. Accesat, noiembrie 2018.
10. Jain, S., Dwivedi, J., Jain, P.K., Satpathy, S., Patra, A., Medicinal Plants for Treatment of Cancer: A Brief Review, Pharmacognosy Journal, 2016; 8(2):87-102.
11. Gontier, N., Symbiosis, History of. In: Kliman, R.M. (ed.), Encyclopedia of Evolutionary Biology, 2016; 4: 272–281. Oxford: Academic Press
12. Galinato MGM, Baguion JRC, Santiago KAA –Review of the lichen genus *Usnea* in the Philippines. Studies in Fungi, 2018; 3(1): 39–48
13. *** CNALH. 2019. <http://lichenportal.org/portal/index.php>. Accessed on June 09.
14. Boustie, J., Grube, M., Lichens as a promising source of bioactive secondary metabolites, Plant Genetic Resources 2005; 3: 273–287.
15. Pereira EC, Martins MCB, de Lourdes L., Buril M., Santiago R., et al. , Biologically-Active Compounds from Brazilian Lichens and their Affinity with Ether. J Drug Des Res., 2017; 4(6): 1057
16. Nguyen T., Chollet-Krugler, M., Sauvager, A., Boustie J., Chemical constituents of the lichen *Dermatocarpon luridum* (With.) J.R. Laundon.. Journées internationales AFERP & STOLON, May 2013, Bruxelles, Belgium. {hal-00873172}
17. Ohmura, Y., A Synopsis of the Lichen Genus *Usnea* (Parmeliaceae, Ascomycota) in Taiwan, Mem. Natl. Mus. Nat. Sci., 2012; 48: 91–137
18. Aschenbrenner, I.A., Cernava, T., Berg, G., Grube, M., Understanding Microbial Multi-Species Symbioses, Front Microbiol. 2016; 7: 180.
19. Radlane, T., Torra, T., et al., Key to European species, in The Diversity of Lichenology: Jubilee

- Volume, A. Thell, M. R. D. Seaward & T. Feuerer (eds). Bibliotheca Lichenologica, 2009; 100: 419–462, J. Cramer in der Gebrüder Borntraeger Verlagsbuchhandlung, Berlin · Stuttgart
20. ***Association Française de Lichénologie, www.afl-lichenologie.fr/PhotosAFL/Photos_AFL_Usnea_barbata.htm
 21. Brezeanu, A., Voicu, D., Ultrastructural peculiarities of the *Usnea barbata* (L.) Mott., Mycobiont and phycobiont cells in "in vivo" and "in vitro" culture, Rom J. Biol. – Plant. Biol., 2008; 53(2): 63-69
 22. Hibbett, D.S.; et al., A higher level phylogenetic classification of the Fungi, Mycological Research, 2007; 111 (5): 509-547.
 23. Lücking, R., Hodkinson B., Leavitt, SD., The 2016 classification of lichenized fungi in the *Ascomycota* and *Basidiomycota* – Approaching one thousand genera: The Bryologist 2017; 119(4): 361-416.
 24. Truong, C., Rodriguez JM, and Clerc, P., Pendulous *Usnea* species (*Parmeliaceae*, lichenized *Ascomycota*) in tropical South America and the Galapagos, The Lichenologist 2013; 45(4): 505-543
 25. Stănescu, U., Hancianu, M., Cioanca, O., Plante medicinale de la A la Z, Editura Polirom 2014; 1261-1265
 26. *** *Usnea barbata*, Encyclopedia of Life. Available from <https://eol.org/pages/11494366/names>
 27. Ranković, B., Lichen Secondary Metabolites: Bioactive Properties and Pharmaceutical Potential, Edition: Springer International Publishing, 2015; ISBN: 978-3-319-13374-4
 28. Bucur, A., Adenopatia metastatică loco-regională după tumori maligne oro-maxilo- -faciale, part III, Medicina Stomatologică, 2005; 9 (6)
 29. Newman, D., Cragg, GM, Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010, J. Nat. Prod., 2012; 23 : 311-335
 30. Oprică L., Metaboliți secundari din plante, origine, structură, funcții, Editura Universității Alexandru Ioan Cuza Iași, 2016; ISBN: 978-606-714-253-2
 31. Kabera, J., Semana, E., Mussa, A., et al Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Properties, Journal of Pharmacy and Pharmacology 2014; 2: 377-392
 32. Salgado, F., Albornoz, L., Cortéz, C., Stashenko, E. et al., Secondary Metabolite Profiling of Species of the Genus *Usnea* by UHPLC-ESI-OT-MS-MS Molecules, 2018 ; 23(1): 54.
 33. Boustie J., Tomasi, S., Grube, M., Bioactive lichen metabolites: alpine habitats as an untapped source, Phytochemistry Reviews, Springer Verlag, 2011; 10 (3): 287-307.
 34. Bhattacharyya S et al., Lichen Secondary Metabolites and Its Biological Activity. American Journal of PharmTech Research, 2016; 28-44
 35. Vanaja et al., Biology of Lichen polysaccharides and its Applications-a Review, Proceedings of NCIB, 2017; 64-72
 36. Mitrović, T., Stamenković, S., Cvetković, V.. et al., Lichens as source of versatile bioactive compounds, Biologica Nyssana, 2011; 2(1): 1-6
 37. Shukla, P., Upreti, D.K., Tewari, L.M., Secondary metabolite variability in lichen genus *Usnea* in India: A potential source for bioprospection, G- Journal of Environmental Science and Technology, 2014; 2(3): 29-40
 38. ***National Cancer Institute, Oxidative metabolism, definition, <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/oxidative-metabolism>, accessed 05.08.2019
 39. Cansaran, D. et al., Determination of Usnic Acid Content in Some Lichen Species Found in Anatolia,

- Journal of Applied Biological Sciences 2008; 2 (3): 41-44
40. Cansaran, D. et al., Identification and Quantitation of Usnic Acid from the Lichen *Usnea* Species of Anatolia and Antimicrobial Activity, Z. Naturforsch., 2006; 61(c): 773-776
 41. Shrestha, G., St. Clair, L., O'Neill, L., The immunostimulating role of lichen polysaccharides: a review – abstract, Phytother. Res. 2015; 29(3): 317-322
 42. Olafsdottir ES, Ingoldfottir K., Polysaccharides from lichens: structural characteristics and biological activity, Planta Med 2001; 67: 199-208
 43. Olafsdottir ES, Omarsdottir S, Smestad Paulsen B et al ,Rhamnopyranogalactofuranan, a new immunologically active polysaccharide from *Thamnolia subuliformis*. Phytomedicine, 1999; 6: 273-279
 44. Olafsdottir ES, Omarsdottir S, Paulsen BS et al ,Immunologically active O6-branched (1-3)-b-glucan from the lichen *Thamnolia vermicularis* var. *subuliformis*, Phytomedicine 2003; 10: 318-324
 45. Podterob AP, Chemical composition of lichens and their medical application. Pharm Chem J., 2008; 42: 582-588
 46. Muggia L, Grube M., Fungal Diversity in Lichens: From Extremotolerance to Interactions with *Algae*, Life (Basel), 2018; 8(2): 15-19
 47. Vicol, I., Effect of old-growth forest attributes on lichen species abundances: a study performed within Ceahlău Național Park (România) – abstract - Cryptogamie, Mycologie, 2015; 36 (4): 399-407
 48. Marmor, L., Torra, T., et. al., Lichens on *Picea abies* and *Pinus sylvestris* – from tree bottom to the top, The Lichenologist, 2013, 45(1): 51-63
 49. Francolini, P. Norris, A. Piozzi, G. Donelli, and P. Stoodley, Usnic Acid, a Natural Antimicrobial Agent Able To Inhibit Bacterial Biofilm Formation on Polymer Surfaces, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2004; 4360-4365
 50. Maciag-Dorszynska, M., Wezgrzyn, G., Guzow-Krzeminska, B., Antibacterial activity of lichen secondary metabolite usnic acid is primarily caused by inhibition of RNA and DNA synthesis, FEMS Microbiol Lett, 2014; 353: 57-62
 51. Gupta, K.& Verma S& S. Gupta S.& A. Singh & A. Pal & S. K. Srivastava & P. K. Srivastava & S. C. Singh & M. P. Darokar, Membrane-damaging potential of natural L-(–)-usnic acid in *Staphylococcus aureus*, Eur J Clin Microbiol Infect Dis., 2012; 31:3375-3383
 52. Madamombe I.T., Afolayan A.J., Evaluation of antimicrobial activity of Extracts from South Africa *Usnea barbata*, Pharm.Biol. 2003; 41(3): 199-202
 53. Srivastava P, Upreti DK, Dhole TN, Srivastava AK, Nayak MT., Antimicrobial Property of Extracts of Indian Lichen against Human Pathogenic Bacteria, Interdiscip Perspect Infect Dis., 2013: 709348
 54. Tozatti MG, Ferreira DS, Flauzino LG, Moraes Tda S, Martins CH, Groppo M, Andrade e Silva ML, Januário AH, Pauletti PM, Cunhaa WR., Activity of the Lichen *Usnea steineri* and its Major Metabolites against Gram-positive, Multidrug-resistant Bacteria., Nat Prod Commun. 2016; 11(4):493-496.
 55. Manoharachary, C., Nagaraju, D., Antimicrobial and Antifungal activity of *Leptogium Javanicum* Mont. and *Usnea ghattensis* Awasthi C., International Journal of Modern Chemistry and Applied Science, 2016; 3(3): 444-445
 56. Çobanoğlu, G. et.al., Evaluation Of Antimicrobial Activity Of The Lichens *Physcia Aipolia*, *Xanthoria*

- Parietina*, *Usnea Florida*, *Usnea Subfloridana* And *Melanohalea Exasperata*, Modern Phytomorphology, 2016; 10: 19-24
57. Matvieieva, N.A., Pasichnyk, L.A., Zhytkevych, N.V., Antimicrobial activity of extracts from Ecuadorian lichens, Mikrobiolohichnyi zhurnal, 2015; 77(3): 23-27
58. Kamal, S., Manish, S., Savita, J. et.al., Assessment of Antibacterial Activity of *Usnea* Species of Shimla Hills, Int.J.Curr. Microbiol.App. Sci., 2015; 4(7): 413-425
59. Gajendra S, Clair LLS. Lichens: a promising source of antibiotic and anticancer drug, Phytochemistry Reviews, 2013; 12: 229-244
60. Behera BC, Verma N, Sonone A, Makhija U., Antioxidant and antibacterial activities of lichen *Usnea ghattensis* in vitro, Biotechnology Letters, 2005; 27: 991- 995
61. Idamokoro, E., Masika, P., Muchenje, V., In-vitro antibacterial sensitivity of *Usnea barbata* lichen extracted with methanol and ethyl-acetate, against selected *Staphylococcus* species from milk of cows with mastitis, Archiv Tierzucht 2014; 57(25): 1-9
62. Elo H, Matikainen J, Pelttari E., Potent activity of the lichen antibiotic (+)-usnic acid against clinical isolates of vancomycin resistant enterococci and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Naturwissenschaften 2007; 94: 465-468
63. Kosanić, M., Ranković, B., Screening of antimicrobial activity of some lichen species in vitro, Kragujevac J. Sci., 2010; 32: 65-72
64. Lauterwein, M., Oethinger, M., Belsner, K. et al., In Vitro Activities of the Lichen Secondary Metabolites Vulpinic Acid, (1)-Usnic Acid, and (2)-Usnic Acid against Aerobic and Anaerobic Microorganisms, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1995; 2541-2543
65. Lei Guo et. al., Review of Usnic Acid and *Usnea barbata* Toxicity, Journal of Environmental Science and Health, 2008; Part C, 26:317-338.
66. Lucarini, L., Tozatti, M., Antimycobacterial activity of *Usnea steineri* and its major constituent (+)-usnic acid, African Journal of Biotechnology, 2012; 11(20): 4636-4639
67. Oscar E., Rodríguez, A., William, A., Andrade, B., Antimicrobial activity of lichens in the upper basin of Bogotá river, NOVA., 2015; 13 (23): 65-72
68. Ullah, M., et al., Bacterial neuraminidase inhibition by phenolic compounds from *Usnea longissima*, South African Journal of Botany, 2018;
69. Perry, N., Benn, M., et. al., Antimicrobial, Antiviral and Cytotoxic Activity of New Zealand Lichens, The Lichenologist , 1999 ; 31(6): 627-636
70. Prabhu S.S., Sudha S.S., Evaluation of the antibacterial properties of some Lichen species against human pathogens, Int. J. Adv. Res. Biol. Sci., 2015; 2(4):177-181
71. Santiago, K., Sangvichien, E., Boonpragob, K., Secondary metabolic profiling and antibacterial activities of different species of *Usnea* collected in Northern Philippines, Mycosphere, 2013; 4(2): 267-280
72. Thippeswamy, B., Naveenkumar, K. et. al., Antimicrobial activity of ethanolic extract of *Usnea longissima*, Journal of Experimental Sciences, 2011; 2(12): 01-03
73. Santiago, K., Borricano, J. et al., Antibacterial activities of fruticose lichens collected from selected sites in Luzon Island, Philippines, Philippine Science Letters 2010; 3(2), 18-28
74. Shanmugam, P., et al., Evaluation of Antimicrobial, antioxidant and anticancer activities of few

- macrolichens collected from Eastern Ghats of Tamil Nadu, India, Int. Res. J. Pharm. 2017; 8 (3): 39-43
75. Paudel, B., Bhattarai, K., Bhattarai, H.D., Antimicrobial and antioxidant activities of two polyketides from lichen-endophytic fungus *Preussia* sp., Z. Naturforsch., 2018; C 73(3-4)
 76. Pathak, A., Upreti, D.K., Dikshit A., Antidermatophytic Activity of the Fruticose Lichen *Usnea orientalis*, Medicines 2016; 3(24): 2-6
 77. Schmeda-Hirschman, G., Tapia, A., Lima, B. et al., A new antifungal and antiprotozoal depside from the Andean lichen *Protousnea poeppigii*. Phytotherapy Research, 2008; 22(3): 349-355
 78. Pires, R.H., Lucarini, R., Effect of Usnic Acid on *Candida orthopsilosis* and *C. Parapsilosis*, Antimicrob. Agents Chemother., 2012; 56(1): 595.
 79. Rusu, E., Cristescu, C., Dimorphism regulation through quorum sensing molecules in *Candida albicans* species, Revista Română de Boli Infecțioase 2012, 15(2)
 80. Rukayadi, Y., Diantini, A., Lestari K., Anti Fungal Activity of Methanolic Extract of *Usnea* sp. against *Malassezia furfur*, Bionatura-Jurnal Ilmu-ilmu Hayati dan Fisik, 2012; 14 (1): 31 - 37
 81. Vijayan, P., Raghu, C., Ashok, G., Dhanaraj S.A. & Suresh, B., Antiviral activity of medicinal plants of Nilgiris, Indian J Med Res., 2004; 120: 24-29
 82. Scirpa P, Scambia G, Masciullo V, et.al., A zinc sulfate and usnic acid preparation used as post-surgical adjuvant therapy in genital lesions by *Human Papillomavirus*, Minerva Ginecol, 1999; 51:255-260.
 83. Yamamoto, Y, Miura Y, Kinoshita Y, et. al., Screening of tissue cultures and thalli of lichens and some of their active constituents for inhibition of tumor promoter-induced Epstein-Barr virus activation, Chem Pharm Bull (Tokyo) 1995; 43: 1388-1390.
 84. Fournet, A. et. al., Activity of compounds isolated from Chilean lichens against experimental cutaneous leishmaniasis, Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol. 1997; 116: 51-54
 85. Hobbs, C., Usnea: The Herbal Antibiotic. Capitola, CA: Botanica Press, 1986
 86. Stephen Harrod Buchner: Herbal Antibiotics; e-book version 2.1 – 2016: 208 – 219
 87. Molnár K, Farkas E., Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: a review. Z. Naturforsch, 2010; C65:157-173
 88. Pavithra G.M., Vinayaka K.S., Rakesh K.N., et al., Antimicrobial and antioxidant activities of a macrolichen *Usnea pictoides* G. Awasthi (*Parmeliaceae*), Journal of Applied Pharmaceutical Science, 2013; 3 (08) :154-160.
 89. Panieri, E., and M.M. Santoro. ROS homeostasis and metabolism: a dangerous liason in cancer cells. Cell Death Dis. 2016; 7:e2253. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.10>
 90. Vucetic M, Cormerais Y, Parks SK and Pouyssegur J, The Central Role of Amino Acids in Cancer Redox Homeostasis: Vulnerability Points of the Cancer Redox Code. Front. Oncol. 2017; 7:319
 91. Asaduzzaman K, Mousumi T., Dian-zheng Z., Han-chun C., Antioxidant Enzymes and Cancer, Chin J Cancer Res, 2010; 22(2):87-92
 92. Odabasoglu, F, Aslan, A, Cakir A, Suleyman H, Karagoz Y, Halici M and Bayir Y. Comparison of antioxidant activity and phenolic content of three lichen species, Phytother. Res. 2004; 18: 938-941.
 93. Odabasoglu, F, Aslan, A, Cakir A, Suleyman H, Karagoz Y, Bayir Y and Halici M., Antioxidant activity,

- reducing power and total phenolic content of some lichen species, *Fitoterapia*, 2005; 76: 216-219
94. Behera BC, Verma N, Sonone A., Makhija U., Determination of antioxidative potential of lichen *Usnea ghattensis* in-vitro, *LWT-Food Sci. Technol.*, 2006; 39: 80-85.
95. Schumacker, P.T. Reactive oxygen species in cancer cells: live by the sword, die by the sword. *Cancer Cell.*, 2006; 10:175-176. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.08.015>
96. Kosanić M, Ranković B and Vukojević J. Antioxidant properties of some lichen species. *J. Food Sci. Technol.*, 2011; 48: 584-590.
97. Miriyala, S., I. Spasojevic, A. Tovmasyan, D. Salvemini, Z. Vujaskovic, D. St.Clair, and I. Batinic-Haberle. 2012. Manganese superoxide dismutase, MnSOD and its mimics. *Biochim. Biophys. Acta.* 1822:794-814. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.12.002>
98. *** Nebraska Redox Biology Center Educational Portal http://genomics.unl.edu/RBC_EDU/hp.html
99. Hempel, N., P.M. Carrico, and J.A. Melendez, Manganese superoxide dismutase (Sod2) and redox-control of signaling events that drive metastasis. *Anticancer Agents Med. Chem.* 2011;11:191-201. <https://doi.org/10.2174/187152011795255911>
100. Verma, P., Paswan S.K., Abhisek Raj, A. et al., Hematological, antioxidant and protective performance of *Usnea longissima* on chemical induced hepatotoxicity in experimental animals, *Journal of Coastal Life Medicine* 2017; 5(5): 224-232
101. Susithra, E., et al. , Evaluation of In-vitro Antioxidant activity of isolated compounds of lichen *Usnea undulata* , *Journal of Pharmacy Research* 2011; 4(2): 352-355
102. Jie Wang & Jing Yi, Cancer cell killing via ROS: To increase or decrease, that is the question, *Cancer Biology & Therapy*, 2008; 7 (12):1875-1884, DOI: 10.4161/cbt.7.12.7067
103. Hurt, E.M., S.B. Thomas, B. Peng, and W.L. Farrar. Molecular consequences of SOD2 expression in epigenetically silenced pancreatic carcinoma cell lines. *Br. J. Cancer.* 2007; 97:1116-1123. doi:10.1038/sj.bjc.6604000
104. Aurer, Modern understanding of periodontal diseases, *Rad 514 Medical Sciences*, 2012; 38 : 49-59
105. Dhar, S.K., and D.K. St Clair. 2012. Manganese superoxide dismutase regulation and cancer. *Free Radic. Biol. Med.*, 2012; 52:2209-2222.
106. Kohlhardt-Floehr C, Boehm F, Troppens S, Lademann J, Truscott TG., Prooxidant and antioxidant behaviour of usnic acid from lichens under UVB-light irradiation - Studies on human cells. *J Photochem Photobiol B* 2010; 101: 97-102.
107. Müller K., Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. *Applied Microbiology and Biotechnology* , 2002; 56(1/2): 9-16.
108. Sheiham, A., Oral health, general health and quality of life, *Bulletin of the World Health Organization*, 2005; 83(9): 641-720
109. Cragg GM, Newman DJ. Nature: a vital source of leads for anticancer drug development. *Phytochem Rev* 2009; 8: 313-331.
110. Vuorelaa P, Leinonenb M, Saikkuc P, Tammela P, Rauhad JP, Wennberge T, et al. Natural products in the process of finding new drug candidates. *Curr Med Chem* 2004;11:1375-89.
111. Mondal S, Bandyopadhyay S, Ghosh MK, Mukhopadhyay S, Roy S, Mandal C.. Natural products: promising resources for cancer drug discovery. *Anti-cancer agents in med chem* 2012; 12:

- 49-75.
112. Dhar, S.K., J. Tangpong, L. Chaiswing, T.D. Oberley, and D.K. St Clair., Manganese superoxide dismutase is a p53-regulated gene that switches cancers between early and advanced stages. *Cancer Res*, 2011; 71:6684-6695.
113. Demain AL, Viashnav P. Natural products for cancer chemotherapy. *Microb Biotechnol* 2011; 4: 687-99.
114. Cragg GM, Newman DJ., Plants as a source of anti-cancer agents. *J Ethnopharmacol* 2005; 100:72-9.
115. Ramya, K., Thirunalasundari T., Pharmaceutically relevant metabolites from Lichens of Kodaikanal, India, *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* 2014; 3(11) : 779-788
116. Kunjachan S, Rychlik B, Storm G, Kiessling F, Lammers T. Multidrug resistance: Physiological principles and nanomedical solutions. *Adv Drug Deliv Rev* 2013; 65:1852- 65.
117. Shrestha, G. et al., Anticancer Activities of Selected Species of North American Lichen Extracts, *Phytother Res*. 2015; 29(1):100-107.
118. Zugic A., Jeremic I., Isakovic A. and all., Evaluation of Anticancer and Antioxidant Activity of a Commercially Available CO₂ Supercritical Extract of Old Man's Beard (*Usnea barbata*). *Plos One*, 1016; 11(1): 1-14
119. Russo A., Piovano M., Lombardo L., Garbarino J., and Cardile V., Lichen metabolites prevent UV light and nitric oxide-mediated plasmid DNA damage and induce apoptosis in human melanoma cells, *Life Sci.*, 2008; 83: 468 – 474.
120. Wang, W., Niu, S., Luxin Qiao, L., et al, Usnic Acid as Multidrug Resistance (MDR) Reversing Agent against Human Chronic Myelogenous Leukemia K562/ADR Cells via an ROS Dependent Apoptosis, *Hindawi BioMed Research International Volume* 2019, Article ID 8727935, 7 pages <https://doi.org/10.1155/2019/8727935>
121. Maulidiyah, A. et al., Cytotoxic activity of (-)-usnic acid compound from lichen *Usnea* sp. on Murine Leukemia P388 Cells, *JIFI*, 2015; 13(1):
122. Mayer M., O'Neill M. A., Murry K. E., Santos-Magalhães N. S., et al., Usnic acid: a non-genotoxic compound with anti-cancer properties, *AntiCancer Drugs*, 2005; 16: 805 – 809
123. Mitrović, T., Stamenković, S., Cvetković, V. et al., Antioxidant, Antimicrobial and antiproliferative activities of five Lichen species, *Int. J. Mol. Sci.*, 2011; 12: 5428-5448
124. Connor, K.M., S. Subbaram, K.J. Regan, K.K. Nelson, J.E. Mazurkiewicz, P.J. Bartholomew, A.E. Aplin, Y.T. Tai, J. Aguirre-Ghiso, S.C. Flores, and J.A. Melendez, Mitochondrial H₂O₂ regulates the angiogenic phenotype via PTEN oxidation. *J. Biol. Chem.* 2005; 280:16916-16924. doi:10.1074/jbc.M410690200
125. Bessadottir M, Egilsson M, Einarsdottir E, Magnusdottir IH, Ogmundsdottir MH, et al. (2012) Proton-Shuttling Lichen Compound Usnic Acid Affects Mitochondrial and Lysosomal Function in Cancer Cells, *Plos One*, 2012; 7(12): e51296. doi:10.1371/journal.pone.0051296
126. Singh N, Nambiar D, Kale RK, Singh RP., Usnic acid inhibits growth and induces cell cycle arrest and apoptosis in human lung carcinoma A549 cells. *Nutr Cancer* 2013; 65(1): 36-43.
127. Triggiani D, Ceccarelli D, Tiezzi A, et al., Antiproliferative activity of lichen extracts on murine myeloma cells. *Biologia*, 2009; 64: 59-62.

128. Shanmugam, P., et al., Evaluation of Antimicrobial, antioxidant and anticancer activities of few macrolichens collected from Eastern Ghats of Tamil Nadu, India, Int. Res. J. Pharm. 2017; 8 (3): 39-43
129. Zuo S, Wang L, Zhang Y, Zhao D, Li Q, Shao D, Fang X., Usnic acid induces apoptosis via an ROS-dependent mitochondrial pathway in human breast cancer cells in vitro and in vivo. RSC Adv, 2015; 5: 153-162
130. Ari F, Celikler S, Oran S, et al., Genotoxic, cytotoxic, and apoptotic effects of *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. on breast cancer cells. Environ Toxicol 2012; DOI: 10.1002/tox.21809.
131. Backorova M, Backor M, Mikes J, Jendzelovsky R, Fedorocko P. 2011. Variable responses of different human cancer cells to the lichen compounds parietin, atranorin, usnic acid and gyrophoric acid. Toxicol In Vitro 2011; 25: 37-44.
132. Backorova M, Jendzelovsky R, Kello M, Backor M, Mikes J, Fedorocko P., Lichen secondary metabolites are responsible for induction of apoptosis in HT-29 and A2780 human cancer cell lines. Toxicol In Vitro 2012; 26: 462-468.
133. Bézivin C, Tomasi S, Lohézic-Le Dévéhat F, Boustie J. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines., Phytomedicine, 2003; 10: 499-503.
134. Bezivin C, Tomasi S, Rouaud I, Delcros JG, Boustie J. 2004. Cytotoxic activity of compounds from the lichen *Cladonia convoluta*, Planta Med 2004; 70: 874-877.
135. Brisdelli F, Perilli M, Sellitri D, et al., Cytotoxic activity and antioxidant capacity of purified lichen metabolites: an in vitro study, Phytother Res 2013; 27: 431-437.
136. Ogmundsdottir HM, Zoega GM, Gissurarson SR et al , Anti-proliferative effects of lichen-derived inhibitors of 5-lipoxygenase on malignant cell-lines and mitogenstimulated lymphocytes. J Pharm Pharmacol, 1998; 50: 107-115
137. Kumar S, Muller K., Lichen metabolites. II. Antiproliferative and cytotoxic activity of gyrophoric, usnic and diffractaic acid on human keratinocyte growth. J Nat Prod 1999; 62: 821-823
138. Brisdelli F, Perilli M, Sellitri D, et al. Cytotoxic activity and antioxidant capacity of purified lichen metabolites: an in vitro study. Phytother Res 2013; 27: 431-437.
139. Einarsdóttir E. et al Cellular Mechanisms of the Anticancer Effects of the Lichen Compound Usnic Acid, Planta Med 2010; 76(10): 969-974
140. Kasimogullari SC, Oran S, Ari F, Ulukaya E, Aztopal N, Sarimahmut M, et al. Genotoxic, cytotoxic, and apoptotic effects of crude extract of *Usnea filipendula* Stirt. in vitro. Turk J Biol 2014; 38: 940-947.
141. Ari F, Aztopal N, Oran S, Bozdemir S, Celikler S, Ozturk S, Ulukaya E. *Parmelia sulcata* Taylor and *Usnea filipendula* Stirt induce apoptosis-like cell death and DNA damage in cancer cells., Cell Prolif 2014; 47: 457-464.
142. Yu, X., Guo, Q., Su, G., Yang, A., Hu, Z., Qu, C., Wan, Z., Li, R., Tu, P., Chai, X., Usnic acid derivatives with cytotoxic and antifungal activities from the lichen *Usnea longissima*., Journal of Natural Products, 2016; 79: 1373-1380.
143. Nguyen TT, Yoon S, Yang Y, Lee HB, Oh S, Jeong MH et al., Lichen secondary metabolites in *Flavocetraria cucullata* exhibit anti-cancer effects on human cancer cells through the induction of apoptosis and suppression of tumorigenic potentials. Plos One, 2014; 9: e111575.

144. Kılıç N, Değerli E, Torun V, Altaytaş F, Cansaran-Duman D, Investigation of synergistic effect of tamoxifen and usnic acid on breast cancer cell line. JSM Biology, 2016; 1: 1006.
145. Nagarathna P.K.M., M. Johnson Wesley, P. Sriram Reddy, Reena. K, Review on Genotoxicity, its Molecular Mechanisms and Prevention, Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res., 2013; 22(1), 236-243
146. Koparal AT, Ayaz-Tüylü B, Türk H, In vitro cytotoxic activities of (+)-usnic acid and (–)-usnic acid on V79, A549, and human lymphocyte cells and their non-genotoxicity on human lymphocytes. Nat Prod Res, 2006; 20: 1300-1307
147. Leandro, L.F. et al., Assessment of the genotoxicity and antigenotoxicity of (+)-usnic acid in V79 cells and Swissmice by the micronucleus and cometa assay, Mutation Research, 2013; 753: 101–110
148. Ceker S., Orhan F., Emre Kizil, H., et. al. Genotoxic and antigenotoxic potentials of two *Usnea* species – Abstract, Toxicology and Industrial Health, 2013; 31 (11): 990-999
149. Aslan A, Agar G, Alpsoy L et al, Protective role of methanol extracts of two lichens on oxidative and genotoxic damage caused by AFB(1) in human lymphocytes in vitro, Toxicol and Health, 2012; 28(6):505–512
150. Dincsoy, AB, Cansaran-Duman, D, Changes in apoptosis-related gene expression profiles in cancer cell lines exposed to usnic acid lichen secondary metabolite, Turk J Biol., 2017; 41: 484-493
151. Dobrescu, D., Tanasescu, M., Mezdrea, A. et al., Contributions to the complex study of some lichens-*Usnea* genus. Pharmacological studies on *Usnea barbata* and *Usnea hirta* species – abstract- Romanian journal of physiology: physiological sciences / [Academia de Științe Medicale], 1993; 30(1-2):101-107
152. Okuyama. E., Umeyama. K., Yamazaki. M., Kinoshita. Y., & Yamamoto, Y, Usnic acid and diffractaic acid as analgesic and antipyretic components of *Usnea diffracta*. Planta Med 1995; 61:113–115.
153. Odabasoglu F, Cakir A, Suleyman H et al., Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats, J Ethnopharmacol 2006; 103: 59–65.
154. Odabasoglu, F., Suleyman, H., Cakir, A., et al., Effects of water extract of *Usnea longissima* on antioxidant enzyme activity and mucosal damage caused by indomethacin in rats, Phytomedicine, 2005; 12: 656–662.
155. Safak, B., Hakki-Ciftci I., Mehmet -Ozdemir, M., In Vitro Anti-*Helicobacter pylori* Activity of Usnic Acid, Phytother. Res., 2009; 23: 955–957
156. Lee KA, Kim MS., Antiplatelet and antithrombotic activities of methanol extract of *Usnea longissima* - abstract, Phytother Res. 2005; (12):1061-1064.
157. Alahmadi AA, Usnic acid biological activity: history, evaluation and usage.- abstract, Int J Basic Clin Pharmacol. 2017; 586 (6): 2752–2759
158. Araújo AA, de Melo MG, Rabelo TK et al, (2015) Review of the biological properties and toxicity of usnic acid., Nat Prod Res., 2015; 29(23):2167–2180
159. Malhotra, S., Subban, R., Singh, A., Lichens- Role in Traditional Medicine and Drug Discovery, The Internet Journal of Alternative Medicine., 2007 ; 5 (2)
160. Weissbuch, BC, Medicinal Lichens: The Final Frontier, JAHG 2014; 12(2): 23-28
161. Luzina A.O & Salakhutdinov, F.N., Usnic acid and its derivatives for pharmaceutical use: a patent review (2000-2017), Expert Opinion on Therapeutic Patents, 2018;

162. Luzina,A.O & Salakhutdinov,F.N., Biological Activity of Usnic Acid and its Derivatives: Part 2. Effects on Higher Organisms. Molecular and Physicochemical Aspects, Russian Journal of Bioorganic Chemistry, 2016; 42, (3)249–268.
163. White, P., Oliveira, R., Oliveira, AP et.al., Antioxidant Activity and Mechanisms of Action of Natural Compounds Isolated from Lichens: A Systematic Review, Molecules, 2014; 19(9):14496-14527
164. Cabrera, C., Materia Medica, Usnea spp. Eur J Herbal Med, 1996; 2(2):1113.
165. Correche ER, Carrasco M, Escudero ME et al., Study of the cytotoxic and antimicrobial activities of usnic acid and derivatives, Fitoterapia, 1998; 69: 493–501.
166. Bjerke JW, Elvebakk A, Domínguez E, et al. Seasonal trends in usnic acid concentrations of Arctic, alpine and Patagonian populations of the lichen *Flavocetraria nivalis*. Phytochemistry. 2005; 66(3): 337-344
167. Nimis PL & Martellos,S., 2017: ITALIC - The Information System on Italian Lichens. Version 5.0. University of Trieste, Dept. of Biology, (<http://dryades.units.it/italic>)
168. Pompilio A, Riviello A, Crocetta V et al. Evaluation of antibacterial and antibiofilm mechanisms by usnic acid against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Future Microbiol 2016; 11:1315–1338
169. Kunjachan S, Rychlik B, Storm G, Kiessling F, Lammers T. Multidrug resistance: Physiological principles and nanomedical solutions. Adv Drug Deliv Rev 2013;65:1852- 1865.
170. Mann J. Natural products in cancer chemotherapy: past, present, and future. Nat Rev Cancer 2002;2(2):143-148.
171. Prakash O, Kumar A, Kumar P, Ajeet. Anticancer Potential of Plants and Natural Products-A Review. Am J Pharmacol Sci 2013;1:104-15.
172. Zambare VP, Christopher LP. Biopharmaceutical potential of lichens. Pharm Biol 2012;50:778-98.
173. Gabriele Pizzino et al., Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health, Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2017, Article ID 8416763, 13 pages; <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>
174. Klaunig, JE, Wang,Z., Oxidative stress in carcinogenesis, Current Opinion in Toxicology, 2018; 7 :116-121
175. Liou G.I., Storz P., Reactive oxygen species in cancer, Free Radic Res., 2010; 44(5): 1-31.
176. Jasen Kundalić et al., Oxidative stress in the pathogenesis of periodontal disease, Acta Medica Medianae 2016, Vol.55(4): 66-71
177. Wang et al., Oxidative Stress and Antioxidant System in Periodontitis, Frontiers in Physiology , 2017 ; 8: Article 910, doi: 10.3389/fphys.2017.00910
178. ***WHO, Oral Health, 2018, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/oral-health>
179. Lubna Tahir and Rabia Nazir, Dental Caries, Etiology, and Remedy through Natural Resources, Dental Caries - Diagnosis, Prevention and Management, Zühre Akarslan, IntechOpen, 2018: DOI: 10.5772/intechopen.75937. Available from: <https://www.intechopen.com/books/dental-caries-diagnosis-prevention-and-management/dental-caries-etiology-and-remedy-through-natural-resources>, accesat in iul.2019

180. Khushwant S. Bhullar and H. P. Vasantha Rupasinghe, "Polyphenols: Multipotent Therapeutic Agents in Neurodegenerative Diseases," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013; Article ID 891748, 18 pages. <https://doi.org/10.1155/2013/891748>.
181. Ashok K. Tiwari, Antioxidants: New-generation therapeutic base for treatment of polygenic disorders, *Current Science*, 2004; 86 (8): 1092-1102
182. Weckesser. S., Engel. K., Simon-Haarhaus. B., Wittmer. A., Pelz. K., & Schempp, C.M., Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological relevance. *Phytomedicine*, 2007; 14: 508- 516.
183. Pompilio A, Riviello A, Crocetta V et al., Evaluation of antibacterial and antibiofilm mechanisms by usnic acid against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Future Microbiol* 2016; 11:1315–1338
184. Valadbeigi T., Chemical Composition and Enzymes Inhibitory, Brine Shrimp Larvae Toxicity, Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Caloplaca biatorina*, *Zahedan J Res Med Sci*. 2016; 18(11):e4267
185. ***American Cancer Society, „What are the key statistics about oral cavity and oropharyngeal cancers” www.cancer.org/cancer/oralcavityandoropharyngealcancer/detailedguide/oral-cavity-and-oropharyngeal-cancer-key-statistics. Accesat, noiembrie 2018.
186. Ozdemir, D., Dental caries: The most common disease worldwide and preventiv strategies, *Int. J. Microbiol. Res. Rev.*, 2017; 6 (5): 340-344
187. Saeed M, Sattari M, Yeganeh F, Sarira Shahnavaz, Correlation between Gingival Expression of STAT1 and Chronic Periodontitis, *Int J Dentistry Oral Sci*. 2015; 2(10), 158-162
188. Olteanu Z., Oprică L., Truță E., Zamfirache M.M., Behaviour of antioxidative enzymes and of soluble protein in wheat seedlings after lead-induced stress, *Analele științifice ale Universității „Alexandru Ioan Cuza”*, Secțiunea Genetică și Biologie Moleculară, 2011, TOM XII: 75-85.
189. Mates, MJ., et.al, Antioxidant Enzymes and Human Diseases, *Clinical Biochemistry*, 1999; 32 (8): 595-603
190. Somogyi A., Rosta K., Pusztai P., Tulassay Z., Nagy G., Antioxidant measurements, *Physiol. Meas.*, 2007; 28: R41.
191. Antolovich M., Prenzler P.D., Patsalides E., McDonald S., Robards K., Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 2002; 127: 183.
192. Shull S, Heintz NH, Periasamy M, et al. , Differential regulation of antioxidant enzymes in response to oxidants. *J Biol Chem* 1991; 266: 24398–24403.
193. Amzoïu DC et al, Blood superoxide dismutase activity in patients with knee osteoarthritis, *Farmacia*, 2014; 62 (3): 460-466
194. Perry JJP, Shin DS, Getzoff ED, Tainer JA., The structural biochemistry of the superoxide dismutase, *Biochim. Biophys. Acta*, 2010; 1804: 245-262.
195. Mahmoud Hussein Hadwan, Simple spectrophotometric assay for measuring catalase activity in biological tissues , *Biochemistry* 2018; 19:7 <https://doi.org/10.1186/s12858-018-0097-5>
196. J. Kaushal et al , Catalase Enzyme: Application in Bioremediation and Food Industry. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2018; 16 : 192-199 Available from: <https://www.researchgate.net/publication/327052550> [accessed Jul 14 2019].

197. Glorieux C, Calderon PB., Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach, abstract, Biol Chem., 2017; 398(10):1095-1108.
198. Glorieux C, Calderon PB., Regulation of catalase expression in healthy and cancerous cells., abstract, Free Radic Biol Med., 2015; 87:84-97.
199. Chelikani,P., Fita I.,Loewen, PC, Diversity of structures and properties among catalases. Cellular and Molecular Life Sciences, 2004; 61: 192-208.
200. Nicholls, P., Fita, I., Loewen, PC, Enzymology and structure of catalases. Advances in Inorganic Chemistry, 2001; 51: 51-106.
201. Imlay , JA, Pathways of oxidative damage, Annual Review of Microbiology, 2003; 57:395-418.
202. Veitch NC, Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme, Phytochemistry 2004; 65: 249-259.
203. Azevedo AM, Martins VC, Prazeres DMF, Vojinović V, Cabral JMS, et.al., Horseradish peroxidase: a valuable tool in biotechnology, Biotechnol Ann Rev Elsevier 2003; 9: 199-247.
204. Shivakumar, A, et.al., Role of Peroxidase in Clinical Assays: A Short Review, Journal of Clinical Nutrition & Dietetics, 2017; 3 (2): 14
205. Pandey VP, Awasthi M, Singh S, Tiwari S, Dwivedi UN, A Comprehensive Review on Function and Application of Plant Peroxidases, Biochem Anal Biochem, 2017; 6: 308.
206. Bernroither M, Zamocky M, Furtmeuller PG, Peschek GA, Obinger C , Occurrence, phylogeny, structure, and function of catalases and peroxidases in cyanobacteria. J Exp Bot , 2009; 60: 423-440.
207. Shigeoka S, Ishikawa T, Tamoi M, Miyagawa Y, Takeda T, et al., Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. J Exp Bot , 2002; 53: 1305-1319.
208. Wang,Y., Branicky,R., Noë, A. and Hekimi,S., Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling, J. Cell Biol. 2018; 217 (6) 1915-1928
209. Bania, I., Mahanta, R., Evaluation of peroxidases from various plant sources, International Journal of Scientific and Research Publications, 2012; 2 (5)
210. Zeenat Ayoub, Z., Mehta, A., Mishra,S.K., Ahirwal, L., Medicinal Plants as Natural Antioxidants: A review, Journal of Botanical Society, 2017;.48, ISSN 2229-7170
211. Mates, M.J.,et.al., Antioxidant Enzymes and Human Diseases, Clinical Biochemistry, 1999; 32 (8): 595-603
212. Nagar, A., Sharma, V., & Chhipa, A. S. , Role of antioxidants in biological system, a review, Mintage Journal of Pharmaceutical&Medical Sciences , 2017; 6(1): 7-12.
213. Zahin, M., Aqil, F., & Ahmad, I. , The in vitro antioxidant activity and total phenolic content of four Indian medicinal plants.International Journal of pharmacy and pharmaceutical Sciences, 2009; 1(1): 88-95
214. Haffajee, A. D. , Socransky, S. S., Patel, M. R. , Song,X., “Microbial complexes in supragingival plaque,” Oral Microbiology and Immunology, 2008; 23 (3) 196-205
215. Dosseva-Panova,VT, Popova, CL, Panov, VE, Subgingival microbial profile and production of proinflammatory cytokines in chronic periodontitis, Folia Medica, 2014; 56. (3), 152-160
216. Kumar PS, Leys EJ, Bryk JM, Martinez FJ, Moeschberger ML, Griffen AL. Changes in periodontal health status are associated with bacterial community shifts as assessed by quantitative 16S cloning and sequencing. J Clin Microbiol. 2006 Oct;44(10):3665-3673.

217. Griffen AL, Beall CJ, Campbell JH, Firestone ND, Kumar PS, Yang ZK, Podar M, Leys EJ. Distinct and complex bacterial profiles in human periodontitis and health revealed by 16S pyrosequencing. ISME J. 2012;6(6):1176-1185.
218. Ananthi,R.,Tinabaye,A.,Selvaraj,G., Antioxidant study of usnic acid and its derivative usnic acid diacetate, IJRET: International Journal of Research in Engineering and Technology, 2015; 4(2), eISSN: 2319-1163 | pISSN: 2321-7308
219. Minić I, Pejčić A., Oral Cancer, Incidence and Management, J Oral Cancer Res. 2018; 2(1):23-27
220. El-Naggar AK, Chan J, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ., WHO Classification of Head and Neck Tumours. Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC); 2017.
221. Tanaka TI, Alawi F. Human Papillomavirus and Oropharyngeal Cancer. Dent Clin North Am 2018;62:111-120.
222. Perks, A., Forna, D., Barreira, E., Forna, N., Fricain, J.C., et al, Oral Cancer Prevention., Workshop on Prevention of Oral Cancer in Romania 2019. <https://www.researchgate.net/publication/332858570> [accessed Jul 16 2019].
223. Chaturvedi, P., Singh, A., et al., Tobacco related oral cancer, BMJ 2019; 365:l2142 doi: 10.1136/bmj.l2142
224. Bucur, A., et. al., Compendiu de chirurgie oro-maxilo-facială - Vol 2., Q Med Publishing, Bucuresti, 2009, ISBN 978-973-88553-7-3
225. Bucur, A. et al., Ghid de practică în chirurgia oro-maxilo-facială, 2010
226. Flint PW, Haughey BH, Lund VJ, et al, eds. Cummings Otolaryngology, Head & Neck Surgery, Fifth Edition, ed. Philadelphia, PA: Mosby Elsevier, Copyright ©2010
227. Leela K, Devi A. C. Isolation, Purification and Application of Secondary Metabolites from Lichen *Parmelia Perlata*. Biosci Biotech Res Asia 2017;14(4).
228. Malíček, J., Bouda, F., Liška,J., Palice, Z.,& Peksa,O., Contribution to the lichen biota of the Romanian Carpathians, Herzogia 2015; 28 (2) : 713-735
229. Vicol, I. - Preliminary Study On Epiphytic Lichens As An Indicator Of Environmental Quality In Forests From Around Bucharest Municipality (Romania), Analele Universității din Oradea - Fascicula Biologie, 2010; Tom. XVII / 1 : 200-207
230. Christensen N.S., Lichens of *Picea abies* forests in Greece, Herzogia , 2018; 31 (1): 219-230
231. Tõrra T. and Randlane, T., The lichen genus *Usnea* (lichenized *Ascomycetes*, *Parmeliaceae*) in Estonia with a key to the species in the Baltic countries, The Lichenologist, 2007, 39(45): 415-438
232. Nascimbene, J., Marini, L., Motta, R. & Nimis, P. L. Influence of tree age, tree size and crown structure on lichen communities in mature Alpine spruce forests, Biodiversity and Conservation, 2009; 18: 1509-1522.
233. Bucur, L., Istudor, V., Sava, C., Jianu, L., Vameșu, S., Analiza farmacognostică, instrument de determinare a identității, purității și calității produselor vegetale, Editura Ovidius University Press, Constanța, 2002: 52-56
234. *** European Pharmacopoeia 9.0 Edition, Volume 1, EDQM Council of Europe, Strassbourg, 2017;
235. ***Romanian Pharmacopoeia, X ed. Medicală, Publishing house, Bucharest, 1993; (available in Romanian).

236. *** United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 30-NF 25), Rockville, Md, United States Pharmacopeia Convention, 2007; 28
237. ***WHO monographs on selected medicinal plants - 2007, Vol. 3.
238. *** WHO monographs on selected medicinal plants – 2014, Vol. 2.
239. Yang, M., Wang, X., Liu, D. et al., Evaluation of edible and medicinal lichen resources in China, *Mycosystema* , 2018; 37(7): 819-837
240. Pandey, N., Pandey-Rai S., Biochemical Activity and Therapeutic Role of Antioxidants in Plants and Humans, in book *Plants as a Source of Natural Antioxidants* (ed. N.K. Dubey) CAB International 2015; chapter X : 191-224
241. Plsíková J.et al., Lichen secondary metabolites as DNA-interacting agents, *Toxicology in Vitro*, 2014; 28: 182–186
242. Cardarelli, M., Serino, G., Campanella, L., Ercole, P., De Cicco-Nardone, F., Alesiani, O., Rossiello, F., Antimitotic effects of usnic acid on different biological systems. *Cell. Mol. Life Sci.*, 1997; 53: 667–672.
243. Russo A, Piovano M, Lombardo L, Garbarino J, Cardile V. 2008.Lichen metabolites prevent UV light and nitric oxide-mediated plasmid DNA damage and induce apoptosis in human melanoma cells, *Life Sci* 2008; 83: 468-474
244. Brisdelli, F. et al, Cytotoxic Activity and Antioxidant Capacity of Purified Lichen Metabolites: An In Vitro Study, *Phytother. Res.*, 2012; DOI: 10.1002/ptr.4739
245. De Carvalho, EAB et al., Effect of usnic acid from the lichen *Cladonia substellata* on *Trypanosoma cruzi*, in vitro: an ultrastructural study, *Micron* , 2005; 36: 155–161
246. Zovko M, Kosalec I, Kalodjera Z, Partl A, Pepeljnjak S., Characteristics, chemistry and use of lichens, *Farm Glasnik (Croatia)* 2007; 63:227-243.
247. Blanquer-Rosselló, M. Hernández-López, R. RocaJordi, P. AdamoValle, O., Resveratrol induces mitochondrial respiration and apoptosis in SW620 colon cancer cells, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 2017; 1861(2): 431-440
248. McGahon AJ, Martin SJ, Bissonnette RP, et al., The end of the cell line: methods for the study of apoptosis in vitro, *Methods Cell Biol*, 1995; 46: 153-185.
249. Boustie JB, Tomasi S, Grube M. 2011. Bioactive lichen metabolites: alpine habitats as an untapped source, *Phytochem Rev* , 2011; 10: 287-307
250. Thirunalasundari et al., Evaluation of antioxidant activity among the epiphytic lichens of Kodaikanal, *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2017; 6(11): 828-841
251. Ullah A. et al., Biological evaluation, characterization and distribution of some lichens of Himalayan region, Pakistan, *Journal of Animal and Plant Sciences*, 2015; 25(3):580-586
252. Shukla P., Upreti D.K., Tewari L.M., Secondary metabolite variability in Lichen genus *Usnea* in India: A potential source for bioprospection, *Journal Of Environmental Science and Technology* 2015, 2(4): 44-55
253. *** EMEA, ICH Topic Q 2 (R1)/ CPMP/ICH/381/95, 1995, p.13
254. Conti, M., Pino, A. , Botre, `F. , Bocca, B. , Alimonti, A., Lichen *Usnea barbata* as biomonitor of airborne elements deposition in the Province of Tierra del Fuego (southern Patagonia, Argentina), *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2009, 72: 1082-1089

255. Carreras, H.A., Pignata, M.L., Biomonitoring of heavy metals and air quality in Cordoba City, Argentina, using transplanted lichens. Environ. Pollut., 2002; 117: 77-87
256. Conti, M.E., Tudino, M.B., Stripeikis, J., Cecchetti, G., 2004. Heavy metal accumulation in the lichen *Evernia prunastri* transplanted at urban, rural and industrial sites in Central Italy. J. Atmos. Chem., 2004; 49: 83-94
257. Bargagli, R., Nimis, P.L., Guidelines for the use of epiphytic lichens as biomonitors of atmospheric deposition of trace elements. In: NATO Science Series, IV: Earth and Environmental Sciences, 2002; 7: 295-299.
258. Freitas, M.C., Pacheco, A.M.G., Bioaccumulation of Cobalt in *Parmelia sulcata*, J. Atmos. Chem., 2004; 49: 67-82.
259. Golubev, A.V., Golubeva, V.N., Krylov, N.G., Kuznetsova, V.F., Mavrin, S.V., Aleinikov, A.Yu., Hoppes, W.G., Surano, K.A., On monitoring anthropogenic airborne uranium concentrations and ²³⁵U/²³⁸U isotopic ratio by lichen-bio-indicator technique. J. Environ. Radioact. 2005; 84: 333-342.
260. Ekor, M., The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety, Frontiers in pharmacology, 2013; 4
261. Basnet et al., Diversity of Anticancer and Antimicrobial Compounds from Lichens and Lichen derived Fungi: A Systematic Review (1985-2017), Current Organic Chemistry, 2018; 22: 1-14
262. Ingolfssdottir K., Molecules of interest: usnic acid, Phytochemistry, 2002; 61: 729-736.
263. Kristmundsdottir T, Aradottir HA, Ingolfssdottir K et al., Solubilization of the lichen metabolite usnic acid for testing in tissue culture. Pharm Pharmacol, 2002; 54: 1447-1452
264. Dumitrascu, M., *Artemia salina*, Balneo-Research Journal, 2011; 2 (4) 11-14
265. S. Michael, S., Thompson, GC et al, *Artemia salina* as a Test Organism for Bioassay, Science, 1956; 123 (3194) : 464
266. Bruno S. Nunes & all., Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. Environmental pollution 2006; 144: 453-462.
267. Dvořák P., Žďárský M., Beňová K., Possibilities of alternative generation II biotests at *Artemia*. Interdisc Toxicol., 2009; 2: 45-47.
268. Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnam, J. E., Jacobsen, L. B., Nichols, D. E. and McLaughlin, J. L. , Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. Planta Medica 1982; 45: 31-34.
269. Michael, A. S., Thompson, C. G., Abramovitz, M., *Artemia salina* as a test organism for bioassay. Science, 1956; 123: 464.
270. Solý's, P. N., Wright, C. W., Anderson, M. A., Gupta, M. P. and Phillipson, J. D. (1993). A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp). Planta Med. 1993; 59: 250-252.
271. Togulca, M. -The Short-Term Toxicity of Two Toxicants to *Artemia Nauplii*, Tr. J. of Zoology. 1998; 22: 259-266.
272. Mohammad Abu Basma Rajeh, Yuet Ping Kwan, Zuraini Zakaria, Lachimanan Yoga Latha, Subramanion L Jothy, Sreenivasan Sasidharan - Acute toxicity impacts of *Euphorbia hirta* L. extract on behavior, organs body weight index and histopathology of organs of the mice and *Artemia salina*, Pharmacognosy Research, 2012, 4 (3)

273. Milhem MM, Al-Hiyasat AS, Darmani H. Toxicity testing of restorative dental materials using brine shrimp larvae (*Artemia salina*). J Appl Oral Sci 2008; 16:297-301.
274. Sahgal G, Ramanathan S, Sasidhara S, Mordi M, Ismail S, Mansor SM. Brine shrimp lethality and acute oral toxicity studies on *Swietenia mahagoni* (Linn.) Jacq. Seed methanolic extract., Phcog Res 2010; 2:215-20.
275. Solis PN, Wright CW, Anderson MM, Gupta MP, Phillipson JD., A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina*. Planta Med 1993; 59:250 Prior MG. Evaluation of brine shrimp Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory compounds from (*Artemia salina*) larvae as a bioassay for mycotoxins in animal feed stuffs, J Comp Med 1979; 43:352-355.
276. Harwig J, Scott P. Brine shrimp (*Artemia salina* L.) larvae as a screening system for fungal toxins, Appl Microbiol , 1971;21:1011-1016.
277. Rabelo TK, Zeidán-Chuliá F, Paulo Almeida JP ,et.al. Redox characterization of usnic acid and its cytotoxic effect on human neuron-like cells (SH-SY5Y), / Toxicology in Vitro 2012; 26: 304-314
278. Paudel B. et al, Antioxidant, Antibacterial activity and Brine shrimp toxicity test of some Mountainous Lichens from Nepal, Biol Res, 2012; 45(4), 387-391
279. Ravagliaa, LM, Gonçalvesa, K., Oyamaa,NM, Coelhoa,RG, Spielmannband AA, Hondaa,NK, In vitro radical-scavenging activity, toxicity against *A. salina*, and Nmr profiles of extracts of lichens collected from Brazil and Antarctica, Quim. Nova, 2014; 37, (6) 1015-1021.
280. Martins,M., Silva, M., Silva, L., Lima,V., Pereira,E., Falcão, EP, Melo, A., Henrique da Silva, N., Usnic Acid Potassium Salt: An Alternative for the Control of *Biomphalaria glabrata*, PLoS One. 2014; 9(11)
281. Veeramani T., Santhanam P., Manickam N., Rajthilak C., Introduction to *Artemia* Culture. 2019; (In: Santhanam P., Begum A., Pachiappan P. (eds) Basic and Applied Zooplankton Biology, Springer, Singapore)
282. ***ATCC, Product Sheet CAL 27 (ATCC® CRL-2095™)
283. Jiang L1, Ji N, Zhou Y, Li J, Liu X, Wang Z, Chen Q, Zeng X., CAL 27 is an oral adenosquamous carcinoma cell line, Oral Oncol. 2009 Nov;45(11):e204-7.
284. Mayorga, P., Pérez, K.R.; Cruz, S.M.; Cáceres, A., Comparison of bioassays using the anostracan crustaceans *Artemia salina* and *Thamnocephalus platyurus* for plant extract toxicity screening, Rev. bras. farmacogn.2010; 20 (6); <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2010005000029>
285. Mosmann T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival; application to proliferation and cytotoxicity assays, Journal of Immunological methods, 1983; 65:55-63.
286. Stockert J.C., Blazquez-Castro, A., Canete, M., Horobin ,R.W., Villanueva, A., MTT assay for cell viability: intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. Acta Histochem. 2012; 114: 785-796.
287. Alexandrino, C.A. et al, Antitumor effect of depsidones from lichens on tumor cell lines and experimental murine melanoma, Revista Brasileira de Farmacognosia, 2019; <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2019.04.005>
288. Nasri, H.; Bahmani, M.; Shahinfard, N.; Nafchi, A.M.; Saberianpour, S.; Kopaei, M.R. Medicinal plants for the treatment of acne vulgaris: A review of recent evidences. Jundishapur J. Microbiol. 2015, 8, e25580.

289. Karalti, I., Çobanoğlu, G., et al., Evaluation of antimicrobial activity of the lichens *Physcia aipolia*, *Xanthoria parietina*, *Usnea florida*, *Usnea subfloridana* and *Melanohalea exasperata*, *Modern Phytomorphology*, 2016; 10: 19-24
290. Emsen B, Aslan A, Turkez H, Taghizadehghalehjoughi AT, Kaya A. The anti-cancer efficacies of diffractaic, lobaric, and usnic acid: In vitro inhibition of glioma. *J Can Res Ther* 2018;14:941-951.
291. Aminian M., Nabatchian F., Vaisi-Raygani A., Torabi M., Mechanism of Coomassie Brilliant Blue G-250 binding to cetyltrimethylammonium bromide: An interference with the Bradford assay. *Analytical Biochemistry*, 2013; 434(2): 287-291.
292. Ari F., Aztopal N., Oran S., Bozdemir S., Celikler S., Ozturk S., Ulukaya E. *Parmelia sulcata* Taylor and *Usnea filipendula* Stirt induce apoptosis-like cell death and DNA damage in cancer cells. *Cell Prolif*, 2014; 47: 457-64.
293. Artenie V., Ungureanu E., Negură Anca Mihaela, Metode de investigare a metabolismului glucidic și lipidic, 2008; Editura Pim, Iași: 97-99, 100-102, 108-110.
294. Bačkorová M., Jendželovský R., Kello M., Bačkor M., Mikeš J., Fedoročko P. 2012. Lichen secondary metabolites are responsible for induction of apoptosis in HT-29 and A2780 human cancer cell lines, *Toxicol in Vitro*, 2012; 26: 462-68.
295. Bacso Z., Everson R.B., Eliason J.F., The DNA of Annexin V-binding apoptotic cells is highly fragmented., *Cancer Res*, 2000; 60: 4623-4628.
296. Bazin M.A., Le Lamer A.C., Delcros J.G., Rouaud I., Uriac P., Boustie J., Corbel J.C., Tomasi S., Synthesis and cytotoxic activities of usnic acid derivatives. *Bioorg Med Chem*, 2008; 16: 6860-6.
297. Postelnicu T., Probit Analysis, in Lovric M. (eds) *International Encyclopedia of Statistical Science*, 2011; Springer, Berlin, Heidelberg, https://doi.org/10.1007/978-3-642-04898-2_461
298. Brandão L.F., Alcantara G.B., Matos M.F.C., Bogo D., Freitas D.S., Oyama N.M., Honda N.K., Cytotoxic Evaluation of Phenolic Compounds from Lichens against Melanoma Cells. *Chem Pharm Bull*, 2013; 61: 176-83.
299. Brisdelli F., Perilli M., Sellitri D., Piovano M., Garbarino J.A., Nicoletti M., Bozzi A., Amicosante G., Celenza G., Cytotoxic activity and antioxidant capacity of purified lichen metabolites: an in vitro study. *Phytother Res.*, 2013; 27(3): 431-7.
300. Bugni T.S., Andjelic C.D., Pole A.R., Rai P., Ireland C.M., Barrows L.R., Biologically active components of a Papua New Guinea analgesic and anti-inflammatory lichen preparation. *Fitoterapia*, 2009; 80: 270-273.
301. Chen S., Dobrovolsky V.N., Liu F., Wu Y., Zhang Z., Mei N, Guo L., The role of autophagy in usnic-acid induced toxicity in hepatic cells. *Toxicol Sci*, 2014; 14: 33-40
302. Darzynkiewicz Z., Bruno S., Del Bino G., Gorczyca W., Hotz M.A., Lassota P., Traganos F., Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry*, 1992; 13, 795-808.
303. Disoma C., Erkisa M., Oran S., Alioglu I., Ulukaya E. Ari F., *Usnea filipendula* Induces Apoptosis in Human Colon Cancer Cell Lines. *Indian J Pharm Sci*, 2018;80(6): 1078-1085.
304. Fernández-Moriano C., González-Burgos E., Divakar P.K., Crespo A., Gómez-Serranillos M.P. , Evaluation of the Antioxidant Capacities and Cytotoxic Effects of Ten Parmeliaceae Lichen Species. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2016; <http://dx.doi.org/10.1155/2016/3169751>.
305. Fried J., Perez A.G., Clarkson B.D., Flow cytofluorometric analysis of cell cycle distributions using

- propidium iodide. Properties of the method and mathematical analysis of the data. J Cell Biol 1976; 71, 172-181.
306. Kasimoğullari S.C., Oran S., Ari F., Ulukaya E., Aztopal N., Sarimahmut M., Öztürk Ş. Genotoxic, cytotoxic, and apoptotic effects of crude extract of *Usnea filipendula* Stirt. in vitro. Turk J Biol, 2014;38: 940-47.
307. Mayer M., O'Neill M.A., Murray K.E., Santos- Magalhães N.S., Carneiro- Leão A.M., Thompson A.M., Appleyard V.C. 2005. Usnic acid: a nongenotoxic compound with anti-cancer properties. Anticancer Drugs,2005; 16: 805-9.
308. Nguyen T.T., Yoon S., Yang Y., Lee H.B., Oh S., Jeong M.H., Kim J.J., Yee S.T., Crişan F., Moon C., Lee K.Y., Kim K.K., Hur J.S., Kim H., Lichen secondary metabolites in *Flavocetraria cucullata* exhibit anti-cancer effects on human cancer cells through the induction of apoptosis and suppression of tumorigenic potentials. PloS One, 2014; 9:e111575.
309. Perveen S. and Al-Taweel M., Phenolic Compounds from the Natural Sources and Their Cytotoxicity, 2017; in Phenolic Compounds - Natural Sources, Importance and Applications, Marcos Soto-Hernandez, Mariana Palma-Tenango and Maria del Rosario Garcia-Mateos, IntechOpen, DOI: 10.5772/66898.
310. Pereira C.G., Meireles M.A.M. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: fundamentals, applications and economic perspectives. Food Bioprocess Technol., 2010; 3: 340-372.
311. Pozarowski P., Grabarek J., Darzynkiewicz Z. , Flow Cytometry of Apoptosis. In Current Protocols in Cytometry, (Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.), 2003; Chapter 7, Unit 7.19.
312. Rieger A.M., Nelson K.L., Konowalchuk J.D., Barreda D.R., Modified Annexin V/Propidium Iodide Apoptosis Assay For Accurate Assessment of Cell Death. J. Vis. Exp., 2011; 50, e2597.
313. Scandalios, J.G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defences. Braz. J. Med. Biol. Res., 2005; 38: 995-1014.
314. Momoh M.A, Adikwu M.U., Evaluation of the effect of colloidal silver on the antibacterial activity of ethanolic extract of the lichen *Parmelia perlata*. Afri J Pharm and Pharmacol. 2008;2(6):106-109.
315. Su Z.Q., Mo Z.Z., Liao J.B., Feng X.X., Liang Y.Z., Zhang X., Liu Y.H., Chen X.Y., Chen Z.W., Su Z.R., Lai X.P., Usnic acid protects LPS-induced acute lung injury in mice through attenuating inflammatory responses and oxidative stress. International Immunopharmacology, 2014; 22(2): 371-378.
316. Laville N., Aït-Aïssa S., Gomez E., Casellas C., Porcher J.M., Effects of human pharmaceuticals on cytotoxicity, EROD activity and ROS production in fish hepatocytes. Toxicology,2004, 196(1-2): 41-55.
317. Benson H.J. , Microbiological Applications. A Laboratory Manual în General Microbiology, Published by WCB Publishers, 1990, 53
318. Stockert J.C., Blazquez-Castro A., Canete M., Horobin R.W., Villanueva A., MTT assay for cell viability: intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. Acta Histochem., 2012; 114, 785e796.
319. Cann A.J. - Maths from scratch for biologists. Jon Willey & Sons Ltd.2002
320. Vermes I., Haanen C., Reutelingsperger,C. 2000. Flow cytometry of apoptotic cell death. J Immunol Methods, 2000; 243, 167-190.

321. Vermes I., Haanen C., Steffens-Nakken H., Reutelingsperger C., A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labeled Annexin V. *J Immunol Methods*, 1995; 184, 39-51.
322. Walsh J.G., Cullen S.P., Sheridan C., Lüthi A.U., Gerner C. Martin SJ. Executioner caspase-3 and caspase-7 are functionally distinct proteases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008;105: 12815-19.
323. Nguyen V.K. et. al, Synthesis and cytotoxic evaluation of usnic acid benzyldiene derivatives as potential anticancer agents, *Natural Product Research*, 2019; DOI: 10.1080/14786419.2019.1639176
324. Aminian M., Nabatchian F., Vaisi-Raygani A., Torabi M. 2013. Mechanism of Coomassie Brilliant Blue G-250 binding to cetyltrimethylammonium bromide: An interference with the Bradford assay. *Analytical Biochemistry*, 2013; 434(2): 287-291.
325. Antolovich M., Prenzler P.D., Patsalides E., McDonald S., Robards K. 2002. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 2002; 127: 183.
326. Hussain M ,Masood S.R, farooq U , Bakhsh H ,Majeed A and Aziz A. In vitro Antimicrobial Potential of Lichen (*Parmelia perlata*) against different Pathogenic Microbes. *International Journal of Pharma Sciences*. 2014;4(4):666-670
327. Talmaç, AC&Çalışır M, Antioxidants and Periodontal Diseases, 2019; DOI: 10.5772/intechopen.81815
328. Bačkorová M., Jendželovský R., Kello M., Bačkor M., Mikeš J., Fedoročko P. Lichen secondary metabolites are responsible for induction of apoptosis in HT-29 and A2780 human cancer cell lines. *Toxicol in Vitro*, 2012; 26: 462-68.
329. Bacso Z., Everson R.B., Eliason J.F., The DNA of Annexin V-binding apoptotic cells is highly fragmented. *Cancer Res* 2000; 60, 4623-4628.
330. Bazin M.A., Le Lamer A.C., Delcros J.G., Rouaud I., Uriac P., Boustie J., Corbel J.C., Tomasi S. Synthesis and cytotoxic activities of usnic acid derivatives. *Bioorg Med Chem*, 2008; 16: 6860-6866.
331. Behera B.C., Verma N., Sonone A., Makhija U. Antioxidant and antibacterial activities of lichen *Usnea ghattensis* in vitro. *Biotechnol Lett.*, 2005; 27: 991-995.
332. Brandão L.F., Alcantara G.B., Matos M.F.C., Bogo D., Freitas D.S., Oyama N.M., Honda N.K. Cytotoxic Evaluation of Phenolic Compounds from Lichens against Melanoma Cells. *Chem Pharm Bull*, 2013; 61: 176-83.
333. Brisdelli F., Perilli M., Sellitri D., Piovano M., Garbarino J.A., Nicoletti M., Bozzi A., Amicosante G., Celenza G., Cytotoxic activity and antioxidant capacity of purified lichen metabolites: an in vitro study. *Phytother Res.*, 2013; 27(3): 431-7.
334. Bugni T.S., Andjelic C.D., Pole A.R., Rai P., Ireland C.M., Barrows L.R. Biologically active components of a Papua New Guinea analgesic and anti-inflammatory lichen preparation. *Fitoterapia*, 2009; 80: 270-273.
335. Chen S., Dobrovolsky V.N., Liu F., Wu Y., Zhang Z., Mei N, Guo L., The role of autophagy in usnic-acid induced toxicity in hepatic cells. *Toxicol Sci*, 2014; 14: 33-40.
336. Darzynkiewicz Z., Bruno S., Del Bino G., Gorczyca W., Hotz M.A., Lassota P., Traganos F., Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry* , 1992; 13, 795-808.
337. Disoma C., Erkisa M., Oran S., Alioglu I., Ulukaya E. Ari F. *Usnea filipendula* Induces Apoptosis in Human Colon Cancer Cell Lines. *Indian J Pharm Sci*, 2018; 80(6): 1078-1085.

338. Fried J., Perez A.G., Clarkson B.D., Flow cytofluorometric analysis of cell cycle distributions using propidium iodide. Properties of the method and mathematical analysis of the data. *J Cell Biol*, 1976; 71, 172-181.
339. Liou G.I., Storz P., Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic Res.*, 2010;44(5): 1-31.
340. Nguyen T.T., Yoon S., Yang Y., Lee H.B., Oh S., Jeong M.H., Kim J.J., Yee S.T., Crişan F., Moon C., Lee K.Y., Kim K.K., Hur J.S., Kim H., Lichen secondary metabolites in *Flavocetraria cucullata* exhibit anti-cancer effects on human cancer cells through the induction of apoptosis and suppression of tumorigenic potentials. *PloS One*, 2014; 9:e111575.
341. Olteanu Z., Oprică L., Truţă E., Zamfirache M.M. , Behaviour of antioxidative enzymes and of soluble protein in wheat seedlings after lead-induced stress *Analele ştiinţifice ale Universităţii „Alexandru Ioan Cuza”, Secţiunea Genetică şi Biologie Moleculară*, 2011, TOM XII: 75-85.
342. Pereira C.G., Meireles M.A.M. , Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: fundamentals, applications and economic perspectives. *Food Bioprocess Technol.*, 2010; 3: 340-372.
343. Pozarowski P., Grabarek J., Darzynkiewicz Z., Flow Cytometry of Apoptosis. In *Current Protocols in Cytometry*, (Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.), 2003; Chapter 7, Unit 7.19.
344. Rieger A.M., Nelson K.L., Konowalchuk J.D., Barreda D.R. Modified Annexin V/Propidium Iodide Apoptosis Assay For Accurate Assessment of Cell Death. *J. Vis. Exp.*, 2011; 50, e2597.
345. Scandalios, J.G. 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defences. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 2005; 38: 995-1014.
346. Somogyi A., Rosta K., Pusztai P., Tulassay Z., Nagy G., Antioxidant measurements, *Physiol. Meas.*, 2007; 28: R41.
347. Su Z.Q., Mo Z.Z., Liao J.B., Feng X.X., Liang Y.Z., Zhang X., Liu Y.H., Chen X.Y., Chen Z.W., Su Z.R., Lai X.P. 2014. Usnic acid protects LPS-induced acute lung injury in mice through attenuating inflammatory responses and oxidative stress. *International Immunopharmacology*, 2014; 22(2): 371-378.
348. Vermes I., Haanen C., Reutelingsperger, C., Flow cytometry of apoptotic cell death. *J Immunol Methods* 2000; 243, 167-190.
349. Vermes I., Haanen C., Steffens-Nakken H., Reutelingsperger C., A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labeled Annexin V. *J Immunol Methods* 1995; 184, 39-51.
350. Walsh J.G., Cullen S.P., Sheridan C., Lüthi A.U., Gerner C. Martin SJ. Executioner caspase-3 and caspase-7 are functionally distinct proteases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008., 105: 12815-19.
351. Rieger A.M., Nelson K.L., Konowalchuk J.D., Barreda D.R., Modified Annexin V/Propidium Iodide Apoptosis Assay For Accurate Assessment of Cell Death. *J. Vis. Exp.* 2011; (50), e2597, doi:10.3791/2597.
352. Yang W. et al., Genomics of Drug Sensitivity in Cancer (GDSC): a resource for therapeutic biomarker discovery in cancer cells (Database issue), *Nucl. Acids Res.* 2013, 41 (1): 955-961
353. Einarsdóttir E. et al Cellular Mechanisms of the Anticancer Effects of the Lichen Compound Usnic Acid, *Planta Med* 2010; 76(10): 969-974
354. Hosseini Mehr S.J., Rostamnezad M., Ghafari-rad, V.. Epicatechin Enhances Anti-Proliferative Effect of Bleomycin in Ovarian Cancer Cell. *Res Mol Med.* 2013; 1 (3): 25-28.

355. Wang Z., Methotrexate induces DNA damage and inhibits homologous recombination repair in choriocarcinoma cells, *OncoTargets and Therapy* 2016;9 7115–7122
356. Costantini, D., et al, Methotrexate, Paclitaxel, and Doxorubicin Radiosensitize HER2 Amplified Human Breast Cancer Cells to the Auger Electron-Emitting Radiotherapeutic Agent ¹¹¹In-NLS-Trastuzumab, *J Nucl Med* 2010; 51:477–483
357. Kern S. et al, Combined antitumoral effects of pretubulysin and methotrexate, *PSP* 2019, 1, 2460
358. Bundesanzeiger (BAnz), Monographien der Kommission E (Zulassungs- und Aufbereitungskommission am BGA für den humanmed. Bereich, phytotherapeutische Therapierichtung und Stoffgruppe), 1998; Kln: Bundesgesundheitsamt (BGA)
359. The Homeopathic Pharmacopoeia of the United States (HPUS). 1992. Arlington, VA: Pharmacopoeia Convention of the American Institute of Homeopathy.
360. Summers, A. 1998. Ethnobotany of Some Common Lichens of Northern California. Rohnert Park, CA: Unpublished paper prepared for Mycology Biology 339 Course, 1998; Sonoma State University.
361. Balasubramanian M. & Nirmala, P., Evaluation of antioxidant properties of Foliose lichens, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 2014, 6(9):177-184
362. Eryilmaz, I.E., Guney Eskiler, G., Egeli, U. et al., In vitro cytotoxic and antiproliferative effects of usnic acid on hormone-dependent breast and prostate cancer cells. *J Biochem Mol Toxicol.* 2018; e22208: 01-08
363. Cronstein, BM, The Mechanism of action of Methotrexate, *Rheumatic Disease Clinics of North America*, 1997; 23(4): 739-755
364. Longley, BD, et al, 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies, *Nature Reviews Cancer*, 2003; 3: 330–338
365. Dorr RT, Bleomycin pharmacology: mechanism of action and resistance, and clinical pharmacokinetics, *Semin Oncol.* 1992;19(2):3-8.
366. Wendakoon C., Calderon P., Gagnon D., Evaluation of Selected Medicinal Plants Extracted in Different Ethanol Concentrations for Antibacterial Activity against Human Pathogens. *J Med Act Pal* 2012, 1, 60-68
367. Nikoli G.S., Zlatkovi S., Nikoli N., Identification and Compatibility of the Major Active Principles in Some New Natural Origin Antiseptics, *Russian Journal of Physical Chemistry A*, 2009; 83,(9): 1612–1616.
368. Kępa, M., Mikłasińska-Majdanik, M., Robert D. Wojtyczka, R.D. et al., “Antimicrobial Potential of Caffeic Acid against *Staphylococcus aureus* Clinical Strains,” *BioMed Research International*, 2018, Article ID 7413504, 9 pages, <https://doi.org/10.1155/2018/7413504>
369. Kozyra, M., Biernasiuk, A., Malm, A., Analysis of phenolic acids and antibacterial activity of extracts obtained from the flowering herbs of *Carduus acantoides* L., *Acta Poloniae Pharmaceutica et Drug Research*, 2017; 74 (1): 161-172
370. Panichayupakaranant, P., Tewtrakul, S., Yuenyongsawad, S., Antibacterial, anti-inflammatory and anti-allergic activities of standardised pomegranate rind extract, *Food Chemistry*, 2010; 123: 400–403
371. Sova M., Antioxidant and antimicrobial activities of cinnamic acid derivatives, *Mini Rev Med Chem.*, 2012; 12(8): 749-767.