

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
CAMPUS LOS ÁNGELES
ESCUELA DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA VEGETAL**



**CARACTERIZACIÓN DE SECUENCIAS GENÓMICAS DE MUESTRAS DE TÉ Y
PLANTAS MEDICINALES COMERCIALIZADAS EN CHILE UTILIZANDO
CÓDIGOS DE BARRA DE ADN**

**PROYECTO DE TÍTULO PARA
OPTAR AL GRADO DE
INGENIERO EN
BIOTECNOLOGÍA VEGETAL**

DIEGO ESTEBAN FERNANDOY GALLEGOS

LOS ÁNGELES – CHILE

2022

CARACTERIZACIÓN DE SECUENCIAS GENÓMICAS DE MUESTRAS DE TÉ Y PLANTAS MEDICINALES COMERCIALIZADAS EN CHILE UTILIZANDO CÓDIGOS DE BARRA DE ADN

Alumno

Diego Esteban Fernandoy Gallegos
Ingeniero en Biotecnología Vegetal

Profesora Guía

Dra. Daniela Muñoz Baier
Doctora en Biotecnología

Jefe de Carrera

Ing. Pedro Quiroz Hernández
Profesor Instructor

AGRADECIMIENTOS

A quienes estuvieron a mi lado durante esta etapa.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CAPÍTULOS	PÁGINAS
Resumen.....	6
Abstract.....	7
1.- Introducción.....	8
2.- Objetivo general.....	10
2.1.- Objetivos específicos.....	10
3.- Las infusiones.....	10
3.1.- Mercado chileno de las infusiones.....	11
3.2.- Plantas medicinales.....	12
3.3.- Problemas en la industria.....	13
4.- Técnicas para la identificación de especies vegetales.....	14
4.1.- Códigos de Barra de ADN.....	16
4.1.1.- Colecta de la muestra.....	17
4.1.2.- Extracción de ADN.....	18
4.1.2.1.- Electroforesis en gel de agarosa.....	20
4.1.3.- Amplificación de ADN.....	22
4.1.3.1- <i>matK</i>	24
4.1.3.2.- <i>trnH-psbA</i>	26
4.1.3.3.- <i>rbcL</i>	28
4.1.4.- Secuenciación y análisis bioinformático de secuencias.....	31
4.1.5.- Evaluación de la autenticidad de los productos.....	31
5.- Conclusiones.....	32
6.- Referencias.....	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.....	17
Figura 2.....	19
Figura 3.....	24
Figura 4.....	26
Figura 5.....	28
Figura 6.....	30

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.....	23
Tabla 2.....	25

Resumen

El té es una de las bebidas más consumidas alrededor del mundo. La masificación de este producto ha conllevado a que, en muchos casos, se sustituya su ingrediente principal (*Camellia sinensis*) con otras especies vegetales que no figuran en las etiquetas. Este problema también afecta a la industria de las hierbas medicinales, que durante los últimos años se ha integrado a la industria del té, pero cuya comercialización se efectúa principalmente de manera informal. Dada esta problemática, y a la baja efectividad por parte de los análisis morfológicos para identificar los ingredientes, se han empleado técnicas basadas en el análisis del ADN, en concreto, los códigos de barra de la vida (en inglés *Barcode of Life*). Esta herramienta molecular permite generar secuencias de ADN estándar para la identificación de especies, las cuales son procesadas y comparadas con secuencias depositadas en bases de datos en la web. Los genes cloroplastidiales *matK*, *rbcl* y el espaciador intergénico *trnH-psbA* son los códigos de barra más utilizados en la actualidad. Diversos estudios han demostrado la validez de esta técnica para identificar los adulterantes de productos en base a hierbas, tés e infusiones. Sin embargo, algunos de estos tienen mejor rendimiento en ciertos grupos de plantas, por lo que carecen de la universalidad que esta herramienta requiere, y, por tanto, el uso conjunto de uno o más genes es la mejor opción. En esta revisión se abordarán las principales problemáticas para la identificación de especies vegetales comercializadas como tés y hierbas medicinales en Chile y el mundo, y se describirá la metodología para emplear los códigos de barras de ADN como herramientas para la identificación de especies.

Palabras clave: códigos de barra de ADN, té, plantas medicinales, extracción de ADN, PCR.

Abstract

Tea is one of the most consumed beverages around the world. The massification of this product has meant that, in many cases, its main ingredient (*Camellia sinensis*) is replaced with other plant species that don't appear on the labels. This problem also affects the herbal medicine industry, which in recent years has been integrated into the tea industry, but whose marketing is mainly done informally. Given this problem, and the low effectiveness of morphological analyzes to identify ingredients, techniques based on DNA analysis have been used, specifically, the Barcode of Life or DNA barcode technique. This molecular tool allows the generation of standard DNA sequences for the identification of species, which are processed and compared with sequences deposited in databases on the web. The chloroplastid genes *matK*, *rbcL* and the intergenic spacer *trnH-psbA* are the most widely used barcodes today. Several studies have shown the validity of this technique to identify adulterants in herbal products, teas and infusions. However, some of these have better performance in some groups of plants, so they lack the universality that this tool requires, and, therefore, the joint use of one or more genes is the best option. In this review, the main problems for the identification of plant species marketed as teas and medicinal herbs in Chile and the world will be addressed, and the methodology for using DNA barcodes as tools for species identification will be described.

Keywords: DNA barcode, tea, medicinal plants, DNA isolation, PCR.

1.- Introducción

El té es la segunda bebida más consumida en el mundo, después del agua. Esta infusión se prepara a partir de las hojas o brotes de la planta del té (*Camellia sinensis*), y es consumida tanto por sus sabores como por sus beneficios a la salud humana, donde destacan sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y de regulación cardiovascular (Stoeckle et al. 2011; Hayat et al. 2015; Yan et al. 2020).

Aunque esta bebida tiene sus orígenes en China, en la actualidad se comercializa en una gran cantidad de países bajo distintas marcas, y como consecuencia de esta masificación se han diversificado sus componentes. Se estima que entre el 65% y el 80% de la población de los países en desarrollo utiliza plantas medicinales como remedios (Avello y Cisternas 2010; Palhares et al. 2015; Tinitana et al. 2016), por lo que es común encontrar estas hierbas comercializadas bajo la denominación de té o “té de hierbas”.

En Chile, las hierbas medicinales son ampliamente consumidas por las propiedades beneficiosas que se les atribuyen, y dependiendo de la especie vegetal y sus compuestos pueden ser utilizadas para relajación, rejuvenecimiento o alivio de una condición específica (Avello y Cisternas 2010; Ravikumar 2014).

Si bien las propiedades beneficiosas del té y de plantas medicinales como el boldo, la manzanilla o la menta están comprobadas (Bayati et al. 2014; Trevisan et al. 2017; Cassels et al. 2018; Mariano et al. 2019), diversos estudios han demostrado que muchos té de hierbas comerciales están adulterados con otros ingredientes vegetales que no figuran en las etiquetas (Stoeckle et al. 2011; De Castro et al. 2017).

Debido a la fragmentación o pulverización del material vegetal, es particularmente difícil identificar la especie entre los ingredientes mediante el análisis de la morfología de la hoja o flores que constituyen el contenido de una bolsa de té (De Castro et al. 2017), es por esto que, debido a la demanda de una técnica que permita una caracterización precisa, surgen las pruebas basadas en la identificación de ADN.

Varios estudios recientes han empleado técnicas moleculares basadas en la secuenciación de nucleótidos para diferenciar especies de plantas morfológicamente similares, que pueden suponer un riesgo de adulteración o contaminación de un producto herbal. Han y colaboradores (2016) utilizaron marcadores moleculares para diferenciar tres especies de hierbas medicinales comercializadas en Corea (*Cynanchum wilfordii*, *Cynanchum auriculatum* y *Polygonum multiflorum*), las cuales habitualmente eran confundidas por sus nombres y por su similitud morfológica. Dichos marcadores moleculares son secuencias de ADN con una ubicación cromosómica conocida, y se utilizan con frecuencia para identificar individuos, o como sonda para marcar cromosoma, núcleo o locus (Indrees y Irshad 2014; Han et al. 2016; Nadeem et al. 2018). Dado que los marcadores de ADN no se ven afectados por las condiciones ambientales, la edad del organismo o las condiciones fisiológicas, son más confiables que la identificación verificando rasgos morfológicos o químicos (Manokar et al. 2018).

Dadas estas condiciones, los códigos de barras de ADN emergen como una herramienta útil para la identificación inequívoca de especies vegetales. El código de barras de ADN (del inglés Barcoding DNA) consiste de una o más regiones de ADN cortas y estandarizadas que se pueden usar para identificar una especie (Yu et al. 2011; Techen et al. 2014). Es una herramienta poderosa que se puede aplicar para abordar los problemas en la identificación botánica de materiales vegetales altamente procesados (Pang yChen 2014).

Una gran parte de los códigos de barras de ADN de plantas estudiados se encuentran en el genoma del cloroplasto, ya sea dentro de secuencias de codificación (como *rbcL* o *matK*) o en regiones intergénicas (como *trnH-psbA*) (Loera-Sánchez et al. 2020).

El gen *matK* es uno de los candidatos más prometedores para un código de barras de ADN (Yu et al. 2011; Faller et al. 2019). Este gen tiene aproximadamente 1570 pb de longitud y codifica para una proteína maturasa implicada en la maduración del ARN precursor, sin embargo, un tamaño de 600-800 pb es suficiente para ser utilizado como código de barras. Al ser una región codificante, la alta tasa de

evolución de *matK* lo hace utilizable para reconstrucciones filogenéticas a altos niveles taxonómicos, como Orden o Familia, y en ocasiones también a niveles taxonómicos bajos, como Género o Especie.

Por otra parte, el gen *rbcl* y la región intergénica *trnH-psbA* también se han descrito como candidatos prometedores para la identificación de especies vegetales, ya que se encuentran en regiones variables del genoma cloroplastidial de angiospermas, briofitas y pteridofitas (Dong et al. 2012; Pang et al. 2012; Newmaster et al. 2013; Saddhe y Kumar 2018; Loera-Sánchez et al. 2020).

Por lo anterior, en esta revisión bibliográfica se abordará el panorama de las infusiones en el país, sus problemáticas, y como, mediante el uso de los códigos de barras de ADN, es posible identificar adulteraciones y sustituciones de productos basados en especies vegetales.

2.- Objetivos

2.1.- Objetivo general

Demostrar que existen marcadores moleculares capaces de diferenciar secuencias de ADN provenientes de muestras vegetales, tanto de té como de hierbas medicinales frescas y procesadas.

2.2.- Objetivos específicos

- 1.- Señalar las principales problemáticas para la identificación del contenido del té y las hierbas medicinales comercializadas en Chile y el mundo.
- 2.- Exponer las técnicas moleculares que permiten diferenciar secuencias de ADN cloroplastidial provenientes de distintas muestras vegetales.

3.- Las infusiones

El consumo de té se originó en el sur de China hace al menos 2000 años, y hoy en día se ha convertido en la segunda bebida más consumida después del agua (Stoeckle et al. 2011). La planta del té, *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze, es un cultivo arbóreo de importancia económica que actualmente se cultiva en más de 52 países

(Meegahakumbura et al. 2018). Las infusiones preparadas a partir de esta planta poseen actividades biológicas únicas y beneficios para la salud de los consumidores, al contener cantidades significativas de polifenoles, cafeína y sustancias aromáticas (Abd El-Aty et al. 2014).

En los últimos años, la producción mundial de té ha rondado los 3,3 millones de toneladas por año, y destacan como mayores productores China (29%), India (25%), Sri Lanka (9%) y Kenia (9%) (Lara 2014).

Si bien el té es la principal bebida caliente consumida, comercializada y extendida a nivel global, existe un amplio espectro de especies vegetales que se consumen en forma de infusión, las cuales han sido preparadas históricamente con hierbas nativas de una región y que adoptan el nombre de “Plantas Medicinales” o “Hierbas Medicinales” por las propiedades farmacológicas que exhiben (Avello y Cisternas 2010; Petrovska 2012; Ravikumar 2014; Palhares et al. 2015; Dar et al. 2017; Trevisan et al. 2017).

3.1.- Mercado chileno de las infusiones

Chile es un país exclusivamente importador de té, tanto a granel como envasado en bolsas. Por esta razón, existe un marco regulatorio estricto para su entrada al país, determinado por el Reglamento Sanitario de Los Alimentos (D.S. 977/96, Ministerio de Salud), el cual es aplicable a la producción, elaboración, envasado, almacenamiento, distribución, venta e importación de alimentos (MINSAL 1997).

Si bien el té se refiere propiamente a las infusiones preparadas a partir de hojas de la planta del té (Stoeckle et al. 2011), con el pasar de los años se han añadido las flores, tallos o frutas a su preparación (Dubey et al. 2019). En la actualidad, la normativa chilena permite la elaboración de este producto conteniendo un máximo de 20% de tallos, pecíolos o pedúnculos en conjunto, 12% de humedad y 8% de cenizas totales, para su posterior comercialización (MINSAL 1997).

Según un informe del Ministerio de Producción y Trabajo de Argentina (2018), Chile es uno de los mayores consumidores mundiales de té, con un consumo per cápita de 87,2 litros al año. De igual forma en la región, Chile lidera el consumo de esta

bebida con 428 tazas anuales por persona, seguido por Argentina (95), Uruguay (80) y Bolivia (75), siendo junto a esta última las únicas naciones donde el consumo del té es superior al del café (Lara 2014; Hidalgo 2018).

En el plano local, un gran porcentaje del mercado del té está abarcado principalmente por dos compañías: Cambiaso Hermanos y Unilever, dueñas de las marcas más importantes de té a nivel nacional como lo son Té Supremo y Lipton, respectivamente (Hidalgo 2018; Ministerio de Produccion y Trabajo 2018).

Con el creciente consumo de las hierbas medicinales para tratar diversas dolencias y malestares, las distintas marcas de té han optado por añadir a su catálogo infusiones elaboradas con este tipo de plantas. Té Supremo, en su línea *Supremo Aromáticas*, ofrece una “cuidadosa selección de hierbas e infusiones, que además de ser ricas en sabor otorgan positivos efectos sobre la salud” (Té Supremo 2021). Algunas de las hierbas que se comercializan en esta línea son poleo (*Mentha pulegium*), cedrón (*Aloysia triphylla*), boldo (*Peumus boldus*), matico (*Buddleja globosa*), manzanilla (*Chamomilla recutita*) y menta (*Mentha x piperita*). Por su lado, Lipton sólo se centra en la comercialización del té, si bien presenta variedades con distintos nombres, como menta o naranja, estos corresponden a una mezcla de té y la hierba en el caso del primero, y el té con saborizantes en el caso del último (Lipton 2021).

3.2.- Plantas medicinales

Las plantas medicinales han sido utilizadas durante siglos por sus propiedades beneficiosas para la salud humana, para tratar diversas enfermedades o aliviar sus síntomas (Petrovska 2012; Dar et al. 2017). En Chile existe una gran variedad de especies vegetales utilizadas con este propósito, las cuales van desde las plantas más conocidas y diversificadas como la menta y la manzanilla, hasta las plantas nativas del país, como el boldo y el matico, utilizadas desde antaño por los pueblos originarios (Avello y Cisternas 2010).

El boldo (*Peumus boldus*) es una especie arbórea endémica de Chile, y es una de las hierbas medicinales más conocidas en el país, para tratar diversas dolencias y

malestares. Las hojas se utilizan principalmente en infusiones por su agradable sabor, para ayudar a la digestión y por una ligera acción sedante (Cassels et al. 2018). Su acción se debe a la gran cantidad de metabolitos secundarios presentes principalmente en las hojas, como alcaloides, aceites esenciales y compuestos fenólicos (Mariano et al. 2019).

Por otra parte, se ha demostrado que la manzanilla (*Chamomilla recutita*) posee propiedades calmantes y carminativas, y es preparada en forma de infusión a partir de las flores frescas y secas, que caracterizan su aroma dulce y afrutado (Bayati et al. 2014).

Entre todas las plantas, la menta (*Mentha x piperita*) es una de las hierbas más utilizadas a nivel mundial para tratar resfriados, inflamaciones y trastornos estomacales por la gran cantidad de polifenoles y compuestos bioactivos que posee (Trevisan et al. 2017).

En la cultura popular, el término “té de hierbas” (en inglés *herbal teas*) se ha masificado para referirse a las infusiones elaboradas a partir de distintas hierbas, las que por lo general poseen propiedades medicinales. En estricto rigor, el té se refiere únicamente a la infusión elaborada a partir de la planta *Camellia sinensis* (Stoeckle et al. 2011; Hayat et al. 2015; Sanlier et al. 2018; Yi et al. 2019)

3.3.- Problemas en la industria

Durante las dos últimas décadas el comercio del té, las hierbas medicinales y sus productos relacionados se ha vuelto cada vez más importante. En consecuencia a este creciente mercado, ha aumentado la adulteración y las prácticas fraudulentas con estos productos, convirtiéndose en una preocupación a nivel mundial (Tnah et al. 2019). Para obtener los beneficios de los alimentos que consumimos es necesario asegurarse de la autenticidad de los materiales usados para la elaboración de un producto. Particularmente en el té y las hierbas medicinales, existen diversos factores que pueden propiciar la adulteración de sus componentes, como la confusión de los nombres locales que se utilizan para referirse a una planta, o la ausencia de características morfológicas distinguibles que permitan su

diferenciación, suponiendo un riesgo para el consumidor por los posibles efectos adversos que pueda generar su ingesta (Lo y Shaw 2018).

Por esto, uno de los principales desafíos a los que se enfrenta la industria de las hierbas medicinales es garantizar la identificación inequívoca de las especies contenidas en los productos, ante la creciente demanda de certificación de calidad por parte de los consumidores (Palhares et al. 2015).

4.- Técnicas para la identificación de especies vegetales

Actualmente las técnicas para la autenticación e identificación de especies se separan en dos grupos: (1) tradicionales y (2) moleculares (Lo y Shaw 2018).

Los métodos tradicionales suelen emplear técnicas que se basan en el estudio de la morfología de la planta, como la forma, el color o la textura, apoyándose en el uso del microscopio para detectar distintas células y tejidos. Sin embargo, pese a la simplicidad del método, se necesita tener gran conocimiento para diferenciar especies muy relacionadas. Dentro de este grupo también se encuentran los análisis químicos, donde se estudian los componentes químicos de las especies por medio de técnicas de cromatografía o espectrometría, como cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o resonancia nuclear magnética (RMN) (Tnah et al. 2019). Pese a que estos métodos han sido ampliamente utilizados, sus limitaciones radican en su incapacidad para identificar especies o todos los ingredientes dentro de muestras heterogéneas (Coghlan et al. 2012), discriminar especies con perfiles químicos similares (Han et al. 2016) y a la gran cantidad de metabolitos secundarios que muchas plantas presentan (Lo y Shaw 2018).

Es por esto que surgen modernas metodologías, como el uso de técnicas moleculares, para enfrentar el problema de la identificación de especies.

El uso de técnicas moleculares es una herramienta eficaz para la identificación taxonómica de plantas medicinales, incluidas especies con características morfológicas y químicas muy similares, lo cual responde a la necesidad de un método preciso, sensible y simple para la diferenciación de especies (Guo et al. 2011; Palhares et al. 2014).

Las técnicas moleculares se introducen en la década de 1980, donde se utilizó por primera vez la técnica de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) para la construcción de un mapa molecular del genoma humano. Con el transcurso de los años, otras técnicas moleculares se desarrollaron, como la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD), microsatélites (SSR) y los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) (Grover y Sharma 2016; Dar et al. 2019).

Para aplicar estas técnicas es necesario utilizar marcadores moleculares, los cuales son secuencias de ADN, cuya posición en los cromosomas es conocida (a excepción de RAPD, cuyas secuencias son al azar y no requieren conocer la secuencia del genoma (Grover y Sharma 2016)). Se han descrito como genes cuya expresión fenotípica es fácilmente diferenciable, aunque también pueden ser regiones del ADN sin una función conocida, y que permiten detectar la variabilidad entre diferentes individuos, según el polimorfismo encontrado en su secuencia nucleotídica (Grover y Sharma 2016). Debido a su eficiencia, y al hecho de no verse afectados por las condiciones ambientales, suponen una herramienta para evaluar variabilidad genética, huella genética y relaciones filogenéticas (Dar et al. 2019).

Existen diversos estudios que avalan la utilidad de estos métodos para la identificación de especies vegetales, y la autenticación de materiales en productos alimenticios. Palhares y colaboradores (2014) realizaron un estudio para determinar especies utilizadas como sustitutas de la kina (*Cinchona pubescens*), una popular hierba medicinal consumida en Brasil para tratar la malaria, pero que recientemente se está empleando como saborizante en tónicos, y como aromatizante en vinos y bebidas. Para ello, realizaron una extracción de ADN de distintas muestras obtenidas en un supermercado, para luego ser amplificadas y secuenciadas con los marcadores moleculares *matK* y *rbcL*. Como resultado, se obtuvo que las especies identificadas pertenecían a seis familias diferentes (Loganiaceae, Apocynaceae, Rubiaceae, Cunoniaceae, Fabaceae y Menispermaceae), donde muchas de ellas se encuentran en peligro de extinción o no tienen correlación con el uso tradicional de la kina brasileña.

Este método también ha sido empleado para identificar la popular hierba china *Radix Astragali* (Chuang Qin) y sus adulterantes (Zheng et al. 2014), para detectar sustituciones en productos a base de hierbas comercializados en Canadá y Estados Unidos (Newmaster et al. 2013), para estimar la contaminación y adulteración del té de cebada (*Hordeum vulgare*) exportado desde China (Jian et al. 2014) y para detectar los adulterantes de la planta Bala (*Sida cordifolia*) comercializados en el sur de India (Santhosh Kumar et al. 2015).

4.1 Códigos de barra de ADN

El término “código de barras de ADN” (en inglés *DNA Barcode*) fue acuñado por primera vez en 2003, para la identificación global de especies. El principio de esta metodología es utilizar una región genómica estándar de secuencia corta, universalmente presente en el linaje objetivo, que tenga suficiente variación para discriminar entre especies (De Vere et al. 2015; Tnah et al. 2019), y así, compararla con secuencias depositadas en bases de datos que contengan secuencias de referencia, permitiendo asignar una muestra biológica desconocida a su taxonomía correcta (Loera-Sánchez et al. 2020).

Desde sus inicios, fue estudiada y aplicada en animales, dando como resultado el código de barras universal citocromo oxidasa I (CO1) (Hollingsworth et al. 2016), el cual no es aplicado en plantas ya que no discrimina entre la mayoría de especies por su tasa de mutación lenta (Li et al. 2015).

Después de evaluar durante años, posibles candidatos a códigos de barra de ADN, el Consorcio para el Código de Barras de la Vida (CBOL por sus siglas en inglés) recomienda porciones de los genes plastidiales *matK* (~790 pb) y *rbcL* (~550 pb) como códigos de barra estándar para la identificación de plantas terrestres, y ya existen diversos estudios que demuestran su utilidad (Figura 1) (Dong et al.; Stoeckle et al. 2011; De Vere et al. 2015; Tnah et al. 2019). Además de éstos, se han descrito códigos de barras de regiones intergénicas, como es el caso de *trnH-psbA* (~300 a ~600 pb) (Dong et al. 2012; Pang et al. 2012; Jian et al. 2014; De Castro et al. 2017; Tnah et al. 2019; Loera-Sánchez et al. 2020).

Plant Division	DNA Barcode	References
Algae	COI, <i>rbcL</i> , <i>matK</i> , <i>tufA</i> , 23S, 18S rDNA, nuITS1 and nuITS2	Hall et al 2010; Buchheim et al 2011; Caisová et al 2011; Pawlowski et al 2012; Hadi et al 2016
Bryophytes	<i>rbcL</i> , <i>matK</i> , <i>rpoB</i> , <i>trnH-psbA</i> , <i>trnL-trnF</i> , <i>rps4-trnT</i> , <i>rps19-rpl2</i> , ITS, <i>atpF-atpH</i> , <i>psbK-psbI</i> , and <i>rpoC1</i>	Lang et al 2014; Hofbauer et al 2016
Pteridophytes	<i>rbcL</i> , <i>matK</i> , <i>trnH-psbA</i> , <i>trnL-trnF</i> , <i>rpoB</i> , <i>rpoC1</i> , <i>atpA</i> , <i>atpB</i> , <i>rps4-trnS</i> , and ITS2	Ebihara et al 2010; Ma et al 2010; Li et al 2011, Gu et al 2013; Wang et al 2017
Gymnosperm	<i>rbcL</i> , <i>matK</i> , <i>ndhJ</i> , <i>rpoB</i> , <i>accD</i> , <i>YCF5</i> and <i>rpoC1</i>	Sass et al 2007; Li et al 2011
Angiosperm	<i>rbcL</i> , <i>matK</i> , <i>trnH-psbA</i> , ITS2, <i>trnL-trnF</i> , <i>rpoB</i> , <i>rpoC1</i> , <i>accD</i> , <i>YCF5</i> , <i>atpF-atpH</i> , <i>trnM-trnT</i> , <i>trnD-psbM</i> , <i>petNtrnC</i> , <i>rps16</i> , <i>psaI</i>	CBOL 2009; Chen et al 2010; China Plant BOL Group, 2011; Saddhe et al 2016; Awad et al 2017; Saddhe et al 2017

Figura 1. Lista de códigos de barras de ADN utilizados en distintas divisiones de plantas. (Extraído de Saddhe y Kumar, 2018).

Para aplicar esta metodología, es necesario seguir una serie de pasos: (1) colecta de las muestras, incluido el tejido vegetal fresco, seco y muestras procesadas; (2) extracción de ADN con distintos métodos (CTAB, fenol-cloroformo, kits comerciales); (3) amplificación de secuencias usando reacción en cadena de la polimerasa (PCR); (4) secuenciación y (5) análisis bioinformático para la comparación de secuencias encontradas en bases de datos (De Vere et al. 2015; Yu et al. 2021).

4.1.1.- Colecta de la muestra

La recolección de la muestra, sumado al manejo adecuado de esta, es el primer paso, por lo que existe una serie de recomendaciones para asegurar una extracción de ADN libre de contaminantes. Diversos autores concuerdan en que recolectar tejido foliar joven es lo ideal, ya que en este estado es más baja la cantidad de polisacáridos y polifenoles que interfieren con la extracción de ADN (Alejos et al. 2010). Se recomienda utilizar tijeras y pinzas al recolectar las muestras en campo, desinfectándolas con etanol al 70% (Kress y Erickson 2012). Si el tejido es obtenido desde invernaderos o desde cultivo *in vitro*, no es necesario congelar el material. De lo contrario, se recomienda congelar la muestra con nitrógeno líquido inmediatamente después de la abscisión, para evitar la síntesis de metabolitos secundarios.

Posterior a la recolección, es importante almacenar la muestra a -80°C y evitar ciclos de congelación y descongelación antes de extraer ADN.

Alternativamente, se pueden crear herbarios para mantener un respaldo del material vegetal obtenido. Estos se fabrican secando el tejido a temperatura ambiente o con la utilización de un horno, teniendo precaución de no aplicar una temperatura excesiva, idealmente a 60°C durante 18 horas (Staats et al. 2011). Posterior a su secado, el material se pega a una lámina/hoja, donde se detallan datos como la especie, el lugar y fecha de recolección, y se almacena en un lugar libre de humedad (Kress y Erickson 2012; De Vere et al. 2015).

Si bien los herbarios sirven como respaldo, extraer ADN desde muestras provenientes de estos puede ser problemático en comparación a muestras frescas, ya que el estado de las plantas almacenadas en herbarios depende de las condiciones en que fueron almacenadas y de su estado antes de ser preservadas, además de reportarse una pérdida del 10% en la recuperación de ADN por década (De Vere et al. 2015).

Las muestras procesadas, como el té o las infusiones de hierbas medicinales, son generalmente obtenidas en el mercado, por lo que instrucciones para su recolección no son aplicables.

4.1.2 Extracción de ADN

Existen distintas metodologías para extraer ADN a partir de material vegetal (De Vere et al. 2015). Los métodos tradicionales se remontan a los años 50, donde se utilizaban solventes orgánicos, como fenol, para separar las proteínas y el ADN. Este método de extracción podía tardar horas o días dependiendo de la cantidad de soluciones a preparar. Debido a la necesidad de acortar tiempos, en la década del 90 se introducen al mercado los kits de extracción, que contaban con la particularidad de incluir matrices inorgánicas cargadas positivamente capaces de adherir el ADN a su superficie y de esa forma separarlo del resto de componentes, además de incluir soluciones de lisis, unión y lavado (Alejos et al. 2010).

El fundamento para cualquier tipo de método de extracción es similar: se utiliza un buffer de lisis o un detergente para romper las células; al romper las células, se liberan distintas biomoléculas, y se utilizan enzimas (por ejemplo, proteinasa K) para degradar las proteínas del citoplasma; se separan los componentes celulares con la ayuda de disolventes orgánicos, centrifugaciones diferenciales y se precipita el ADN con etanol; ya que el ARN también precipita con etanol, se utiliza una RNAsa para desintegrar el ARN y de esa forma aislar el ADN completamente; se aplica calor para desactivar esta enzima y finalmente se resuspende el ADN, teniendo distintos disolventes disponibles para ello (agua Milli-Q, agua ultrapura, agua libre de nucleasas, buffer TE, entre otros). Las etapas más destacadas del proceso de extracción de ADN se mencionan en la Figura 2.

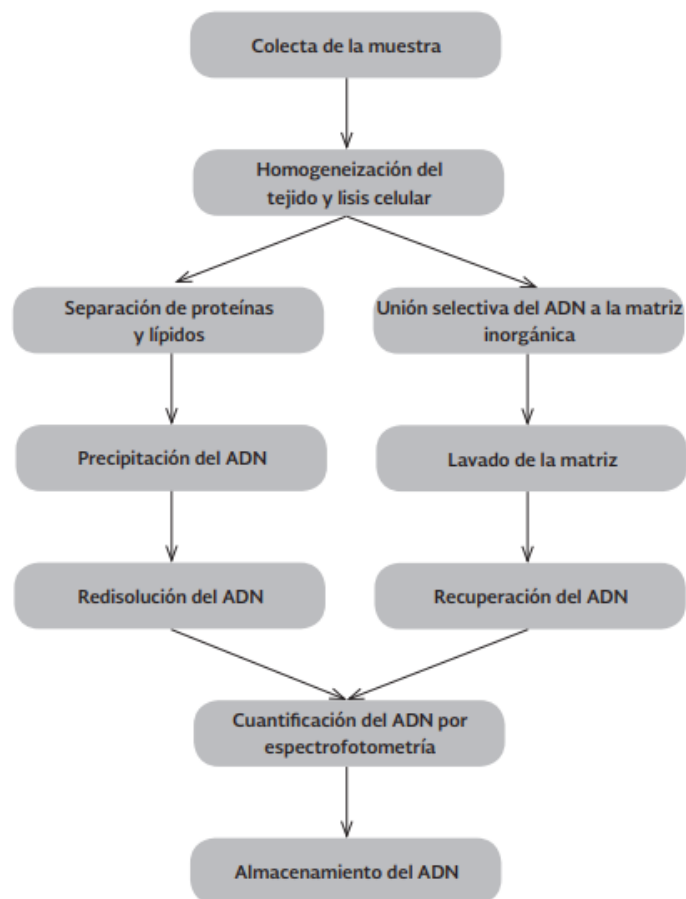


Figura 2. Esquema de las principales etapas para extracción de ADN utilizando métodos de extracción tradicionales (izquierda) y kits comerciales (derecha). (Extraído de Alejos et al. 2010).

Con el pasar de los años, estos métodos se han ido adaptando para satisfacer las necesidades de los investigadores, y por ello se han descrito protocolos de extracción para muestras específicas. Singh y colaboradores (1999) describieron un protocolo capaz de extraer ADN a partir de muestras de té negro y té verde, de gran calidad ($260/280 = 1.63-1.84$) y en cantidades de 164–494 $\mu\text{g/g}$. Para ello, utilizaron el método de extracción CTAB (siglas del inglés cetyl trimethyl ammonium bromide, o bromuro de cetiltrimetilamonio en español), el cual emplea dicha sal de amonio por su actividad detergente. Por otra parte, se han descrito protocolos modificados de kits comerciales para especies de herbario (De Vere et al. 2015), comidas procesadas (Lo y Shaw 2018) y plantas medicinales (Michel et al. 2016), los cuales difieren entre sí por sus compuestos, ciclos de preparación y otros pasos, adaptados a las distintas necesidades que requieran las muestras.

Independiente del método utilizado para extraer ADN, es necesario previamente homogenizar el tejido para lograr la lisis celular. En el caso particular de las plantas, se recomienda aplicar nitrógeno líquido a la muestra, ya que facilita la ruptura de paredes y membranas celulares, y, en consecuencia, libera el ADN.

4.1.2.1 Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis es uno de los métodos más simples utilizados en biología molecular. Se emplea por lo general para separar moléculas cargadas mediante migración en un campo eléctrico, utilizando un buffer de pH 8.0-8.3 que permita el paso de corriente y evite cambios de pH. La agarosa es un polisacárido formado por cadenas largas de disacáridos carentes de carga, obtenida de extractos de algas rojas (principalmente de los géneros *Gelidium* y *Gracilaria*) (Armstrong y Schulz 2015). Durante la gelificación ($<40^\circ\text{C}$), los polímeros de la agarosa se asocian de forma no covalente creando una red porosa. El tamaño de estos poros dependerá de la concentración a la que se prepare el gel (mayor concentración de agarosa, menor tamaño de los poros, y viceversa) y determinará el tamaño de las moléculas que migren a través de él.

En la separación de ácidos nucleicos, el grupo fosfato que se encuentra cargado negativamente, migra hacia el ánodo cargado positivamente. Ya que estas

moléculas tienen una relación de masa/carga uniforme, la distancia que recorren en el gel es inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular (Bhat y Rao 2020). Esto quiere decir, que mientras menos peso molecular tenga el ácido nucleico, mayor será su migración dentro del gel.

La electroforesis en gel de agarosa es, por tanto, una técnica empleada para verificar la extracción de ADN/ARN. Para ello se aplica un marcador fluorescente a las moléculas analizadas, de tal forma que aplicando rayos UV (con la ayuda de un transiluminador) puedan visualizarse bandas -en caso de una extracción exitosa usando marcadores moleculares- o una gran banda a lo largo del gel -en el caso de extracción de ADN genómico- (Armstrong y Schulz 2015; Bhat y Rao 2020). También existen métodos que no requieren luz UV para verificar la extracción. Dentro de ellos, se encuentran los métodos que emplean luz azul para visualizar bandas fluorescentes. Dicha fluorescencia se debe a la adición de un tinte (SYBR safe, SYBR gold) el cual se une a la molécula de ADN y reacciona emitiendo luz, siendo esta visualizada en un transiluminador de luz azul (Hadi et al. 2024).

Gran cantidad de estudios aplican esta técnica para confirmar la correcta extracción de ADN (Stoeckle et al. 2011; Yu et al. 2011; Dong et al. 2012; Pang et al. 2012; Sahu et al. 2012; Techen et al. 2014; Palhares et al. 2015; Heckenhauer et al. 2016; Michel et al. 2016; De Castro et al. 2017; Manokar et al. 2018; Faller et al. 2019).

Adicionalmente, se puede determinar el rendimiento de la extracción mediante la cuantificación del ADN. Esta molécula absorbe luz ultravioleta (UV) a una longitud de 260 nm, por lo que es posible determinar su concentración por espectrofotometría. Dicha concentración se expresa en ng/ μ L y valores entre 10 y 200 ng son aceptados para una PCR.

Por otra parte, también es posible determinar la pureza del ADN considerando la proporción de la absorbancia a 260 y 280 nm, donde valores de entre 1.6 y 1.8 son aceptados (Cornejo et al. 2014).

4.1.3.- Amplificación de ADN

Luego de verificar que la extracción de ADN haya sido exitosa, es necesario amplificar la secuencia de interés. Esto se hace mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que es el método más utilizado para aumentar el número de copias de un segmento de ADN de interés, ya que permite obtener *in vitro*, millones de copias de una porción de ADN, a partir de una sola molécula (Cornejo et al. 2014; Mandal et al. 2021). Esta técnica requiere de 4 elementos para su funcionamiento:

1) Un templado de ADN a partir del cual se amplificarán millones de copias de la secuencia de interés. Se requiere un mínimo de 5 ng/ μ L de ADN, y el desempeño de la amplificación se puede ver afectado por el estado (pureza) del templado.

2) Cebadores o primers, cadenas cortas de nucleótidos que regulan el inicio y término de la replicación, al unirse a un sitio específico de la secuencia objetivo. Generalmente, su tamaño varía entre 15-25 pares de bases y el porcentaje de guanina y citosina (G-C) no debe superar el 55%, de lo contrario, existe la posibilidad de la formación de dímeros.

Existen herramientas en la web que permiten diseñar primers indicando la secuencia objetivo a amplificar, como Primer3 Plus, que es una de las más conocidas y utilizadas ya que es gratuita y confiable. Para los códigos de barra de ADN, se buscan primers universales, capaces de amplificar fragmentos de ADN específicos para identificar especies. Muchos de ellos ya están publicados (Tabla 1) y han demostrado ser útiles para comprobar la autenticidad de tés y hierbas medicinales (Yu et al. 2011; Palhares et al. 2015; Heckenhauer et al. 2016; De Castro et al. 2017; Manokar et al. 2018).

Tabla 1. Primers universales usados en análisis de códigos de barras de ADN (extraído y adaptado de De castro y colaboradores 2017).

Locus	Nombre del primer	Secuencia (5'-3')
<i>rbcL</i>	rbcLa_F	ATG TCA CCA CAA ACA GAG ACT AAA GC
	rbcLajf634R	GAA ACG GTC TCT CCA ACG CAT
<i>matK</i>	1R_KIM-f	ACC CAG TCC ATC TGG AAA TCT TGG TTC
	3F_KIM-r	CGT ACA GTA CTT TTG TGT TTA CGA G
<i>trnH-psbA</i>	psbA3'f	GTT ATG CAT GAA CGT AAT GCT C
	trnHf	GTT ATG CAT GAA CGT AAT GCT C

3) Enzimas, una ADN polimerasa encargada de añadir nucleótidos durante la síntesis de nuevas cadenas de ADN, que sea termoestable, es decir, que soporte temperaturas de hasta 95°C por 2 minutos. La enzima más usada es la Taq polimerasa proveniente de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*, que se caracteriza por habitar lugares con condiciones de temperaturas altas (Tamay de Dios et al. 2013). Además de esta, existen otras enzimas con implicancia en la replicación, como las que permiten el desenrollamiento de la doble hélice mediante el rompimiento de puentes de hidrógeno entre las bases nitrogenadas de ambas hebras (Helicasas) o las encargadas de unir los fragmentos de Okazaki (Ligasas) (Cornejo et al. 2014).

4) Por último, se necesitan dNTPs (desoxirribonucleótidos trifosfatados) para sintetizar las nuevas cadenas de ADN. Los dNTPs corresponden a las cuatro bases nitrogenadas que constituyen el ADN. Por tanto, en esta reacción se encuentran: dATP (adenina), dCTP (citosina), dGTP (guanina) y dTTP (timina).

Además de estos cuatro elementos, es necesario contar con una solución amortiguadora, generalmente Tris HCL (pH 8.4) para mantener el pH de la reacción estable y evitar, por ejemplo, la desnaturalización de las enzimas; y un cofactor enzimático para la ADN polimerasa, usualmente dicloruro de magnesio (Tamay de Dios et al. 2013; Cornejo et al. 2014; Mandal et al. 2021).

La amplificación del ADN se realiza en ciclos, y cada ciclo de amplificación consta de tres etapas: (1) desnaturalización, se aplica una temperatura de entre 94 – 95 °C durante 30 segundos para romper los puentes de hidrógeno que unen las cadenas de ADN, resultando dos cadenas simples separadas, contemplando que si el contenido de G-C es muy alto, el tiempo o la temperatura debe aumentarse; (2) hibridación, donde los primers se alinean al extremo 3' de las cadenas simples, a una temperatura de 50°–60°C; y (3) extensión, donde la Taq polimerasa (a 72°C) comienza a añadir dNTPs complementarios a las cadenas de ADN separadas, formando así una cadena completa (Figura 3) (Tamay de Dios et al. 2013; Cornejo et al. 2014; Mandal et al. 2021).

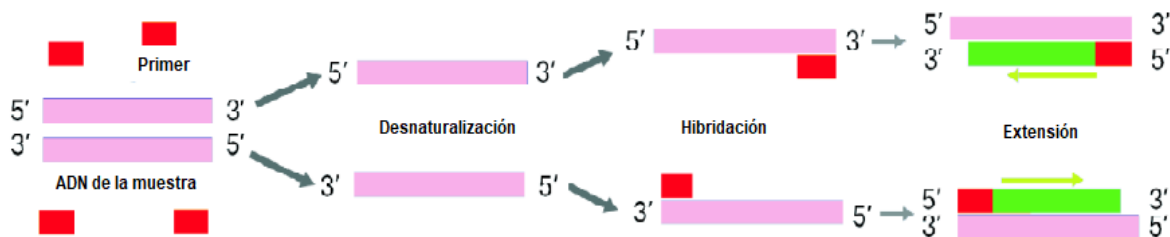


Figura 3. Esquema de los pasos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). 1) Desnaturalización. 2) Hibridación. 3) Extensión. (Extraído y adaptado de Mandal y colaboradores 2021).

El producto de la amplificación se analiza mediante electroforesis en gel de agarosa, donde se evalúa la presencia o ausencia del amplicón, y también el tamaño, que está definido por el código de barra que se ha utilizado (Tamay de Dios et al. 2013).

A continuación, se describirán los diferentes códigos de barras utilizados para la identificación de especies vegetales en la actualidad.

4.1.3.1.- *matK*

El gen cloroplastidial de la maturasa K, *matK*, (Figura 4) es uno de los genes más variables en angiospermas y se ha descrito como de rápida evolución, es decir, alta tasa de sustitución de nucleótidos, por lo que ha sido utilizado para reconstrucciones filogenéticas a niveles de Orden, Familia, Género y Especie (Yu et al. 2011; Heckenhauer et al. 2016). La resolución alcanzada utilizando este gen como código

de barras es equivalente a usar más de once genes combinados (Kar yGoyal 2015). Esta característica lo ha impulsado como un código de barra de ADN altamente recomendado por el Consorcio para el Código de Barras de la Vida (CBOL).

Yu y colaboradores (2011) evaluaron el gen *matK* completo y lograron encontrar una región de entre 600 y 800 pares de bases altamente variable, con sitios de unión de primers lo suficientemente conservados para diseñar primers universales. Luego de evaluar distintos candidatos, diseñaron un par de primers denominados *matK472F* (5'-CCC RTY CAT CTG GAA ATC TTG GTT C-3') y *matK1248R* (5'-GCT RTR ATA ATG AGA AAG ATT TCT GC-3') que amplifica un fragmento de 776 pares de bases, y fueron probados con éxito en 58 especies de 47 familias. En la Tabla 2 se muestra el rendimiento de los primers evaluados en distintas especies, tanto en amplificación como en secuenciación, en comparación con el par 390F/1326R diseñado para identificar especies del orden Caryophyllales.

Tabla 2. Universalidad de los primers *matK472F* y *matK1248R* utilizando 390F y 1326R como control (Extraído de Yu y colaboradores 2011).

Orden	<i>matK472F</i> + <i>matK1248R</i>					Control	
	<i>n</i>	<i>n1</i>	<i>n1/n</i> (%)	<i>n2</i>	<i>n2/n1</i> (%)	<i>n3</i>	<i>n3/n</i> (%)
Angiospermas	58	54	93.1	50	92.6	15	25.9
Angiospermas basales	7	7	100	6	85.7	3	42.9
Monocotiledóneas	12	11	91.7	11	100	5	41.7
Eudicotiledóneas	39	36	92.3	33	91.7	7	17.9
Eudicotiledóneas basales	6	5	83.3	5	100	0	0
Astéridas	12	11	91.7	10	90.9	3	25
Rósidas	21	20	95.2	18	90	4	19
Total	58	54	93.1	50	92.6	15	25.9

n, número de muestras; *n1*, número de muestras amplificadas; *n2*, número de muestras secuenciadas; *n3*, número de muestras amplificadas usando 390F y 1326R.

Además de estos, se han descrito otros primers universales (Tabla 1) para identificar adulterantes en muestras comerciales de té (De Castro et al. 2017), determinar la adulteración de las hierbas medicinales comercializadas en Brasil (Palhares et al. 2015), identificar los ingredientes no etiquetados en muestras de té y hierbas comercializadas en Nueva York (Stoeckle et al. 2011), entre otros (Jian et al. 2014; Tallei y Kolondam 2015; Michel et al. 2016).

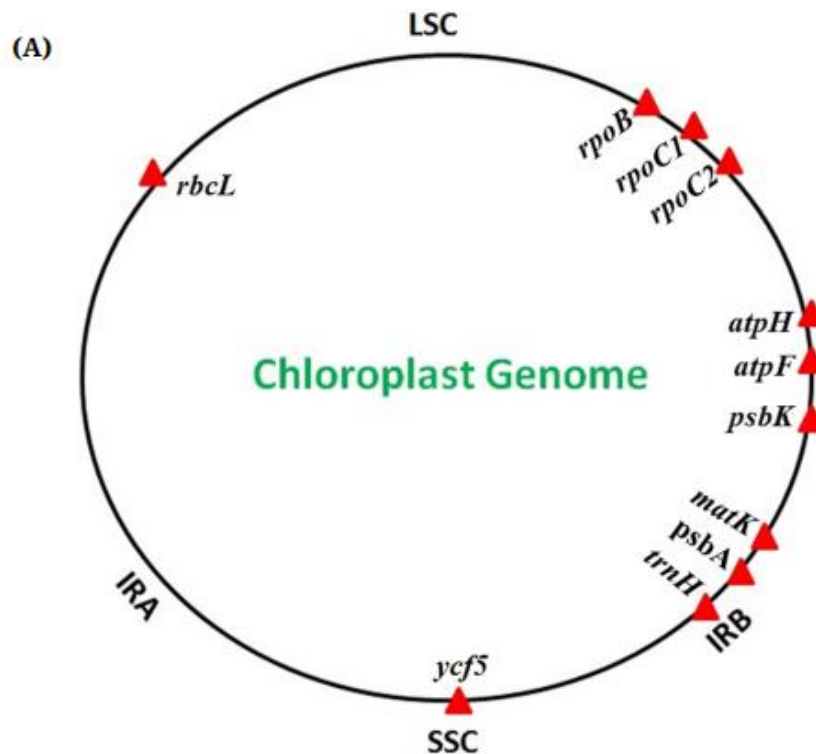


Figura 4. Representación esquemática de los distintos marcadores cloroplastidiales utilizados en códigos de barra de ADN (Extraído de Saddhe y Kumar 2018).

4.1.3.2.- *trnH-psbA*

El espaciador intergénico *trnH-psbA* es una de las regiones del cloroplasto más utilizadas como códigos de barras en la actualidad (Pang et al. 2012; Loera-Sánchez et al. 2020), ya que presenta secuencias codificantes altamente conservadas que facilitan el diseño de primers universales (Li et al. 2015).

Kumar y colaboradores (2015) realizaron un estudio para determinar las especies que son comercializadas en el sur de India para falsificar la hierba Bala (del género *Sida*), consumida por sus propiedades para mejorar la fuerza y la estamina. Para ello, se analizaron muestras conseguidas en 10 mercados de diferentes ciudades de India, y se utilizaron los primers *trnH*-R (5' CGCGCATGGTGGATTCAAAATC 3') y *psbA*-F (5' GTTATGCATGAACGTAATGCTC 3') con los cuales se alcanzó una tasa de éxito del 100% para la amplificación tanto de las muestras de referencia como de las comercializadas. De esta forma, se logró determinar que solo 2 de las muestras estudiadas representan hierbas del grupo Bala, siendo las 8 restantes mezclas de hierbas o con adulterantes.

Además, se ha demostrado que *trnH-psbA* puede ser útil para discriminar a nivel de especie. Loera-Sánchez y colaboradores (2020) utilizaron esta región para la identificación de leguminosas y gramíneas, y la compararon con otras regiones que se han descrito como códigos de barras (*matK* y *rbcL*). El estudio arrojó como resultado que si bien ningún marcador logró identificar a *Alopecurus pratensis* (Figura 5), *trnH-psbA* logró un 100% de tasa de asignación correcta para leguminosas, superior a *matK* (57.1%) y *rbcL* (93.3%), lo cual lo posiciona como una herramienta valiosa para la identificación de especies.

Family	Query species	<i>matK</i>	<i>rbclA</i>	<i>trnH-psbA</i>
Poaceae	<i>Alopecurus pratensis</i>	0/3	0/1	0/1
	<i>Arrhenatherum elatius</i>	1/3	0/2	1/1
	<i>Cynosurus cristatus</i>	3/3	2/3	3/3
	<i>Dactylis glomerata</i>	3/3	2/3	3/3
	<i>Festuca pratensis</i>	2/3	0/3	1/3
	<i>Festuca rubra</i>	1/3	3/3	2/3
	<i>Lolium multiflorum</i>	0/3	2/3	1/3
	<i>Lolium perenne</i>	2/3	0/3	2/3
	<i>Phleum pratense</i>	1/2	1/2	1/1
	<i>Poa pratensis</i>	0/3	1/2	0/2
	<i>Trisetum flavescens</i>	2/3	2/3	3/3
Fabaceae	<i>Lotus corniculatus</i>	1/3	3/3	3/3
	<i>Medicago sativa</i>	2/3	3/3	3/3
	<i>Onobrychis viciifolia</i>	2/3	3/3	3/3
	<i>Trifolium pratense</i>	2/2	2/3	3/3
	<i>Trifolium repens</i>	1/3	3/3	3/3

Figura 5. Asignación taxonómica a nivel de especie por familia, especie consultada y código de barras. (Extraído de Loera-Sánchez y colaboradores 2020).

4.1.3.3.- *rbcl*

La ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa oxigenasa (RuBisCO) es la proteína más abundante y más importante en el planeta, ya que juega un papel fundamental en el ciclo de Calvin (de fijación del carbono de la fotosíntesis). El gen *rbcl* está ubicado en el genoma del cloroplasto (Figura 4) y su utilidad filogenética ha sido fuertemente estudiada (Patwardhan et al. 2014). Posee alrededor de 1428 pares de base de largo y es universal para la gran mayoría de las plantas.

A diferencia de *matK*, el gen *rbcl* posee una variabilidad menor, por lo que es capaz de distinguir entre Orden y Familia. No obstante, en comparación a *matK*, los sitios de unión a los primers son más conservados con este gen.

Pese a sus limitaciones, este gen ha sido utilizado y ha logrado generar códigos de barras con éxito para distintas hierbas medicinales. Tnah y colaboradores (2018), lograron generar códigos de barra de alta calidad para 112 especies de plantas medicinales utilizando *rbcL*. En dicho estudio, se analizaron 30 productos elaborados en base a hierbas medicinales comercializadas en Malasia, y se logró identificar el contenido en el 73,4% de los casos. De este total, se obtuvo como resultado que el 56,7% de los productos eran auténticos, 10% correspondían a sustituciones y 6,7% fueron considerados contaminados (Figura 6).

Por otra parte, Stoeckle y colaboradores (2011) analizaron 146 muestras de té comercial y hierbas medicinales, logrando generar códigos de barra para 131 de ellas utilizando el par de primers F1 (5' ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC 3') y R634 (5' GAAACGGTCTCTCCAACGCAT 3'), identificando 42 especies en 24 familias.

Market label	Barcode ID	Identity of barcodes
<i>Eurycoma longifolia</i> (Tongkat Ali)	<i>Eurycoma longifolia</i>	Authentic
<i>Eurycoma longifolia</i> (Tongkat Ali)	<i>Prismatomeris tetrandra</i>	Substitution
<i>Eurycoma longifolia</i> (Tongkat Ali)	<i>Polyalthia bullata</i>	Substitution
<i>Eurycoma longifolia</i> (Tongkat Ali)	<i>Eurycoma longifolia</i>	Authentic
<i>Labisia pumila</i> (Kacip Fatimah)	<i>Labisia pumila</i>	Authentic
<i>Ficus deltoidea</i>	<i>Ficus deltoidea</i>	Authentic
<i>Phaleria macrocarpa</i> (Mahkota dewa)	NS	No sequence
<i>Ethiengera elatior</i> (Kantan's flower)	<i>Ethiengera elatior</i>	Authentic
<i>Eurycoma longifolia</i>	NS	No sequence
<i>Eurycoma longifolia</i>	NS	No sequence
<i>Eurycoma longifolia</i>	NS	No sequence
<i>Azadirachta indica</i>	NS	No sequence
<i>Azadirachta indica</i> (Neem)	<i>Clinacanthus nutans</i>	Substitution
<i>Orthosiphon stamineus</i> (Misai kucing)	<i>Andrographis paniculata</i>	Authentic
<i>Andrographis paniculata</i>	NS	No sequence
<i>Labisia pumila</i> , <i>Quercus lusciniica</i>	<i>Orthosiphon stamineus</i> , <i>Stevia rebaudiana</i>	Authentic
<i>Orthosiphon stamineus</i> , <i>Stevia rebaudiana</i> (Stevia)	<i>Clinacanthus nutans</i> & <i>Stevia rebaudiana</i>	Authentic
<i>Clinacanthus nutans</i> (Sabah snake grass), <i>Stevia rebaudiana</i> (Stevia)	<i>Tinospora crispa</i>	Authentic
<i>Tinospora crispa</i> (Patawali)	<i>Leea indica</i>	Authentic
<i>Leea indica</i>	NS	No sequence
<i>Cucurmin longa</i> , <i>Piper nigrum</i>	<i>Strobilanthes crispa</i> & <i>Clinacanthus nutans</i>	Contamination
<i>Strobilanthes crispa</i>	NS	No sequence
<i>Eurycoma longifolia</i>	<i>Eurycoma longifolia</i>	Authentic
<i>Eurycoma longifolia</i> (Yellow Tongkat Ali)	<i>Prismatomeris tetrandra</i>	Authentic
<i>Prismatomeris tetrandra</i> (Red Tongkat Ali)	<i>Polyalthia bullata</i>	Authentic
<i>Polyalthia bullata</i> (Black Tongkat Ali)	<i>Prismatomeris tetrandra</i>	Authentic
<i>Prismatomeris tetrandra</i> (Red Tongkat Ali)	<i>Aquilaria malaccensis</i>	Authentic
<i>Aquilaria malaccensis</i> (Aquilaria oud)	<i>Orthosiphon stamineus</i>	Authentic
<i>Orthosiphon stamineus</i> (Misai kucing)	<i>Cymbopogon citratus</i> & <i>Moringa oleifera</i>	Contamination
<i>Cymbopogon citratus</i>	<i>Aquilaria malaccensis</i>	Authentic
<i>Aquilaria malaccensis</i>		

Figura 6. Resultados de la autenticidad de productos herbales utilizando códigos de barras de ADN. NS = sin secuencia. (Extraído de Tnah y colaboradores 2019).

4.1.4.- Secuenciación y análisis bioinformático de secuencias

El último paso que contemplan los códigos de barras de ADN, es la secuenciación del fragmento de ADN amplificado. La secuenciación permite conocer el orden de los nucleótidos que constituyen la secuencia de ADN de interés, de esta forma, el producto se puede comparar con las distintas secuencias depositadas en bases de datos en internet.

A día de hoy, existen distintos métodos de secuenciación, siendo los principales la secuenciación de Sanger y los distintos métodos de secuenciación de nueva generación (NGS), que permiten la lectura de mayor cantidad de secuencias a un menor costo por base (Mardis 2017). Para el caso particular de los códigos de barras, al tratarse de secuencias cortas de ADN (no más de 1500 pb), se utiliza generalmente la secuenciación de Sanger (Cornejo et al. 2014).

Luego de secuenciar el ADN de la muestra, es necesario comparar la secuencia obtenida con aquellas publicadas en las bases de datos disponibles en internet. El Centro Nacional para la Información Biotecnológica (en inglés *National Center for Biotechnology Information*, con sus siglas NCBI) y el Sistema de Datos de Códigos de Barras de la Vida (en inglés *Barcode of Life Data System*, con sus siglas BOLD) corresponden a las dos principales bases de datos utilizadas para la comparación de secuencias, siendo esta última una iniciativa especialmente dedicada a los códigos de barra, ya que no solo contiene las secuencias de las especies, sino que también incluye los primers que se utilizaron, la información taxonómica, el lugar y fecha de recolección e imágenes de la especie en particular (Valentini et al. 2009).

4.1.5.- Evaluación de la autenticidad de los productos

Newmaster y colaboradores (2013) describieron 4 términos para referirse a la autenticidad de los productos con respecto a su etiquetado: (1) auténtico, si se encuentra un código de barras para una especie que es el ingrediente principal en la etiqueta de un producto; (2) contaminado, si se encuentra un código de barras distinto al que está etiquetado, además del código de barras auténtico; (3) sustituido, si se encuentra un código de barras para una especie diferente a la etiquetada, y no

se logra encontrar el ingrediente principal; y (4) relleno, si se encuentran códigos de barras para especies utilizadas como relleno para productos en base a hierbas, como arroz (*Oryza sativa*), soja (*Glicine max*) o trigo (*Triticum spp.*).

Estos términos se han utilizado en otros estudios donde se aplican códigos de barras para la autenticación de especies. Tnah y colaboradores (2013) realizaron un estudio para identificar los componentes de 112 especies de hierbas en el trópico. En esta investigación, sus autores han añadido otra categoría, denominada sin secuencia, y se aplica cuando no se recupera ningún código de barras en el producto analizado (Tnah et al. 2019).

5.- Conclusiones

Los códigos de barras de ADN son una técnica útil para la identificación de especies ya que mediante un análisis rápido permiten obtener la información de los ingredientes que componen una muestra de origen vegetal.

La aplicabilidad de los códigos de barras para autenticar y detectar la adulteración en productos que contienen plantas se puede corroborar por la gran cantidad de estudios que emplean esta metodología.

La identificación de especies procesadas es posible utilizando los distintos protocolos que se encuentran publicados, incluso cuando se trata de muestras con alto contenido de metabolitos secundarios. No obstante, obtener ADN de gran calidad desde muestras altamente procesadas sigue siendo un desafío.

A día de hoy no existe un solo gen que permita la identificación para todas las especies vegetales. Tanto *matK*, *rbcL*, *trnH-psbA* y otros tantos carecen de la universalidad que la técnica necesita, pero se ha demostrado que su utilización en conjunto brinda fehacientes resultados.

La aplicación de esta técnica como medida regulatoria en un país altamente consumidor como Chile, podría generar un incremento en la calidad de los productos en base a hierbas como el té y las infusiones de hierbas medicinales, lo que en consecuencia permitiría aumentar la confianza y la seguridad de quienes consumen estos productos.

6.- Referencias

Abd El-Aty AM, Choi JH, Rahman MM, Kim SW, Tosun A, Shim JH (2014) Residues and contaminants in tea and tea infusions: a review. *Food Addit Contam - Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 31:1794–1804.

Alejos L, Aragón M, Cornejo A (2014) Extracción y purificación de ADN. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (Semarnat). Primera Edición. 1-17.

Patwardhan A, Ray S, Roy A (2014) Molecular Markers in Phylogenetic Studies-A Review. *J Phylogenetics Evol Biol* 02:131. 2-9.

Armstrong JA, Schulz JR (2015) Agarose gel electrophoresis. *Curr Protoc Essent Lab Tech* 2015:7.2.1-7.2.22.

Bayati ZJ, Moradi KN, Moradi KZ (2014) Chamomile (*Matricaria recutita*) as a Valuable Medicinal Plant. *Int J Adv Biol Biomed Res* 2:823–829.

Bhat AI, Rao GP (2020) Characterization of Plant Viruses. *Springer Protocols Handbooks*. ISSN 1949-2456.

Cassels BK, Fuentes-Barros G, Castro-Saavedra S (2018) Boldo, Its Secondary Metabolites and their Derivatives. *Curr Tradit Med* 5:31–65.

Coghlan ML, Haile J, Houston J, Murray DC, White NE, Moolhuijzen P, Bellgard MI, Bunce M (2012) Deep sequencing of plant and animal DNA contained within

traditional Chinese medicines reveals legality issues and health safety concerns. *PLoS Genetics* 8:(4): e1002657. 1-10.

Cornejo A, Serrato A, Rendón B, Rocha M (2014) *Herramientas Moleculares Aplicadas en Ecología*. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (Semarnat). Primera Edición. 3-74.

Dar AA, Mahajan R, Sharma S (2019) Molecular markers for characterization and conservation of plant genetic resources. *Indian J Agric Sci* 89:1755–1763.

Dar R, Shahnawaz M, Hassan P (2017) General overview of medicinal plants: A review. *J Phytopharm* 6:349–351.

De Castro O, Comparone M, Di Maio A, Del Guacchio E, Menale B, Troisi J, Aliberti F, Trifuoggi M, Guida M (2017) What is in your cup of tea? DNA verity test to characterize black and green commercial teas. *PLoS One* 12:1–17.

De Vere N, Trinder S, Rich TCG, Trinder SA, Long C (2015) DNA barcoding for plants. *Methods in Molecular Biology* 1245. 101-117.

Dong W, Liu J, Yu J, Wang L, Zhou S (2012) Highly variable chloroplast markers for evaluating plant phylogeny at low taxonomic levels and for DNA barcoding. *PLoS One* 7:1–9.

Dong W, Xu C, Li C, Sun J, Zuo Y, Shi S, Cheng T, Guo J, Zhou S (2015) *ycf1*, the most promising plastid DNA barcode of land plants. *Scientific Reports* 5:8348.

Dubey KK, Janve M, Ray A, Singhal RS (2019) Ready to drink tea. Elsevier Inc. Trends in Non-alcoholic Beverages. 101-140.

Faller A, Ragupathy S, Zhang Y, Lu Z, Chang P (2019) DNA Quality and Quantity Analysis of *Camellia sinensis* Through Processing from Fresh Leaves to a Green Tea Extract. J AOAC Int 102:1798–1807.

Grover A, Sharma PC (2016) Development and use of molecular markers: Past and present. Crit Rev Biotechnol 36:290–302.

Guo X, Wang X, Su W, Zhang G, Zhou R (2011) DNA barcodes for discriminating the medicinal plant *Scutellaria baicalensis* (Lamiaceae) and its adulterants. Biol Pharm Bull 34:1198–1203.

Hadi I, Bozdogan D, Khedher Agha A, Ali R, Al-Shattawi S (2024) Investigation of Gel Electrophoresis Stains. Al-Salam Journal for Medical Science 4(1): 77-82.

Han EH, Cho KM, Goo YM, Kim MB, Shin YW, Kim YH, Lee SW (2016) Development of molecular markers, based on chloroplast and ribosomal DNA regions, to discriminate three popular medicinal plant species, *Cynanchum wilfordii*, *Cynanchum auriculatum*, and *Polygonum multiflorum*. Mol Biol Rep 43:323–332.

Hayat K, Iqbal H, Malik U, Bilal U, Mushtaq S (2015) Tea and Its Consumption: Benefits and Risks. Crit Rev Food Sci Nutr 55:939–954.

Heckenhauer J, Barfuss MHJ, Samuel R (2016) Universal Multiplexable matK Primers for DNA Barcoding of Angiosperms. *Appl Plant Sci* 4:1500137. 1-7.

Hidalgo P (2018) Plan de Negocios para la Implementación de una Cadena de Locales Especializados en Té Gourmet. [Tesis de Magíster en Gestión y Dirección de Empresas]. Universidad de Chile. 9-13.

Hollingsworth PM, Li D-Z, Van Der Bank M, Twyford AD (2016) Telling plant species apart with DNA: from barcodes to genomes. *Philos Trans* 371. 2-7.

Indrees M, Irshad M (2014) Molecular Markers in plants for analysis of genetic diversity: A review. *Eur Acad Res* 2:1513–1540.

Jian C, Deyi Q, Qiaoyun Y, Jia H, Dexing L, Xiaoya W, Leiqing Z (2014) A successful case of DNA barcoding used in an international trade dispute. *DNA Barcodes* 2:21–28.

Kar P, Goyal AK (2015) Maturase K gene in plant DNA barcoding and phylogenetics. *Plant DNA Barcoding and Phylogenetics*. 79-90.

Kress W, Erickson D (2012) DNA Barcodes: Methods and Protocols. *Methods in Molecular Biology* 858. ISSN 1940-6029.

Lara M (2014) Estudio de factibilidad para expansión del mercado del té en Argentina, Brasil, Chile y Perú. [Tesis de Magíster en Gestión para la Globalización]. Universidad de Chile. 105.

Li X, Yang Y, Henry RJ, Rossetto M, Wang Y, Chen S (2015) Plant DNA barcoding: from gene to genome. *Biol Rev Camb Philos Soc* 90:157–166.

Lipton (2021) Nuestros Productos, Té y Iced Tea. Disponible en: <https://www.lipton.com/cl/nuestros-tes-lipton.html>.

Lo YT, Shaw PC (2018) DNA-based techniques for authentication of processed food and food supplements. *Food Chem.* 240:767–774.

Loera-Sánchez M, Studer B, Kölliker R (2020) DNA barcode trnH-psbA is a promising candidate for efficient identification of forage legumes and grasses. *BMC Res Notes* 13:1–6.

Mandal S, Roymahapatra G, Paul D, Reddy M, Jeyaseelan C (2021) Polymerase Chain Reaction (PCR). *Edu Chem Sci Tech* 9:107–113.

Manokar J, Balasubramani SP, Venkatasubramanian P (2018) Nuclear ribosomal DNA – ITS region based molecular marker to distinguish *Gmelina arborea* Roxb. Ex Sm. from its substitutes and adulterants. *J Ayurveda Integr Med* 9:290–293.

Marcia Avello L, Isabel Cisternas F (2010) Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile. *Rev Med Chil* 138:1288–1293.

Mardis ER (2017) DNA sequencing technologies: 2006-2016. *Nat Protoc* 12:213–218.

Mariano XM, de Souza WFM, Rocha CB, Moreira RFA (2019) Bioactive volatile fraction of Chilean boldo (*Peumus boldus* Molina)—an overview. *J. Essent. Oil Res.* 31:474–486.

Meegahakumbura MK, Wambulwa MC, Li MM, Thapa KK, Sun YS, Möller M, Xu JC, Yang JB, Liu J, Liu BY, Li DZ, Gao LM (2018) Domestication origin and breeding history of the tea plant (*Camellia sinensis*) in China and India based on nuclear microsatellites and cpDNA sequence data. *Front Plant Sci* 8:1–12.

Michel CI, Meyer RS, Taveras Y, Molina J (2016) The nuclear internal transcribed spacer (ITS2) as a practical plant DNA barcode for herbal medicines. *J Appl Res Med Aromat Plants* 3:94–100.

Ministerio de Produccion y Trabajo (2018) Mesa Nacional del Té: Informe Mercado Chileno para el Té. Secretaría de Agroindustria. 9.

MINSAL (1997) Reglamento Sanitario de los Alimentos. Ministerio de Salud. DTO. N° 977/96. 140.

Nadeem MA, Nawaz MA, Shahid MQ, Doğan Y, Comertpay G, Yıldız M, Hatipoğlu R, Ahmad F, Alsaleh A, Labhane N, Özkan H, Chung G, Baloch FS (2018) DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Biotechnol Biotechnol Equip* 32:261–285.

Newmaster S, Grguric M, Shanmughanandhan D, Ramalingam S, Ragupathy S (2013) DNA Barcoding detects contamination and substitution in North America herbal products. *BMC Med* 11:222. 1-12.

Palhares RM, Drummond MG, Brasil BSAF, Krettli AU, Oliveira GC, Brandão MGL (2014) The use of an integrated molecular-, chemical- and biological-based approach for promoting the better use and conservation of medicinal species: A case study of Brazilian quinins. *J Ethnopharmacol* 155:815–822.

Palhares RM, Drummond MG, Dos Santos Alves Figueiredo Brasil B, Cosenza GP, Das Graças Lins Brandão M, Oliveira G (2015) Medicinal plants recommended by the world health organization: DNA barcode identification associated with chemical analyses guarantees their quality. *PLoS One* 10:1–29.

Pang X, Chen S (2014) Identification of Medicinal Plants Using DNA Barcoding Technique. *Encycl Anal Chem* 1–4.

Pang X, Liu C, Shi L, Liu R, Liang D, Li H, Cherny SS, Chen S (2012) Utility of the trnH-psbA Intergenic Spacer Region and Its Combinations as Plant DNA Barcodes: A Meta-Analysis. *PLoS One* 7:1–9.

Petrovska BB (2012) Historical review of medicinal plants usage. *Pharmacogn. Rev.* 6:1–5.

Ravikumar C (2014) Review on Herbal Teas. *J Pharm Sci Res* 6:236–238.

Saddhe AA, Kumar K (2018) DNA barcoding of plants: Selection of core markers for taxonomic groups. *Plant Sci Today* 5:9–13.

Sahu SK, Thangaraj M, Kathiresan K (2012) DNA Extraction Protocol for Plants with High Levels of Secondary Metabolites and Polysaccharides without Using Liquid Nitrogen and Phenol. *ISRN Mol Biol* 2012:1–6.

Sanlier N, Gokcen BB, Altuğ M (2018) Tea consumption and disease correlations. *Trends in Food Science & Technology* 78 95–106.

Santhosh Kumar JU, Krishna V, Seethapathy GS, Senthilkumar U, Ragupathy S, Ganeshiah KN, Ganesan R, Newmaster SG, Ravikanth G, Uma Shaanker R (2015) DNA barcoding to assess species adulteration in raw drug trade of “Bala” (genus: *Sida* L.) herbal products in South India. *Biochem Syst Ecol* 61:501–509.

Staats M, Cuenca A, Richardson JE, Ginkel RV van, Petersen G, Seberg O, Bakker FT (2011) DNA Damage in Plant Herbarium Tissue. *PLoS One* 6:e28448. 1-8.

Stoeckle MY, Gamble CC, Kirpekar R, Young G, Ahmed S, Little DP (2011) Commercial teas highlight plant DNA barcode identification successes and obstacles. *Sci Rep* 1:1–7.

Tallei T, Kolondam B (2015) DNA Barcoding of Sangihe Nutmeg (*Myristica fragrans*) using matK Gene. *HAYATI J Biosci* 22:41–47.

Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C (2013) Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investig en Discapac* 2:70–78.

Té Supremo (2021) Té Supremo, hierbas e infusiones. Disponible en: <http://www.supremo.cl/category/lineas-hierbas-e-infusiones/>.

Techen N, Parveen I, Pan Z, Khan IA (2014) DNA barcoding of medicinal plant material for identification. *Curr Opin Biotechnol* 25:103–110.

Tinitana F, Rios M, Romero-Benavides JC, de la Cruz Rot M, Pardo-de-Santayana M (2016) Medicinal plants sold at traditional markets in southern Ecuador. *J Ethnobiol Ethnomed* 12:1–18.

Tnah LH, Lee SL, Tan AL, Lee CT, Ng KKS, Ng CH, Nurul Farhanah Z (2019) DNA barcode database of common herbal plants in the tropics: a resource for herbal product authentication. *Food Control* 95:318–326.

Trevisan SCC, Menezes APP, Barbalho SM, Guiguer ÉL (2017) Properties of *Mentha piperita*: a Brief Review. *World J Pharm Med Res* 3:309–313.

Valentini A, Pompanon F, Taberlet P (2009) DNA barcoding for ecologists. *Trends Ecol. Evol.* 24:110–117.

Yan Z, Zhong Y, Duan Y, Chen Q, Li F (2020) Antioxidant mechanism of tea polyphenols and its impact on health benefits. *Anim Nutr* 6:115–123.

Yi M, Wu X, Zhuang W, Xia L, Chen Y, Zhao R, Wan Q, Du L, Zhou Y (2019) Tea Consumption and Health Outcomes: Umbrella Review of Meta-Analyses of Observational Studies in Humans. *Mol Nutr Food Res* 63(16):e1900389. 1-11.

Yu J, Wu X, Liu C, Newmaster S, Ragupathy S, Kress WJ (2021) Progress in the use of DNA barcodes in the identification and classification of medicinal plants. *Ecotoxicol Environ Saf* 208:111691. 1-5.

Yu J, Xue JH, Zhou SL (2011) New universal matK primers for DNA barcoding angiosperms. *J Syst Evol* 49:176–181.

Zheng S, Liu D, Ren W, Fu J, Huang L, Chen S (2014) Integrated analysis for identifying *Radix Astragali* and its adulterants based on DNA barcoding. *Evidence-based Complement Altern Med* 2014. Art ID 843923. 1-9.