



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO

**Empleo del código de barras de ADN para la
identificación de plantas medicinales**

Autor: Alba Jiménez Jiménez

Tutor: Ruth del Prado Millán

Convocatoria: Junio 2018

Resumen

Los productos vegetales con propiedades medicinales se emplean ampliamente tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo. En diversos estudios se ha encontrado que la adulteración y la falsificación, a pesar de los controles de calidad a los que son sometidos, son relativamente frecuentes. Esto se podrá traducir en una menor eficacia del producto y una falta de seguridad, en algunos casos con importantes efectos adversos. Algunos autores han considerado el código de barras de ADN como un medio para solucionar este problema. El código de barras de ADN es una técnica cuyo objetivo es la identificación de especies empleando marcadores moleculares, un locus o combinación de loci consensuados, en el caso de las plantas son las regiones *matK* y *rbL*.

En este trabajo se revisan algunos estudios que evalúan el empleo del código de barras de ADN en la identificación de material vegetal en productos que se encuentran a la venta. Todos los autores la consideraron una técnica prometedora en lo que se refiere a la identificación de especies. Sin embargo, se encontraron algunas dificultades, principalmente la escasez de secuencias de referencia en las bases de datos. Esto significa que todavía hay trabajo por hacer pero si se superan estas dificultades, el código de barras de ADN puede mejorar la seguridad de las plantas medicinales que hay en el mercado.

Palabras clave: código de barras de ADN, plantas medicinales, marcadores moleculares, identificación

Abstract

Medicinal herbal products are widely used in both developed and developing countries. Several studies have found that adulteration or falsification, despite all of the quality controls performed on them, are relatively frequent. This could lead to a loss of efficacy and security for the patient, in some cases causing important adverse effects. Some authors have considered DNA Barcoding as a mean to solve this problem. DNA Barcoding is a technique that aims to species identification based on molecular markers, an agreed upon locus or combination of loci, that for plants are *matK* and *cbL* regions.

In this dissertation I review some studies that assess the use of DNA Barcoding to identify the plant material contained in over-the-counter herbal medicines. All of the authors consider the technique is promising regarding species identification. However, all of them have encountered some difficulties in its application, mainly the lack of reference barcodes found in the database. This means there is still some work to do here but if these difficulties are overcome, DNA Barcoding could improve medicinal plants' safety.

Key words: DNA barcoding, medicinal plants, molecular markers, authentication

Introducción y antecedentes

La demanda de los productos a base de plantas medicinales sigue aumentando día a día en el ámbito internacional, tanto en los países en vías de desarrollo, en los que gran parte de la población confía en este tipo de preparados para tratar diferentes alteraciones, como en los países desarrollados. Se calcula que globalmente este mercado mueve unos 60 mil millones de dólares, cifra que aumenta cada año.

La adulteración, falsificación y sustitución de productos naturales medicinales por otros con un menor valor económico es una práctica bastante frecuente [1]. Se estima que entre el 14 y el 33% de las plantas medicinales, tés o “nutracéuticos” que se encuentran en el mercado podrían incluir una identificación errónea en sus etiquetas [1]. Estas prácticas no solamente suponen un fraude, sino que el uso de especies incorrectas en estos preparados medicinales es una amenaza para la seguridad del paciente, según señala la Organización Mundial de la Salud (OMS). Esta organización ha publicado guías para la regulación y registro de los productos vegetales. [2]

Esta situación ha suscitado una discusión en relación a la calidad de los productos que podemos encontrar en el mercado, muy relacionado con la normativa que lo regula. Estas irregularidades pueden provocar casos de toxicidad aguda debido a la presencia de productos no regulados (como el ácido aristolóquico que produjo varios casos de toxicidad); interacciones con otras plantas o fármacos que esté tomando el paciente (muy conocidos en la hierba de San Juan, *Hypericum perforatum* L.) y la presencia de ingredientes no indicados en el etiquetado podría desencadenar reacciones alérgicas en algunas personas. Además estas prácticas pueden disminuir la confianza del paciente en estos productos ya que estas sustituciones y adulteraciones se traducen en una reducción o desaparición del potencial terapéutico. En la práctica clínica interesa conocer el uso tradicional de estas plantas y relacionarlo con beneficios y eficacia de las preparaciones, datos que no se pueden obtener de forma precisa si la composición varía entre diferentes preparados de una misma planta. [3]

La adulteración se puede llevar a cabo con especies relacionadas con principios activos similares (en algunos casos aceptadas) que engañan a las técnicas tradicionales de autenticación, o puede llevarse a cabo esta adulteración con especies totalmente diferentes que resulten mucho más baratas. También es posible que la adulteración sea accidental debido a los nombres complejos de estas plantas o a una mala identificación en la recolección. En ocasiones nos encontramos con plantas totalmente diferentes con nombres comunes idénticos (en la medicina tradicional china "fang ji" puede referirse tanto a *Stephania tetrandia* como a

Aristolochia fangchi o en el caso de "bei wu jai" puede ser la corteza de *Eleutherococcus gracilistylus* o la especie *Periploca sepium*)[4].

Dentro de la Unión Europea se distinguen dos denominaciones distintas en las que se pueden incluir los preparados a base de plantas. En primer lugar tenemos las plantas medicinales, que se incorporan a la Farmacopea Europea en monografías. En estas monografías se recogen los estándares de calidad que deben cumplir dichos productos y los análisis que se deben llevar a cabo para determinarlos. En el segundo caso las plantas se pueden reconocer como complementos alimenticios. En este segundo caso la regulación la lleva a cabo la EFSA y, aunque se recomienda que cumplan las mismas especificaciones que para las plantas medicinales, la legislación es más laxa en estos casos. No hay una regulación a nivel comunitario sino que depende más de cada país. Además estas consideraciones varían notablemente en los diferentes países, por ejemplo, en Estados Unidos, solamente se regulan como complementos alimenticios.

Un problema importante asociado a la estandarización de las plantas medicinales se debe a la composición compleja y variable de los preparados y a que en ellos se encuentren en forma de plantas enteras, partes de plantas o extractos obtenidos de las mismas. El primer objetivo es conseguir reproducibilidad y una mínima variación interlote [5]. Cada país tiene sus propias pautas para evaluar la calidad de las plantas medicinales en los que se incluyen las buenas prácticas de agricultura y recolección, buenas prácticas de fabricación y buenas prácticas de laboratorio [2].

En nuestro país, para garantizar la calidad de una planta medicinal, los pasos que se deben seguir están contemplados en la Farmacopea y son, a grandes rasgos: identificación de la especie vegetal, análisis de la pureza y confirmación de la presencia y concentración mínima de los metabolitos activos [6].

Los métodos que se usan en la actualidad para controlar la autenticidad de las plantas medicinales se basan en un análisis macroscópico y microscópico del material y en un análisis químico de sus componentes. A la hora de realizar el análisis morfológico se necesita que el personal que lo lleva a cabo esté muy entrenado y tenga una gran experiencia para que se realice correctamente, además de que en ciertas partes de la planta o niveles de desarrollo de la misma no se tienen claves suficientes para una identificación precisa. Por estas razones, aunque estén incluidas en todas las Farmacopeas, estas técnicas están cayendo en desuso.

Por otra parte en el análisis químico de los componentes se utilizan técnicas como la espectroscopía infrarroja, HPLC, espectroscopía de masas, espectroscopía RMN y cromatografía en capa fina. Los componentes químicos varían notablemente en función de

factores externos del crecimiento de la planta y de las condiciones de almacenamiento posterior del material. Además, se pueden falsear los resultados introduciendo en el producto fármacos convencionales o con los marcadores que los productores saben que se van a buscar en estos análisis [7].

Especialmente para la identificación de la especie vegetal que encontramos en el preparado, una determinación basada en técnicas de ADN confiere una mayor confianza porque el ADN es más estable que otras macromoléculas que encontremos en la planta, no varía en función de las condiciones ambientales y se encuentra en cualquier tejido y nivel de desarrollo del individuo analizado. Es por estas razones por las que se ha destacado la necesidad de contar con un método de marcadores de ADN robusto para la identificación de los preparados comerciales. También es importante identificar todos los aditivos que se encuentren en estos preparados ya que podrían tener riesgos potenciales en la salud de los pacientes. En este caso este tipo de técnicas nos servirán para la identificación de aditivos vegetales que no se recojan en el etiquetado del producto.

El código de barras de ADN, entre los métodos moleculares que se han desarrollado, ha sido reconocido como un método robusto, rápido, coste-efectivo y ampliamente aplicable para la identificación de especies [8].

A partir de todo esto, nos podemos preguntar: ¿qué es y en qué consiste exactamente el código de barras de ADN? El código de barras de ADN es una técnica que surge en el año 2003 en la Universidad de Guelph, en Ontario, Canadá, por iniciativa del Dr. Paul Hebert como un método para identificar especies animales, para lo cual se emplea una secuencia corta consensuada del genoma de los organismos. Recibe esta denominación por la similitud que presenta con el *Universal Product Code (UPC)* en el que las barras negras pueden parecer similares pero son únicas y sirven para identificar cada uno de los productos del mercado.[9] Es un método de análisis de ADN cuyo objetivo es distinguir cualquier especie mediante una secuencia diana uniforme para un grupo amplio de organismos y por lo tanto aplicable a cualquier organismo y no solo a un grupo reducido.

El código de barras de ADN se puede emplear en diferentes disciplinas ya que, por definición, debe ser aplicable a cualquier grupo de seres vivos. Algunas de las siguientes están especialmente relacionadas con la identificación de especies vegetales y en algunos casos nos pueden interesar en el estudio de las plantas medicinales [10, 11, 4].

Puede dar una percepción de la taxonomía a nivel de especie y contribuir al proceso taxonómico de definir y delimitar las especies. En general se emplea para identificar individuos desconocidos como especies conocidas. Por lo tanto, es útil para detectar

adulteraciones o sustituciones en productos alimenticios y preparados de plantas medicinales y la identificación de las especies que se incluyen en los mismos. Otra aplicación muy interesante y relacionada con esta es el control del intercambio ilegal de especies en peligro de extinción, tanto de animales como de plantas. En los preparados comerciales se podrían encontrar algunas de estas especies.

Para llevar a cabo análisis de laboratorio de código de barras de ADN, el proyecto BOL (*Barcode of Life*) ha desarrollado protocolos en los que se detalla el procedimiento que se debería seguir [12].

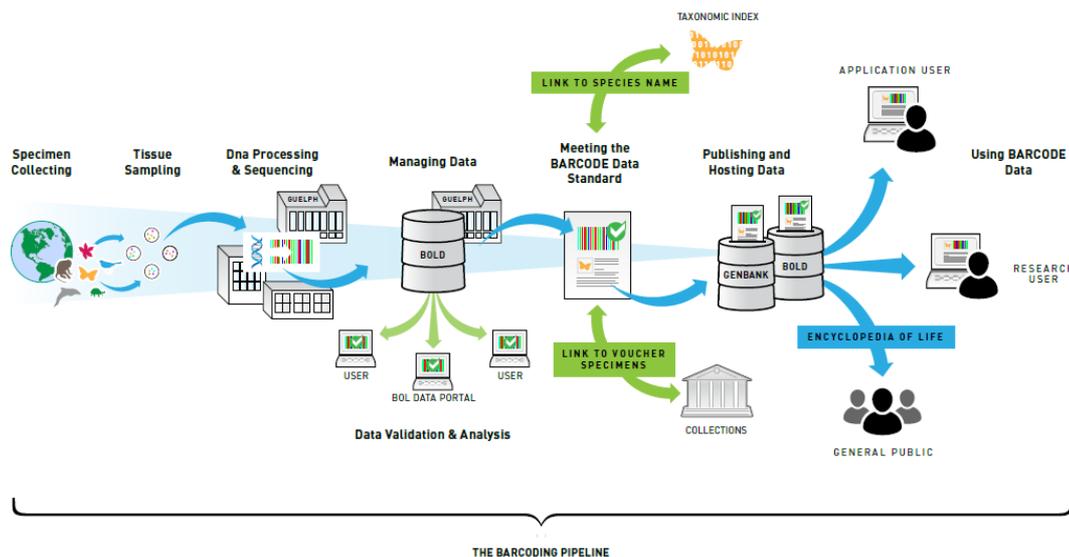


Ilustración 1. Esquema del proceso de Código de Barras de ADN por BOL (*Barcode of Life*)

En primer lugar para el análisis de las muestras se tiene que llevar a cabo la extracción de ADN del material vegetal del que se dispone. Todas las muestras se deben manejar sobre una superficie limpia y todos los instrumentos que se utilicen deben ser esterilizados en autoclave u otro método que resulte pertinente. En un laboratorio en el que se busquen ratios de producción elevados, se debe llevar a cabo todo el proceso de amplificación en placas de 96 pocillos. Se debe tener especial cuidado al cargarlos para evitar la contaminación cruzada entre los pocillos [12].

A continuación se amplifica la secuencia que se ha consensado como marcador mediante una PCR. Aquí surge el primer y principal problema en la utilización del código de barras de ADN en plantas: ¿Qué *loci* podrían ser útiles para la identificación de especies vegetales?

Para seleccionar esta región se deben tener en cuenta tres importantes principios del código de barras de ADN: estandarización, minimalismo y escalabilidad. Esto se traduce en que se debería encontrar uno o unos pocos *loci* que se puedan secuenciar de manera rutinaria en

amplios grupos de muestras y cuyo resultado se pueda comparar para poder diferenciar la especie a la que pertenece cada uno [13, 14].

Cuando se estudia un nuevo marcador se debe evaluar que sea universal y reproducible, es decir, que se encuentre en todas las especies de ese grupo y esté flanqueado por secuencias conservadas para que se pueda amplificar utilizando un solo par de primers; que se desarrollen las reacciones de amplificación y secuenciación bidireccional de manera correcta; que sea capaz de discriminar hasta el nivel de especie y, por último, que el proceso sea coste-efectivo. Idealmente, deberían ser regiones de aproximadamente 500 pares de bases.

En la bibliografía podemos encontrar distintas regiones candidatas y las más empleadas se evaluaron y compararon en un estudio llevado a cabo por el CBOL Plant Working Group en el año 2009 [13]: *rpoC1*, *rpoB*, *atpF-atpH*, *psbK-psbI*, *matK*, *rcbL*, *trnH-psbA*.

rpoC1 y *rpoB* se descartaron porque, aunque se obtuvieron buenos resultados en universalidad y/o calidad de la secuencia, presentaban bajo poder discriminatorio. El espaciador intergénico *atpF-atpH* proporcionó malos resultados en la resolución de especies en códigos de barras *single* y *multilocus* y en la obtención de secuencias bidireccionales de calidad. Por su parte, *psbK-psbI*, otro espaciador intergénico, presentó un buen poder de discriminación, pero de todos se obtuvo el menor éxito en estas pruebas y los mayores problemas para secuenciar regiones bidireccionales. Por estas razones se descartaron todos ellos como marcadores universales.

Los mejores candidatos resultaron ser *matK*, *rcbL* y *trnH-psbA*, aunque ninguno de los tres cumplía los criterios que se les pedía de manera individual.

- ***matK***: maturasina K, es una de las regiones codificantes de los plastos que más rápidamente evoluciona y consistentemente ha demostrado altos niveles de discriminación entre especies. Sin embargo, se requiere todavía un mayor trabajo para que los resultados de la amplificación sean óptimos.
- ***rcbL***: ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa, es el gen mejor caracterizado y gracias a mejoras en los diseños de los primers es el que mejor se ha recuperado en plantas terrestres y es adecuado para la recuperación de secuencias bidireccionales de alta calidad. No es la región más variable, por lo que se utilizaría solamente como un componente en las combinaciones *multi-locus*.
- ***trnH-psbA***: es un espaciador intergénico, presenta buena amplificación en las plantas terrestres con un único par de primers (93% en angiospermas) y alto nivel de discriminación entre especies. La mayor limitación se encontró al intentar obtener secuencias bidireccionales. Tiene una longitud media de 418 pb, lo que es adecuado

como código de barras pero en algunas monocotiledóneas y coníferas llega a más de 1.000 pb y se necesitan primers internos específicos de cada especie.

Con estos resultados, se pasó a estudiar combinaciones de 2 loci, entre las cuales se eligió *rbcL* + *matK*. Esta elección se debe a que las regiones de *rbcL* se recuperan fácilmente en múltiples líneas filogenéticas y en combinación con otros loci presenta una buena discriminación. En cuanto a *matK*, su selección se debe a que los problemas encontrados en su amplificación se consideran más sencillos de resolver que los de *trnH-psbA*.

Posteriormente a estos estudios, se ha recomendado la utilización de la región *trnH-psbA* e ITS como marcadores complementarios para mejorar la universalidad, calidad de la secuencia y poder de discriminación del "core barcode", que serían las regiones *rbcL* + *matK* [15].

La región **nrITS** (Internal Transcribed Spacers from nuclear ribosomal DNA), fue propuesta como marcador por el China Plant BOL Group en 2011 [16]. En general presenta un mayor poder de discriminación que las regiones de los plastos en niveles taxonómicos más bajos. Un inconveniente que se destacó en un principio es que pueden existir copias divergentes parálogas dentro de un mismo individuo, lo que significa que existen varias copias en cada célula y en algunas especies se han encontrado copias divergentes en un mismo individuo, esto podría llevar a que una misma especie se identifique como dos diferentes. Sin embargo, esto solo se ha detectado en el 7,4% de las especies por lo que no se considera que sea un problema para la utilización de esta región como marcador [16].

Además de esto en algunas muestras se dieron dificultades en su amplificación y secuenciación. Una alternativa al uso de este marcador es emplear solo una porción del mismo, nrITS2, que presenta menos problemas de amplificación y secuenciación pero sigue presentando un buen poder de discriminación frente a las otras secuencias [14].

Una ventaja de este marcador es que en ocasiones el ADN podría haberse degradado tras tratamientos que incluyan calentamiento por ejemplo, para lo cual sería mejor utilizar marcadores nucleares como ITS2. Sin embargo, se han desarrollado kits para reparar el ADN degradado de estos preparados vegetales y no se considera que encontrar ADN degradado en el preparado sea un factor limitante de la técnica en la mayoría de los casos [2].

Por otra parte, más recientemente, la utilización de *ycf5*, otro marcador de plastos, fue propuesta en el año 2014 por Dong *et. al.* Este marcador se había considerado anteriormente demasiado largo y variable para el diseño de primers universales, sin embargo, su gran variabilidad demuestra su potencial valor como código de barras de plantas terrestres. Dentro de este gen se han seleccionado solamente las regiones más variables que serían *ycf1a* y *ycf1b*, lo que reduce la longitud de la secuencia y la dificultad en su amplificación. Esto, sumado a la

gran variabilidad que ya se conocía ha permitido que se proponga su utilización en la identificación de especies vegetales [17].

Como conclusión de todos estos estudios tenemos que, aunque el CBOL propone la utilización conjunta de los marcadores *matK +rbcL*, dependiendo de grupo de plantas con el que se esté trabajando en muchos estudios se ha empleado como el marcador más fiable ITS, *trnH-psbA* o *ycf5* o una combinación de varios de estos cinco.

Una vez que se ha elegido la región más idónea para su amplificación, se lleva a cabo la PCR. El resultado de la reacción de amplificación se corre en un gel de agarosa mediante electroforesis para asegurarnos de que se ha amplificado la secuencia que nos interesa y que posteriormente se van a secuenciar. Siempre que sea posible, los fragmentos obtenidos de los marcadores del código de barras de ADN se deben secuenciar de forma bidireccional [12].

Para que toda esta técnica sea eficaz y pueda cumplir su objetivo de relacionar una muestra con una especie conocida, es imprescindible contar con bases de datos que incluyan las secuencias de estos marcadores en diferentes especies, con el fin de poder comparar estas con las secuencias obtenidas en la secuenciación y determinar la especie con la que estamos trabajando. Por esta razón se han creado bibliotecas de libre acceso, siendo las más importantes:

- BOLD (*Barcode of Life Database*), creado, al igual que la técnica, en la Universidad de Guelph en Ontario.
- La base de datos colaborativa internacional de secuencia de nucleótidos (*International Nucleotide Sequence Database Collaborative*), una colaboración entre GenBank (Estados Unidos), *Nucleotide Sequence Database* (Europa) y *DNA Data Bank* (Japón).

En ambos casos, para el registro de las secuencias obtenidas se deben seguir unas normas acordadas por el CBOL (*Consortium for the Barcode of Life*). [5] Las secuencias que se incluyen en estas bases de datos deben ser fiables y haberse obtenido de especímenes que se encuentren accesibles en diferentes colecciones de material biológico identificados de manera fiable por expertos, como son museos de historia natural, herbarios, acuarios, etc. Los datos que se incluyen aquí pueden ser proporcionados por cualquier usuario pero el sistema informático de la base de datos emplea herramientas para la detección de anomalías en estas secuencias, como podría ser una elevada divergencia entre secuencias de individuos de una misma especie [18].

En estas bases de datos se comparan con un BLAST las secuencias obtenidas en el proceso anterior con las que se encuentran disponibles para diferentes especies. A continuación, el programa informático comprueba el porcentaje de similitud con las secuencias que encuentra

en la base de datos. En el caso de las plantas el porcentaje de diferencia que debe existir entre ambas secuencias varía en función del grupo con el que se esté trabajando. De esta forma se puede conocer la especie o especies que se puede encontrar en la muestra con la que se está trabajando y posteriormente estos resultados se pueden aplicar en cualquiera de los campos que se han comentado anteriormente.

Por todo lo indicado anteriormente, el código de barras de ADN ha destacado en los últimos años como un método rápido, fiable, sencillo y relativamente barato para ayudar a la identificación de especies. De hecho, ya se emplea en el control de calidad de algunos productos animales como son las conservas de pescado o el caviar.

Objetivos

A continuación se llevará a cabo una revisión de estudios en los que se ha utilizado el código de barras de ADN en el análisis de preparados de plantas medicinales y suplementos alimenticios a base de plantas en diferentes partes del mundo. Los estudios se han ordenado cronológicamente con el fin de tener una visión más cercana a la situación actual. Tras esto se comprobará si esta técnica se podría aplicar a la identificación de especies vegetales en los productos que se encuentran en el mercado en la actualidad con los datos disponibles.

Metodología

Para la realización del trabajo se han revisado artículos encontrados en las bases de datos PubMed y Web of Science. En segundo lugar se ha comprobado en BOLD (*Barcode Of Life Database*) cuántas secuencias se encuentran disponibles actualmente para las plantas medicinales más comunes.

Resultados

Identificación de la familia Polygonaceae (2009) [19]: En la Farmacopea China figuran diez especies de la familia Polygonaceae con importantes propiedades medicinales: *Rheum palmatum*, que inhibe la proliferación de células cancerígenas y el virus de la hepatitis B; *Fagopyrum dibotrys* y *Polygonum cuspidatum* tienen propiedades antioxidantes; *Rheum officinale* atenúa la toxicidad pulmonar por radiaciones y mejora la capacidad pulmonar; *Polygonum multiflorum* tienen un efecto protector frente a déficits cognitivos en la enfermedad de Alzheimer. Como vemos cada una tiene una aplicación y sin embargo, diferenciar todas estas especies de la familia Polygonaceae a la hora de recolectarlas es difícil por su similitud morfológica y variación frecuente. Es importante diferenciarlas porque se han

encontrado muchas adulteraciones en estos productos y también porque en las raíces de ruibarbo (*Rheum rhabarbarum*) se encuentra la emodina, una antraquinona que puede provocar toxicidad.

En este estudio se utilizaron como referencia especies identificadas por un taxónomo experto. Se analizaron diferentes marcadores y la secuencia que presentó una mayor variación interespecífica fue *trnH-psbA*. De todas formas se vio que estas regiones (*trnH-psbA* o *rbcL* + *spoCI* o nrITS) permitían diferenciar correctamente las especies dentro esta familia. Por lo tanto, se concluyó que el código de barras de ADN es útil en la diferenciación de las especies de esta familia y que podría llegar a tener una gran importancia en la autenticación de drogas vegetales y ser una herramienta potente para asegurar la seguridad de estas drogas en su uso clínico.

Código de barras de ADN de *Panax* sp. (2011) [20]: en este estudio se quiere diseñar un sistema de identificación de las diferentes especies del género ginseng porque el ginseng es una de las especies más utilizadas en fitoterapia y además muchas de las especies de este género se encuentran en peligro de extinción entre otras causas porque hay compradores que prefieren las plantas salvajes en lugar de las cultivadas. Los métodos actuales para la identificación no son suficientes a la hora de la recolección y se consideró el código de barras de ADN como una técnica con alta eficiencia, reproducibilidad y fiabilidad.

Las especies que se emplean en preparados medicinales son *Panax ginseng* (ginseng), *Panax quinquefolius* (ginseng americano) como tónico, estimulante y evitar la fatiga y *Panax notoginseng* (Burkill) para prevenir el sangrado y recuperarse de las heridas. *P. ginseng* y *P. quinquefolius* son más difíciles de diferenciar entre sí y, debido a la diferencia de los precios de ambas especies, podría producirse un fraude cambiando una especie por otra.

Dentro del género *Panax* se encuentran siete especies bien diferenciadas y un grupo de especies menos diferenciadas recogidas bajo la denominación *Panax bipinnatifidus*. En el estudio se recogieron muestras de las ocho especies. Las especies cultivadas son *P. notoginseng* y *P. ginseng*, son muy raras las poblaciones salvajes de estas especies. Las especies *P. stipuleanatus* y *P. pseudoginseng* son más escasas en general y se encuentran en peligro porque se pueden recolectar al confundirlas con las anteriores. Por otro lado tenemos las especies americanas que son *Panax quinquefolius* y *Panax trifolius*. Por último, la especie *P. japonicum* que no tiene tanta importancia como las anteriores. Se examinaron especímenes de todas las especies y se emplearon como referencia.

En este caso no se estudiaron preparados medicinales sino que se encuentren a la venta sino que simplemente se quería estudiar si el empleo de códigos de barras podía ser útil para

diferenciar cada especie dentro de este género. Como marcadores se emplearon las secuencias ITS y *psbA-trnH* por ser las secuencias nuclear y de plastos respectivamente que mayor variabilidad presentaban. La amplificación y secuenciación obtuvo resultados muy positivos.

Los autores concluyeron que el código de barras de ADN está siendo cada vez más aceptado para la identificación de especies pero se requiere un mayor consenso para la estrategia de desarrollo del código de barras de ADN tan pronto como sea posible. Esta técnica permitirá la identificación de la especie concreta y, por tanto, la identificación de plantas de preparados de alta calidad es más probable que se alcance. Las imitaciones caras con unas propiedades medicinales inferiores se pueden eliminar del mercado.

Identificación de infusiones comerciales (2011) [21]: Se estudiaron las infusiones de té o plantas medicinales más frecuentes en el mercado. En el análisis se emplearon los marcadores recomendado por el CBOL, *matK* + *rcbL*. En la mayoría de los preparados se encontró la especie que se designaba en el etiquetado. Sin embargo, se encontró ADN de plantas que no aparecían en el etiquetado, el más frecuente *Matricaria recutita* (manzanilla) o *Camellia sinensis* (té).

Se pudo amplificar el código de barras en el 90% de los casos, un tercio de las especies que se especificaban en las etiquetas no aparecían en GenBank, además el 62% de las que tenían no tenían una secuencia idéntica en GenBank. Sin embargo, la diferencia con respecto a secuencias de especies cercanas no era muy elevada, para *rcbL* solamente de 1 sitio y para *matK* de dos, por lo que podría concluir que se trata de la misma especie. Tras este estudio se destaca que es necesaria una mejora de los algoritmos para relacionar el código de barras a especies concretas así como uno para integrar el empleo de dos marcadores a la vez.

Identificación de plantas medicinales comercializadas en Marruecos (2012) [22, 23]: En Marruecos tienen mucha importancia las plantas medicinales que se han utilizado tradicionalmente y hay grandes tiendas donde se venden. En muchas ocasiones las personas que las venden no suelen tener muchos conocimientos sobre las diferentes especies, más que sus nombres y usos tradicionales. Conviene identificar correctamente las especies que se encuentran a la venta por razones medicinales y conservativas.

En este estudio se compraron plantas en diferentes tiendas y se apuntó el nombre vernáculo de las plantas compradas. Las secuencias elegidas en este caso fueron *rpoCl* y *psbA-trnH* combinados. Como resultado se obtuvo que se trataba de complejos de plantas, el mismo nombre tradicional se aplica a varias especies diferentes, posiblemente por una infradiferenciación taxonómica. Que se tratase de una especie u otra muchas veces marcaba la calidad de las preparaciones, son plantas que se considera que tienen las mismas propiedades

medicinales y se emplean para el tratamiento de las mismas enfermedades, por lo que se agrupan bajo el mismo nombre tradicional. En otros casos había una sobre-diferenciación en las que una misma especie recibe varios nombres tradicionales.

También se encontró que la especie *Tamus communis* se emplea con los nombres Ndkhir y Bougoudz en los preparados, mientras que no aparece recogida en la Farmacopea, lo que nos informa de que se puede obtener nueva información a partir del análisis de código de barras de ADN. Como conclusión se vio que el código de barras de ADN es un método eficaz para la identificación de material etnobotánico. Tiene un importante potencial en este campo, como para estudiar las interacciones entre los procesos de mercado y los estados de las poblaciones salvajes de estas plantas.

Identificación de *Panax ginseng* (2012) [8]: Se aplicó el código de barras de ADN a productos comprados directamente en mercados de Norteamérica para estudiar el nivel de sustituciones y falsificaciones que se encuentran en los mismos. Los productos vegetales eran 41 de ginseng y 29 otras plantas como equinácea, hierba de San Juan, té verde, etc. Se utilizaron las secuencias del core barcode *matk* y *rbcL*, además de ITS y *trnH-psbA*. Todas las especies etiquetadas como ginseng americano eran *Panax quinquefolius*, mientras que la mitad de las etiquetadas como ginseng coreano (*Panax ginseng*) eran en realidad *P. quinquefolius*. Dos de las no-ginseng se creyó que estaban adulteradas, en los que la especie principal fue sustituida por otra sin las propiedades medicinales. En tres cápsulas de extracto de té verde y dos de ginseng coreano no se encontró ADN de estas especies pero sin embargo sí había de arroz y soja, que serían aditivos de las cápsulas solamente.

Se llegó a la conclusión de que la situación actual de regulación de *Natural Health Products* es insuficiente. La utilidad del código de barras de ADN en estos análisis ha sido considerada por administraciones como la FDA. Se demostró que no solamente podrá identificar sustituciones y adulteraciones de NHPs (*Natural Health Products*), sino que además puede ayudar a sus implicaciones económicas, legales, de salud y medioambientales asociadas. El código de barras de ADN puede ser un método que aporte una mayor regulación de la identificación de estas especies y puede suponer un paso crucial en la elaboración de un protocolo más robusto.

Código de barras de ADN de productos vegetales en Norteamérica (2013) [1]: En este estudio el análisis se centró en cuatro aspectos: que la especie fuese auténtica, que no estuviera contaminada, que el ingrediente principal no esté sustituido por otra planta y que no haya aditivos no especificados en la etiqueta. Se estudiaron 44 productos vegetales (30 especies diferentes) que se encuentran en el mercado mediante un test ciego para la

identificación. También se hizo un test ciego como control de 50 muestras de hojas de especies conocidas. Se usaron como marcadores *rcbL* + ITS2. Crearon su propia base de datos con 100 especies, estas secuencias después se añadieron a la base de datos BOLD. Se pudo amplificar secuencias en el 91% de los productos.

Mediante el código de barras de ADN se obtuvo que el 59% de estos productos incluían especies no especificadas en las etiquetas. 33% contenían contaminantes o aditivos que tampoco se especificaban en las etiquetas. Se detectó sustitución en el 32% de las muestras. En el 21% de los productos se encontró arroz o soja y en otros trigo sin que se incluyeran en el etiquetado. Además en el 9% de las muestras solo se encontró ADN de arroz o trigo. En un caso se encontró una sustitución de *Hypericum perforatum* por *Senna alexandrina*, que puede causar efectos tóxicos en los pacientes ya que es un laxante que solo se puede emplear durante periodos cortos de tiempo, no de forma crónica como se emplearía la hierba de San Juan. Se encontró contaminación con hierba santa (*Tanacetum parthenium*) que puede presentar efectos adversos a nivel gastrointestinal y síntomas de abstinencia cuando deja de tomarse, además de interactuar con otros medicamentos y ser teratogénico. En algunas se encontró contaminación con nueces (o nogal), lo que podría ser peligroso para pacientes con alergias y si lo que no se usa es la nuez sino hojas, madera, corteza contienen juglona que es tóxico.

Identificación de preparados de *Hypericum perforatum* (2013) [24]: Se compraron trece productos de esta planta incluyendo cápsulas, comprimidos y tinturas. Interesa conocer lo que se encuentra en estos preparados debido al amplio uso de esta planta además de las interacciones con otros fármacos que se conocen. Se compararon los productos comprados con material obtenido de semillas en las que se había obtenido la región ITS para confirmar su identidad. Este es el locus que se amplificó en todas las muestras, solamente del 30% de las muestras pudo obtenerse esta región amplificada. Por lo tanto, se emplearon amplicones muchos más pequeños, los denominados mini-códigos de barras. Tras estas modificaciones en el método el experimento demostró que el código de barras de ADN es útil para identificar los productos que se ponen a disposición del consumidor, todos presentaron fragmentos de ADN amplificables y todos ellos demostraron tener ADN de *Hypericum perforatum*. Es un método en definitiva robusto y con bajo coste, lo que permitirá que se implemente en el proceso de fabricación así como en los organismos reguladores, añadiendo un paso fundamental en el proceso de control de calidad y manteniendo la seguridad del paciente.

Identificación de especies de plantas medicinales recomendadas por la OMS (2015) [6]: En este caso se añadió la región ITS al core barcode *matK* y *rcbL*. Después de este análisis se llevó a cabo un análisis químico de los principios activos mediante cromatografía en capa fina

y la concentración con HPLC o espectroscopía UV para ver si cumplían las concentraciones que se piden. Este segundo análisis solo se llevó a cabo en las muestras que confirmaban tener la especie especificada en la etiqueta. Este flujo del trabajo mejoraría la seguridad, velocidad y fiabilidad de todo este proceso. Se examinaron 257 muestras correspondientes a 8 especies. Los productos eran plantas secadas o tejidos pulverizados, simplemente empaquetadas o encapsuladas. Las especies que se estudiaron eran *Hamamelis virginiana*, *Matricaria recutita*, *Maytenus ilicifolia*, *Mikania glomerata*, *Panax ginseng*, *Passiflora incarnata*, *Peumus boldus* y *Valeriana officinalis*.

En todas las especies analizadas (excepto *M. glomerata*) se encontró alguna muestra que incluía otras especies, géneros o incluso otras familias. Además en muchas no se encontraron los marcadores químicos que debían estar presentes, pero en algunos casos de sustituciones el perfil químico correspondía al que debía tener la especie correcta. Por su parte, todas las plantas en las que se identificó como la especie correcta, también dieron positivo en los análisis químicos. Además, algunas sustituciones contenían los marcadores químicos en la concentración requerida. En las muestras más procesadas, se obtienen cada vez mejores resultados gracias a nuevas técnicas para solventarlo como el empleo de mini-códigos de barras. Esto demuestra que un producto puede superar los test actuales sin tratarse de la especie correcta. En definitiva, este estudio mostró un elevado número de sustituciones y malos etiquetados y que la incorporación del código de barras de ADN al control de calidad podrán hacer el proceso más seguro, fiable y barato porque las sustituciones se desecharán sin tener que llevar a cabo análisis químicos más caros.

Ya que han pasado varios años desde que se hicieron estos estudios, he revisado la base de datos BOLD para ver qué secuencias hay depositadas actualmente para las especies de plantas medicinales analizadas en estos estudios y los marcadores a los que corresponden.

Especie	Número de secuencias	Marcadores utilizados
<i>Rheum palmatum</i>	42	<i>rbcL</i> , <i>matK</i> , ITS2
<i>Fagopyrum dibotrys</i>	6	<i>rbcL</i> , <i>matK</i> , ITS2
<i>Polygonum cuspidatum</i>	5	<i>rbcL</i> , ITS2
<i>Rheum officinale</i>	35	<i>rbcL</i> , <i>matK</i> , ITS2
<i>Panax quinquefolius</i>	33	<i>rbcL</i> , ITS2, <i>matK</i> , <i>trnH-psbA</i>
<i>Panax ginseng</i>	35	<i>rbcL</i> , <i>matK</i> , ITS2

Especie	Número de secuencias	Marcadores utilizados
<i>Panax notoginseng</i>	32	ITS2, <i>matK</i> , <i>rbcL</i>
<i>Panax stipuleanatus</i>	17	ITS2, <i>matK</i> , <i>rbcL</i>
<i>Panax pseudoginseng</i>	15	ITS2, <i>matK</i> , <i>rbcL</i>
<i>Panax trifolius</i>	14	ITS2, <i>matK</i> , <i>rbcL</i> , <i>trnH-psbA</i> , <i>rbcLa</i>
<i>Panax japonicus</i>	45	<i>rbcL</i> , <i>matK</i> , ITS2

Especie	Número de secuencias	Marcadores utilizados
<i>Matricaria recutita</i>	3	<i>matK, rbcL</i>
<i>Camellia sinensis</i>	27	<i>rbcL, matK, ITS2</i>
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	9	<i>rbcL, matK, ITS2</i>
<i>Althaea officinalis</i>	6	<i>matK, rbcL, ITS2</i>
<i>Verbascum thapsis</i>	23	<i>matK, rbcLa, ITS2, rbcL, atpF-atpH, rpoC1, trnH-psbA</i>
<i>Lavandula stoechas</i>	7	<i>rbcL, ITS2, matK</i>
<i>Melissa officinalis</i>	13	<i>ITS2, matK, rbcL, rbcLa, trnH-psbA</i>
<i>Stevia rebandiana</i>	5	<i>matK, rbcL, ITS2</i>
<i>Tilia americana</i>	11	<i>atpF-atpH, matK, rbcLa, rpoC1, trnH-psbA, ITS2, rpoC1</i>
<i>Vaccinium myrtilus</i>	21	<i>rbcLa, ITS2, matK, rbcL</i>
<i>Foeniculum vulgare</i>	27	<i>matK, rbcLa, rbcL, ITS2</i>
<i>Hypericum perforatum</i>	64	<i>rbcL, ITS2, trnH-psbA, atpF-atpH, matK</i>

Especie	Número de secuencias	Marcadores utilizados
<i>Urtica dioica</i>	35	<i>ITS2, rbcLa, matK,</i>
<i>Senna alexandrina</i>	9	<i>ITS2, ITS, matK, rbcL, trnH-psbA</i>
<i>Tanacetum parthenium</i>	8	<i>rbcL, matK, ITS2</i>
<i>Amaranthus albus</i>	9	<i>rbcL, matK, trnH-psbA, ITS2</i>
<i>Echinaceae purpurea</i>	11	<i>rbcL, ITS2</i>
<i>Ginkgo biloba</i>	72	<i>rbcL, matK, ITS2</i>
<i>Juglans nigra</i>	12	<i>matK, rbcL, ITS2, atpF-atpH, rpoC1, trnH-psbA</i>
<i>Plantago ovata</i>	7	<i>matK, rbcL, ITS2</i>
<i>Taraxacum officinale</i>	36	<i>matK, rbcL, ITS2, trnH-psbA</i>
<i>Hamamelis virginiana</i>	15	<i>matK, rbcL, trnH-psbA, ITS2, atpF-atpH, rpoC1</i>
<i>Passiflora incarnata</i>	7	<i>rbcL</i>
<i>Peumus boldus</i>	57	<i>rbcL, matK</i>
<i>Valeriana officinalis</i>	17	<i>ITS2, rbcL, matK</i>

Discusión y conclusiones

En general, y según se han ido optimizando las técnicas de laboratorio, se han obtenido resultados favorables en el análisis mediante código de barras de ADN en el producto que se encuentra en el mercado. En todos los estudios las conclusiones han resultado bastante optimistas en cuanto a la posibilidad de utilizar en el futuro esta técnica. A pesar de todo, se han encontrado numerosas dificultades. Las principales limitaciones en la técnica del código de barras de ADN en productos vegetales están relacionadas con la calidad del ADN, la afinidad de los primers, amplificación por PCR y la secuenciación de los amplicones [4].

El ADN, a pesar de ser una molécula bastante estable, se puede degradar o ser eliminado por completo en un tratamiento con calor, irradiación, destilación, filtración, exposición a luz ultravioleta y/o extracción con fluidos supercríticos. Por lo tanto es posible que no se pueda utilizar el código de barras de ADN para productos procesados como extractos o tinturas. Para solucionarlo existen kits de reparación del ADN o se podrían aplicar soluciones como

modificar las técnicas de secado y procesado por otras que dañen menos el ADN. Otra opción que se ha utilizado en alguno de estos estudios con material más antiguo o dañado es el empleo de la técnica denominada mini-códigos de barras, una variación del código de barras de ADN en la que se diseñan primers internos específicos para el género o la especie que se busca en el material. Esta es una técnica de gran interés con la cual se han obtenido resultados satisfactorios en algunos de estos estudios [24, 6]. En estos casos lo ideal, que evitaría cualquier problema de este tipo, sería llevar a cabo el análisis en el momento en el que se recolecta el material vegetal, antes del proceso de manufacturación.

En ocasiones la reacción de PCR de estas regiones se encuentra inhibida por la presencia de metabolitos secundarios (polisacáridos, polifenoles, alcaloides o flavonoides...), compuestos que encontramos en concentraciones especialmente elevadas en las plantas medicinales. Sin embargo, esto se puede solventar mediante modificaciones en los métodos de extracción, en las secuencias de primers o el uso de una polimerasa modificada [7]. En la extracción se puede llevar a cabo una dilución del ADN o precipitación del ADN con alcohol, por lo que se limpia del resto de componentes, aunque muchas veces se tendrá que valorar un método específico para cada grupo de plantas.

Sin embargo, los principales problemas y los más limitantes a los que los autores se han enfrentado a la hora de llevar a cabo la identificación es, como se detalló en la introducción, llegar a un consenso en los marcadores que se deberían utilizar y, en segundo lugar, la escasez de secuencias depositadas y especímenes de referencia disponibles asociados a las mismas incluidas en las bases de datos BOLD y GenBank, al ser las más utilizadas. Para solventarlo se ha propuesto la creación de Herb-BOL, una biblioteca de referencia de mini-códigos de barras, que incluya todas las secuencias auténticas de códigos de barras enlazados a sus respectivas muestras de herbario taxonómicamente validadas [25].

Con los datos disponibles actualmente en la base de datos BOLD se podría llevar a cabo una identificación bastante fiable de la mayoría de las especies incluidas en los preparados medicinales, pero en muchas de ellas el número de secuencias podría ser insuficientes. Los marcadores más utilizados en todas las especies son *matK*, *rbcL* y ITS2. Independientemente de los registros que ya existan, en todos los casos las identificaciones se enriquecerán si hay más secuencias depositadas en la base de datos y si las mismas proceden de más zonas geográficas diferentes.

Aun teniendo en cuenta todas estas limitaciones actuales, se puede esperar que el código de barras de ADN en plantas se utilice rutinariamente en un futuro próximo. En el año 2016 la Farmacopea Británica publicó un apéndice para el método “técnicas de identificación basadas

en el ácido Desoxirribonucleico (ADN) para las drogas vegetales” [25]. En este apéndice se incluyen los pasos que se deben llevar a cabo para la identificación de plantas mediante esta técnica. Además de esto se incluyen monografías en las que se detalla esta técnica para especies concretas.

Esto significa que los laboratorios de control de calidad de estos preparados centrados en controles de química analítica deberán adaptarse a la introducción de tecnologías moleculares. En comparación con un laboratorio de química analítica, un laboratorio de biología molecular es relativamente barato. Unas instalaciones sencillas con maquinaria para realizar la PCR, un tanque de gel de electroforesis y la electricidad necesaria cuesta menos de 10.000 €. Esto se traduciría en una disminución de los costes ya que hay muestras que se descartarían en un primer paso y sobre las cuales no sería necesario realizar los controles químicos posteriores, que tienen un coste mayor.

Para el proceso industrial de control de calidad se ha desarrollado un test de PCR simple y de confianza que se dirige a diferencias en las secuencias del código de barras de ADN y solo se utilizaría el código de barras de ADN como una medida confirmatoria en lugar de la identificación de cada especie.

Por supuesto, el código de barras de ADN no se presenta como la técnica definitiva para asegurar la calidad de los preparados medicinales, sino que se debe seguir empleando de manera conjunta con los métodos que se encuentran disponibles actualmente. Los análisis macro y microscópico del material seguirán siendo necesarios por ejemplo para identificar la parte de la planta de la que se trata, ya que los metabolitos activos normalmente se encuentran en una parte determinada (raíces, corteza, hojas, etc.). En estos casos, el código de barras de ADN es totalmente incapaz de discriminar los diferentes tejidos. Por su parte el análisis químico es indispensable para determinar que la concentración de los metabolitos activos es la adecuada. Por ejemplo podríamos tener un material al que, aún perteneciendo a la especie correcta, ya se le han extraído estos metabolitos o que ha sido recolectado en una época del año en la que sus concentraciones son muy bajas.

Resulta muy interesante además destacar la gran frecuencia con la que en estos estudios se han encontrado adulteraciones o sustituciones en los preparados que se habían puesto a disposición del público. Esto puede hacer que nos planteemos la necesidad de modificación de los métodos de regulación actuales de las plantas medicinales. Hay una creciente preocupación por parte del público general por la calidad de los preparados vegetales, como demuestran los dos artículos del *New York Times* [29, 30] publicados a raíz del estudio llevado a cabo por Newmaster *et al.* en 2013 [1]. Los componentes de estos productos no

están regulados estrictamente y en muchos casos esto se traduce en un desconocimiento también de los efectos beneficiosos o nocivos que pueden tener en los pacientes [26].

Por lo tanto se podría concluir que el código de barras de ADN está afianzándose y en la actualidad no existe ningún otro método estandarizado de alto rendimiento para determinar la autenticidad de las especies incluidas en los suplementos y preparados medicinales que contienen material vegetal. No está claro cuánto tardará la industria en adoptar estas medidas de control sobre los productos que ponen a la venta ni en ser reconocida la técnica de manera oficial pero sin duda existe la necesidad de que se implementen este tipo de controles y el código de barras de ADN ofrece datos fiables.

Bibliografía

1. Newmaster SG, Grguric M, Shanmughanandhan D, Ramalingam S, Ragupathy S. **DNA barcoding detects contamination and substitution in North American herbal products.** *BMC Medicine* (2013) 11: 222
2. Coutinho Moraes DF, Still DW, Lum MR, Hirsch AN. **DNA-Based Authentication of Botanicals and Plant-Derived Dietary Supplements: Where Have We Been and Where Are We Going?** *Plant Med* (2015) 81: 687-695
3. Heinrich M. **Quality and safety of herbal medical products: regulation and the need for quality assurance along the value chains.** *British Journal of Clinical Pharmacology* (2015), 80, n°1: 62-66
4. Parveen J, Gafner S, Techen N, Murch SJ, Khan IA. **DNA Barcoding for the Identification of Botanicals in Herbal Medicine and Dietary Supplements: Strengths and Limitations.** *Plant Med* (2016), 82: 1225-1235
5. Ganie SH, Upadhyay P, Das S, Sharma MP. **Authentication of medicinal plants by DNA markers.** *Plant Gene* (2015), 4, 83-99
6. Melo Palhares *et. al.* **Medicinal Plants Recommended by the World Health Organization: DNA Barcode Identification Associated with Chemical Analyses Guarantees their Quality.** *Plos One* (2015)
7. Mishra P, Kumar A, Nagireddy A, Mani DN, Shukla AK, Tiwan R, Sundaresan V. **DNA Barcoding: an efficient tool to overcome authentication challenges in the herbal market.** *Plant Biotechnology Journal* (2016), 14: 8-21
8. Wallace LJ, Boilard SMAL, Eagle SHC, Spal JL, Shokralla S, Hajibabaei M. **DNA barcodes for everyday life: routine authentication of Natural Health Products.** *Food Research International* (2012), 49: 446-452
9. Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, de Waard SL. **Biological identifications through DNA barcodes.** *The Royal Society B* (2003), 270: 313-321
10. Packer L, Gibbs, J, Sheffield C, Hanner R. **DNA barcoding and the mediocrity of morphology.** *Molecular Ecology Resources* (2009), 9: 42-50
11. Stoeckle M. **Taxonomy, DNA and the Barcode of Life.** *BioScience* (2003), 53, n° 9.
12. Ivanova NV, de Waard JR, Hajibabaei M, Hebert P. **Protocols for High-Volumen DNA Barcode Analysis.** DNA Working Group. Consortium for the Barcode of Life

13. CBOL Plant Working Group. **A DNA barcode for land plants.** *PNAS* (2009), 106, n° 31: 12794-12797
14. Hollingsworth PM, Graham SW, Little DP. **Choosing and using a plant DNA barcode.** *PlosOne* (2011), 6, n°5
15. Hollingsworth PM. **Refining the DNA barcode for land plants.** *PNAS* (2011), 108, n°49: 19451-19452
16. China Plant BOL Group. **Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants.** *PNAS* (2011), 108 n°49: 19641-19646
17. Dong W, Xu C, Li C, Sun C, Zuo Y, Shi S, Cheng T, Guo J, Zhou S. ***ycf1*, the most promising plastid DNA barcode of land plants.** *Scientific reports* 5: 8348
18. Ratnasingham S, Hebert PDN. **BOLD: The Barcode of Life Data System ([www-barcodinglife.org](http://www.barcodinglife.org)).** *Molecular Ecology Notes* (2007), DOI: 10.1111/j.1471-8286.2006.01678.x
19. Song J, Yao H, Li Y, Li X, Lin Y, Liu C, Han J, Xie C, Chen S. **Authentication of the family Polygonaceae in Chinese Pharmacopoeia by DNA barcoding technique.** *Journal of Ethnopharmacology* (2009), 124: 434-439
20. Zuo Y, Funamoto T, Wen J, Zhou S. **DNA barcoding of Panax species.** *Planta medica* (2011), 77: 182-187
21. Stoeckle MY, Gamble CC, Kirpekar R, Young G, Ahmed S, Little DP. **Commercial teas highlight plant DNA Barcode identification successes and obstacles.** *Sci. rep.* (2011) 1,42; DOI:10.1038/srep00042
22. Rydberg A. **DNA barcoding as a tool for the identification of unknown plant material. A case study on medicinal roots traded in the medina of Marrakech.** Uppsala University, Master of science (2010)
23. Kool A, de Boer HJ, Krüger A, Rydberg A, Abbad A, Björk L, Martin G. **Molecular Identification of Commercialized Medicinal Plants in Southern Morocco.** *PLoS ONE*, 7, n°6: 39459
24. Kazi T, Hussain N, Bremmer P, Slater A, Howard C. **The application of a DNA-based identification technique to over-the-counter herbal medicines.** *Fitoterapia* (2013), 87:27-30
25. Sgamma T Lockie-Williams C, Kreuzer M, Williams S, Scheyhing U, Koch E, Slater A, Howard C. **DNA Barcoding for Industrial Quality Assurances.** *Plant Med* (2017), 83: 1117-1129
26. Techen N, Parveen I, Pan Z, A Khan I. **DNA barcoding of medicinal plant material for identification.** *Current opinion on biotechnology* (2014), 25:103-110
27. Hanner R. **Data Standards for Barcode Records in INSDC (BRIs).** Barcode data standards v.2.3. (2009)
28. Chen S et. Al. **Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species.** *PlosOne* (2010)
29. O'Connor A. **Herbal Supplements are often not what they seem.** *New York Times* (New York ed.), 5 de noviembre de 2013; D1
30. O'Connor A. **New York Attorney General Targets Supplements at Major Retailers.** *New York Times*. 3 de febrero de 2015